



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

USO DA MELATONINA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

HALLYA BEATRIZ SOUSA AMARAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF

JULHO DE 2025



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

USO DA MELATONINA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

HALLYA BEATRIZ SOUSA AMARAL

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARGOT ALVES NUNES DODE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF

JULHO DE 2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

USO DA MELATONINA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

HALLYA BEATRIZ SOUSA AMARAL

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

APROVADO POR:

MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (Embrapa-Cenargen) (ORIENTADORA)

IVO PIVATO, PhD (Universidade de Brasília - UnB) (EXAMINADOR INTERNO)

**MAURÍCIO MACHAIM FRANCO, PhD (Universidade Federal de Uberlândia – UFU)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 15 de Julho de 2025

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

AMARAL, H. B. S. **Uso da Melatonina na produção *in vitro* de embriões bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2025, 98p. Dissertação de Mestrado.

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

FICHA CATALOGRÁFICA

SA485u

Sousa Amaral, Hallya Beatriz
USO DA MELATONINA NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES
BOVINOS / Hallya Beatriz Sousa Amaral; orientador Margot
Alves Nunes Dodes . Brasília, 2025.
98 p.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade de
Brasília, 2025.

1. Antioxidantes. 2. Qualidade Embrionária . 3. Estresse
Oxidativo. 4. Embriões Bovinos. 5. Epigenética. I. Alves
Nunes Dodes , Margot, orient. II. Título.

“O conhecimento sem amor se converte em orgulho; o amor sem conhecimento se perde na ignorância. Ilumina-te com ambos.”

— Emmanuel

Agradeço à Deus e também à espiritualidade, que me proporcionou equilíbrio e serenidade ao longo desta caminhada, sustentando minha motivação diante dos desafios e guiando minha busca pelo conhecimento.

À minha família, cujo convívio e presença fizeram parte da minha trajetória, contribuindo para minha formação e para os valores que carrego nesta caminhada. Em especial, agradeço à minha tia Alice Amaral, que foi um dos poucos familiares que apoiaram meu mestrado e que continua sempre a me incentivar na carreira acadêmica.

À minha orientadora e inspiração feminina, Dra. Margot, meu sincero agradecimento pela orientação dedicada, pelo incentivo constante, pela paciência nos momentos de dificuldade e pelos puxões de orelha que me fizeram crescer ainda mais. Sua sabedoria e apoio foram fundamentais para o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho. A senhora é uma das minhas maiores inspirações, tanto profissionalmente quanto como mulher forte e guerreira.

À Ligiane Leme, que, embora não esteja mais na mesma instituição, foi fundamental na minha formação, transmitindo todo o conhecimento que tenho hoje. Sou grata pela paciência, pela dedicação e pelo cuidado em me ensinar da melhor maneira possível, contribuindo diretamente para o meu crescimento profissional. Além de também ser uma grande inspiração para mim, tanto como mulher quanto como profissional.

Ao meu antigo orientador, Andrei Fidelis, agradeço por ter me apresentado ao mundo da carreira acadêmica e por acreditar no meu potencial desde o início, incentivando-me a seguir firme no mestrado e a buscar sempre o melhor.

Aos amigos de trabalho, pela companhia, pelas trocas de conhecimento e pelo suporte que tornaram esta caminhada mais leve e inspiradora. Cada contribuição foi importante para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Agradeço também por muitas vezes me fazerem sorrir nos momentos mais difíceis. Ana Caroline Nicolás, Laryssa Pimenta, Amanda Moura, Nayara Kussano, Márcia Silveira e José Eduardo Chaves.

Por último, mas não menos importante, ao meu companheiro, Bernardo Prado, pelo apoio, companheirismo e incentivo constantes, que tornaram esta caminhada mais leve e cheia de força. Obrigada pela paciência e por estar ao meu lado mesmo nos momentos mais conturbados. À minha filha do coração, Débora Prado, minha fonte de luz e alegria. Você chegou para

transformar minha vida, me ensinando diariamente sobre amor, resiliência e propósito. Cada conquista desta jornada é também sua. Que este trabalho represente, ainda que simbolicamente, a promessa de um futuro melhor construído também por e para você. Tudo por você, meu amor.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | 10 |
| ABSTRACT | 11 |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | 12 |
| LISTA DE TABELAS..... | 14 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 15 |
| CAPÍTULO I | 18 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 18 |
| 1.1. Objetivos | 20 |
| 1.1.1. Objetivo geral | 20 |
| 1.1.2. Objetivos Específicos | 20 |
| 1.2. Hipótese..... | 21 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos | 22 |
| 2.2. Fatores que afetam a produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos | 24 |
| 2.2.1. Qualidade dos ovócitos..... | 24 |
| 2.2.2. Ambiente e condições de cultivo..... | 28 |
| 2.3. Estresse oxidativo..... | 30 |
| 2.3.1. Produção de espécies reativas de oxigênio | 30 |
| 2.3.2. Efeito das espécies reativas de oxigênio | 31 |
| 2.4. Alternativas para minimizar o estresse oxidativo | 33 |
| 2.4.1. Atmosfera gasosa..... | 33 |
| 2.4.2. Uso de antioxidantes..... | 34 |
| 2.5. Uso da melatonina..... | 37 |
| REFERÊNCIAS | 42 |
| CAPÍTULO II..... | 54 |
| RESUMO..... | 55 |
| ABSTRACT | 56 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 57 |
| 2. MATERIAL E MÉTODO..... | 60 |
| 2.1. Coleta de Ovócitos Imaturos | 60 |
| 2.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões..... | 61 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.3. | Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio..... | 62 |
| 2.4. | Avaliação da atividade mitocondrial, acúmulo de gotículas lipídicas e contagem total de células | 62 |
| 2.5. | RT-qPCR..... | 63 |
| 2.6. | Análise de metilação do DNA..... | 66 |
| 2.7. | Vitrificação e aquecimento de blastocistos expandidos..... | 67 |
| 2.8. | Número total e porcentagem de células apoptóticas | 68 |
| 2.9. | Análises estatísticas..... | 69 |
| 3. | RESULTADOS | 70 |
| 3.1. | Efeito da melatonina na produção e desenvolvimento embrionário | 70 |
| 3.2. | Efeito da melatonina nos níveis de EROS | 72 |
| 3.3. | Efeito da melatonina na atividade mitocondrial, acúmulo de gotículas lipídicas e número total de células | 72 |
| 3.4. | Efeito da melatonina na criotolerância de embriões | 74 |
| 3.5. | Quantificação da abundância relativa de mRNA | 76 |
| 3.6. | Efeito da melatonina no perfil de metilação do DNA..... | 82 |
| 4. | DISCUSSÃO..... | 86 |
| 5. | CONCLUSÃO..... | 93 |
| | REFERÊNCIAS | 94 |

RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos da melatonina na produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), analisando seu impacto no desenvolvimento embrionário, estresse oxidativo, metabolismo lipídico, atividade mitocondrial, abundância relativa de mRNA, metilação de DNA em regiões repetitivas (Satellite I e LINE-1) e criotolerância. Quatro grupos experimentais foram comparados: Controle (sem melatonina), melatonina na maturação (MIV + Mlt), no cultivo (CIV + Mlt) ou em ambos (MIV/CIV + Mlt). A melatonina melhorou significativamente a taxa de blastocisto no D7, acelerou a cinética de desenvolvimento, reduziu os níveis de EROs e lipídios intracelulares, e aumentou a atividade mitocondrial, especialmente no grupo CIV + Mlt. A abundância relativa de mRNA indicou a influência da melatonina em genes antioxidantes (SOD1, GSS, CAT) e relacionados a reprogramação epigenética (TET1, TET3, DNMT3A), embora não tenham sido observadas alterações significativas em genes relacionados ao metabolismo lipídico. As análises de metilação revelaram um padrão de hipometilação mais acentuado nas regiões repetitivas nos grupos tratados com melatonina. Apesar das melhorias na qualidade embrionária, a criotolerância não foi significativamente alterada. Conclui-se que a melatonina exerce efeitos multifatoriais positivos, sendo mais eficaz quando suplementada durante o cultivo, promovendo embriões de melhor qualidade, com maior viabilidade embrionária.

Palavras-chave: antioxidante; estresse oxidativo; qualidade embrionária; epigenética.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of melatonin on bovine in vitro embryo production (IVEP), analyzing its impact on embryonic development, oxidative stress, lipid metabolism, mitochondrial activity, relative mRNA abundance, DNA methylation in repetitive regions (Satellite I and LINE-1), and cryotolerance. Four experimental groups were compared: Control (no melatonin), melatonin during maturation (IVM + Mlt), during culture (IVC + Mlt), or in both (IVM/IVC + Mlt). Melatonin significantly improved blastocyst rates on Day 7, accelerated developmental kinetics, reduced ROS and intracellular lipid levels, and increased mitochondrial activity, especially in the IVC + Mlt group. The relative mRNA abundance indicated the influence of melatonin on antioxidant genes (SOD1, GSS, CAT) and those related to epigenetic reprogramming (TET1, TET3, DNMT3A), although no significant changes were observed in genes related to lipid metabolism. Methylation analyses revealed a more pronounced hypomethylation pattern in repetitive regions in the melatonin-treated groups. Despite the improvements in embryo quality, cryotolerance was not significantly affected. It is concluded that melatonin exerts positive multifactorial effects, being more effective when supplemented during culture, promoting higher-quality embryos with greater embryonic viability.

Keywords: antioxidant; oxidative stress; embryonic quality; epigenetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Imagens ilustrativa das espécies reativas de oxigênio mais comuns presentes no meio biológico, Hidroxila (OH^\cdot), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e Superóxido (O_2^\cdot).....31

CAPÍTULO II

Figura 1. Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares avaliados por H_2DCFDA em diferentes grupos de tratamentos.....72

Figura 2. Níveis de gotículas lipídicas intracelulares em blastocistos avaliados por BODIPY 493/503, níveis de atividade mitocondrial avaliados por Mito Tracker Deep Red e contagem total de células por Hoechst 33342 em diferentes grupos de tratamentos.....74

Figura 3. Níveis de transcritos de genes relacionados à reprogramação epigenética - DNMT3A (DNA metiltransferase 3 alfa), DNMT3B (DNA metiltransferase 3 beta), TET1 (Translocação Ten-Eleven metilcitosina dioxigenase 1), TET2 (Translocação Ten-Eleven metilcitosina dioxigenase 2) e TET3 (Translocação Ten-Eleven metilcitosina dioxigenase 3); estresse oxidativo - SOD1 (Superóxido Dismutase 1), GSS (Glutationa Sintetase) e CAT (Catalase); e metabolismo lipídico - CPT1A (Carnitina Palmitoiltransferase 1A), PLIN2 (Perilipina 2) e PPAR γ (Peroxisoma Proliferator-Activated Receptor Gamma),.....77

Figura 4. Níveis de transcritos de genes relacionados ao estresse oxidativo, SOD1 (Superóxido Dismutase 1), GSS (Glutationa Sintetase) e CAT (Catalase).....78

Figura 5. Níveis de transcritos de genes relacionados ao metabolismo lipídico, CPT1A (Carnitina Palmitoiltransferase 1A), PLIN2 (Perilipina 2) e PPAR γ (Peroxisoma Proliferator-Activated Receptor Gamma).....79

Figura 6. Níveis de transcritos de genes relacionados à reprogramação epigenética - DNMT3A (DNA metiltransferase 3 alfa) e DNMT3B (DNA metiltransferase 3 beta).....80

Figura 7: Níveis de transcritos de genes relacionados à reprogramação epigenética - TET1 (Dioxigenase 1 de Translocação Ten-Eleven), TET2 (Dioxigenase 2 de Translocação Ten-Eleven) e TET3 (Metilcitosina dioxigenase 3 de Translocação Ten-Eleven).....81

Figura 8. Perfil de metilação do DNA do Satellite I.....83

Figura 9. Perfil de metilação do DNA do LINE-1.....84

Figura 10. Comparação entre frequência/número de alelos hiper/hipometilados (80/20%).....85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Informações dos primers utilizados para quantificação da abundância relativa de mRNA por qPCR, incluindo número de acesso no GenBank, sequências dos primers, tamanho do amplicon (pares de bases), temperatura de dissociação, eficiência dos primers e valor médio de Ct..... | 65 |
| Tabela 2. Primers para análise de metilação das regiões genômicas Satellite I e LINE-1..... | 66 |
| Tabela 3. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos submetidos a diferentes tratamentos com suplementação de melatonina nos meios de cultivo..... | 70 |
| Tabela 4. Desenvolvimento embrionário às 144 horas (D6) e 168 horas (D7) pós-inseminação sob diferentes tratamentos com suplementação de melatonina nos meios de produção <i>in vitro</i> | 71 |
| Tabela 5. Taxas de blastocistos expandidos, eclodidos, degenerados, não reexpandidos e reexpandidos 12 e 24 horas após o reaquecimento de embriões produzidos <i>in vitro</i> na presença ou ausência de melatonina..... | 75 |
| Tabela 6. Número total de células, número de células apoptóticas e proporção de células apoptóticas em blastocistos expandidos 24 horas após o reaquecimento, produzidos <i>in vitro</i> na presença ou ausência de melatonina..... | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| % | Porcentagem |
| °C | Graus Celcius |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BE | Blastocisto eclodidos |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina) |
| CC | Células do cumulus |
| cDNA | DNA complementar |
| CIV | Cultivo <i>in vitro</i> |
| CCOs | Complexos cumulus ovócitos |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| D0 | Dia 0 |
| D2 | Dia 2 |
| D6 | Dia 6 |
| D7 | Dia 7 |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNMTs | DNA Methyltransferases |
| DNMT3A | DNA Methyltransferase 3 alpha |
| DNMT3B | DNA Methyltransferase 3 beta |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FIV | Fecundação <i>in vitro</i> |
| G | Calibre da agulha |

| | |
|-------------------------------|---|
| g | Força g |
| IGF-I | <i>Insulina-Like Growth Factor 1</i> (Fator de Crescimento Tipo Insulina I) |
| GPx | Glutationa peroxidase |
| GSH | Glutationa na forma reduzida |
| GSSG | Glutationa na forma oxidada |
| H ₂ DCFDA | Diacetato de 6-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceína |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| IETS | Sociedade Internacional de Transferência de Embriões |
| LH | Hormônio luteinizante |
| LRA | Laboratório de Reprodução Animal |
| M | Molar |
| mg | Miligrama |
| MIV | Maturação <i>in vitro</i> |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetro |
| NADPH | Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo |
| NCA | Número de células apoptóticas |
| nm | Nanômetro |
| OH ⁻ | Hidroxila |
| O ₂ | Oxigênio |
| PBS | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Tampão fosfato-salino) |
| PBS-PVP | 0,3% de polivinilpirrolidona em tampão fosfato-salino |
| PIVE | Produção <i>in vitro</i> de embriões |
| RNA _m | Ácido ribonucleico mensageiro |
| RT-PCR | Reação em cadeia da polimerase em tempo real |
| RT-qPCR | Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo |

| | |
|-------|--|
| SFB | Soro fetal bovino |
| SOD | Superóxido dismutase |
| SOF | <i>Synthetic Oviductal Fluid</i> (Fluido do oviduto sintético) |
| TALP | <i>Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate</i> |
| TET | Ten-Eleven Translocation |
| TUNEL | <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling</i> |
| U | Unidade |
| UNB | Universidade de Brasília |
| UFG | Universidade Federal de Goiás |

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é atualmente a técnica mais amplamente utilizada para a obtenção de embriões bovinos em larga escala. Seu avanço não apenas transformou o panorama tecnológico da produção pecuária, mas também possibilitou o aproveitamento máximo do potencial reprodutivo das fêmeas, permitindo a multiplicação de matrizes geneticamente superiores e o progresso genético acelerado dos rebanhos (Ferré et al., 2020a; Sjunnesson, 2020; Krisher; Herrick, 2024).

Desde o nascimento, na década de 1980 (Brackett et al., 1982), do primeiro bezerro oriundo de embriões produzidos totalmente *in vitro*, a técnica tem passado por constantes aprimoramentos com o objetivo de aumentar a qualidade embrionária e as taxas de prenhez (Ferré et al., 2020a; Sjunnesson, 2020; Krisher; Herrick, 2024). No entanto, apesar dos avanços, sua eficiência ainda é limitada por taxas moderadas de formação de blastocistos (30–40%) (De Oliveira Leme et al., 2025; Harl et al., 2025; Nicolás et al., 2025; Zhang et al., 2025b), bem como por desafios relacionados à criopreservação e às perdas gestacionais, o que reforça a necessidade de melhorias contínuas nos protocolos e nas condições de cultivo (Viana, 2024a).

Entre os fatores que comprometem a eficácia da PIVE, destacam-se aspectos intrínsecos ao cultivo *in vitro*, como a composição dos meios, temperatura, tensão de oxigênio e atmosfera gasosa, os quais influenciam diretamente o desenvolvimento embrionário. Um dos principais desafios é o estresse oxidativo, resultado da baixa eficiência dos sistemas endógenos de defesa antioxidante, da escassez de moléculas neutralizadoras de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos meios utilizados, e do excesso de radicais livres induzido por fatores externos, como exposição à luz, manipulação frequente e variações físico-químicas do ambiente de cultivo (Deluao et al., 2022; Salek et al., 2025).

Diante desse cenário, a suplementação com antioxidantes tem sido amplamente investigada como estratégia para minimizar os danos provocados pelas EROs. Espécies como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) são altamente reativas e comprometem estruturas essenciais das células, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, afetando a integridade das membranas. Esses danos elevam os níveis de apoptose e provocam atrasos ou falhas no desenvolvimento embrionário inicial, impactando diretamente a qualidade dos embriões gerados *in vitro* (Kitagawa et al., 2004; Agarwal et al., 2008, 2012; Keane; Ealy, 2024).

Diante da relevância do controle do estresse oxidativo na PIVE, diversos estudos têm investigado a suplementação de antioxidantes nos meios de maturação ovocitária e de cultivo embrionário. Compostos como cisteamina (Sovernigo et al., 2017), ácido ascórbico (Guimarães et al., 2016), glutatona (De Matos et al., 2002), ITS e ácido fólico (insulina transferrina e selênio) têm sido utilizados com o objetivo de minimizar o estresse oxidativo e melhorar os índices de desenvolvimento embrionário (Dos Santos Mendonça-Soares et al., 2022).

Dentre os antioxidantes utilizados na PIVE, a melatonina tem se destacado por sua eficácia na mitigação do estresse oxidativo. Sua estrutura anfifílica permite a fácil penetração nas células, atingindo compartimentos intracelulares como mitocôndrias e núcleos, onde exerce potente ação antioxidante (Barrett; Bolborea, 2012; Cruz et al., 2014; Wang et al., 2014b). A suplementação com melatonina nos meios de maturação ovocitária (Yang et al., 2017; Marques et al., 2018) e cultivo embrionário (Wang et al., 2014b; Komninou et al., 2016) tem sido associada a melhorias na qualidade embrionária, com aumento das taxas de clivagem e formação de blastocistos (Komninou et al., 2016). Esses efeitos positivos estão diretamente relacionados a sua capacidade de neutralizar diferentes EROs, reduzir o estresse oxidativo e a apoptose celular, contribuindo para criar um ambiente estável para o desenvolvimento embrionário (Ahmadi; Ashrafizadeh, 2020).

Além de sua reconhecida ação antioxidante, a melatonina tem sido associada à regulação do metabolismo lipídico (Jin et al., 2017, 2022) e de mecanismos epigenéticos (Korkmaz; Reiter, 2008; Linowiecka et al., 2023), principalmente em modelos murinos e suínos. Estudos também indicam que essa molécula pode influenciar a expressão de genes relacionados à resposta antioxidante e à apoptose (Barrett; Bolborea, 2012; Wang et al., 2014b; Mehaisen et al., 2015; Liang et al., 2017; Marques et al., 2018). No entanto, em bovinos, os efeitos da melatonina sobre o conteúdo lipídico dos embriões e seus desdobramentos na qualidade e criotolerância

embrionária ainda são pouco compreendidos. Da mesma forma, sua atuação influencia em mecanismos epigenéticos, particularmente no que se refere à metilação do DNA, permanece pouco explorada na espécie, apesar da importância desses mecanismos na regulação do desenvolvimento e na viabilidade embrionária.

Além disso, embora os efeitos benéficos da melatonina durante etapas isoladas da PIVE, como a MIV ou CIV, estejam bem documentados, ainda não se sabe se sua suplementação contínua ao longo de todo o processo, desde a MIV até a CIV, poderia potencializar esses efeitos.

Diante dessas lacunas, uma investigação mais aprofundada é essencial para elucidar os mecanismos de ação da melatonina e definir a estratégia de suplementação mais eficaz para aprimorar os resultados da PIVE bovina.

Assim, este estudo tem como objetivo investigar se a suplementação contínua durante todo o processo de PIVE é mais eficaz do que sua aplicação pontual em etapas isoladas e, avaliar os efeitos da melatonina sobre o desenvolvimento e qualidade embrionária, o metabolismo lipídico e os mecanismos epigenéticos em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação da melatonina nos meios de maturação e/ou no meio de cultivo *in vitro* na quantidade e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

1.1.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar se a suplementação de melatonina na maturação e/ou no cultivo afeta a produção e a cinética de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*;
- b) Avaliar o efeito da suplementação de melatonina na maturação e/ou no cultivo nos níveis de EROs, quantidade de gotículas lipídicas, atividade mitocondrial e número total de células de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*;
- c) Avaliar o efeito da melatonina nos níveis de transcritos de genes relacionados à estresse oxidativo (SOD1, Catalase e GSS), metabolismo lipídico (CPT1A, PLIN2 e PPAR γ) e níveis de metilação do DNA (DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 e TET 3) em embriões bovinos

produzidos *in vitro*. Além disso, analisar os níveis de metilação do DNA das regiões Satellite I e LINE-1;

d) Avaliar a suplementação da melatonina na maturação e/ou no cultivo, na criotolerância de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*.

1.2.Hipótese

A suplementação com melatonina ao longo de todo o processo da PIVE aumenta a produção e a qualidade do embrião bovino de forma mais eficaz do que a suplementação durante a MIV ou CIV isoladamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos

A produção *in vitro* de embriões é uma biotécnica amplamente utilizada na reprodução assistida de animais de interesse zootécnico, especialmente em bovinos. Essa técnica permite a multiplicação de animais geneticamente superiores, otimizando o aproveitamento do potencial reprodutivo das fêmeas doadoras. A PIVE envolve três etapas principais: MIV de ovócitos imaturos, fecundação *in vitro* (FIV) e CIV dos embriões até o estágio de blastocisto, que pode então ser transferido para receptoras ou criopreservado (Sjunnesson, 2020; Ferré et al., 2020a; Krisher; Herrick, 2024).

Na década de 1950, avanços significativos nos procedimentos de fecundação *in vitro* resultaram no nascimento do primeiro coelho gerado por essa técnica, um importante marco na biotecnologia reprodutiva (Austin, 1951). Contudo, foi apenas na década de 1980, com o nascimento do primeiro bezerro saudável produzido por essa biotécnica, que a PIVE em bovinos começou a se consolidar (Brackett et al., 1982). No Brasil, a técnica se firmou nos anos 2000, tornando-se uma prática viável em ambiente laboratorial e passando a contribuir de forma expressiva para programas de reprodução assistida em larga escala (Viana et al., 2012).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de embriões bovinos, atrás apenas dos Estados Unidos, que lideram o mercado global. Dados recentes indicam que, em 2023, o Brasil produziu mais de 473 mil embriões, com destaque para sua expressiva participação na produção mundial, especialmente na PIVE (Viana, 2024a). Apesar dos significativos progressos, a eficiência da PIVE ainda apresenta algumas limitações, incluindo taxas moderadas de produção de blastocistos, em torno de 30% a 40% (De Oliveira Leme et al., 2025; Harl et al., 2025; Nicolás et al., 2025; Zhang et al., 2025b), conseqüentemente, os embriões

PIVE, devido a sua menor qualidade, apresentam menor capacidade de desenvolvimento posterior (Holm; Callesen, 1998; Keane; Ealy, 2024; Salek et al., 2025).

Além disso, as taxas de prenhez após a transferência de embriões produzidos *in vitro* são inferiores às obtidas com embriões produzidos *in vivo*, apresentando uma redução de aproximadamente 25%. Os embriões *in vitro* também estão associados a maiores taxas de perda gestacional, principalmente durante as fases iniciais da gestação (Ealy; Wooldridge; McCoski, 2019).

A maior parte dos embriões PIVE eram transferidos ainda frescos, enquanto os embriões produzidos *in vivo* continuavam sendo a principal escolha para congelamento e exportação (Krisher; Herrick, 2024). Essa limitação técnica refletia diretamente nos índices de prenhez, que eram consistentemente superiores com o uso de embriões *in vivo* congelados em comparação aos produzidos *in vitro* (Holm; Callesen, 1998).

Entretanto, avanços recentes nos protocolos de CIV e nas técnicas de criopreservação, incluindo vitrificação e congelamento lento, vêm gradualmente melhorando a viabilidade dos embriões *in vitro* após o descongelamento. Como resultado, a proporção de embriões *in vitro* congelados transferidos aumentou significativamente na última década, refletindo maior confiança na sua sobrevivência pós-descongelamento e em seus resultados reprodutivos (Ferré et al., 2020b).

As taxas de prenhez após a transferência de embriões produzidos *in vitro* criopreservados ainda variam de acordo com o método de preservação utilizado. Em um estudo que comparou embriões PIVE transferidos frescos, vitrificados e congelados para transferência direta (DT), observou-se que os embriões vitrificados apresentaram a menor taxa de prenhez ($35,89 \pm 3,87\%$), seguida pelos embriões congelados DT ($40,19 \pm 4,65\%$), enquanto os embriões transferidos a fresco apresentaram as maiores taxas ($51,35 \pm 1,87\%$) (Sanches et al., 2016).

Ao contrário dos embriões produzidos *in vivo*, que se desenvolvem em um microambiente materno altamente regulado e rico em fatores tróficos e antioxidantes naturais, os embriões *in vitro* enfrentam condições artificiais que dificultam o desenvolvimento embrionário ideal. A composição limitada dos meios de cultivo, a maior exposição a espécies reativas de oxigênio e as variações nos parâmetros físico-químicos do sistema de cultivo comprometem processos

fundamentais como a divisão celular, compactação e diferenciação embrionária. Como consequência, os embriões *in vitro* geralmente apresentam alterações morfológicas, maior acúmulo lipídico, menos transcritos de genes associados ao desenvolvimento e menor tolerância à criopreservação, o que se traduz em menores taxas de implantação e gestação (Holm; Callesen, 1998; Rizos et al., 2002).

Com o intuito de superar essas limitações, a biotécnica vem sendo constantemente aprimorada por meio da introdução de novos protocolos, do uso de suplementos antioxidantes, do controle refinado do microambiente embrionário e da aplicação de ferramentas moleculares, buscando-se aumentar a qualidade embrionária e, conseqüentemente, melhorar os índices de prenhez (Sjunnesson, 2020).

2.2. Fatores que afetam a produção *in vitro* de embriões bovinos

A PIVE pode ser influenciada por uma série de fatores biológicos e ambientais que afetam o desenvolvimento embrionário durante o cultivo, tanto por condições intrínsecas quanto extrínsecas. Diversos elementos impactam a eficiência da técnica, incluindo qualidade de ovócitos e as condições ambientais, como temperatura, pH, osmolaridade, atmosfera gasosa e composição dos meios de cultivo (Mo et al., 2023; Salek et al., 2025).

2.2.1. Qualidade dos ovócitos

O principal determinante do sucesso da PIVE é qualidade dos gametas, principalmente a qualidade dos ovócitos. Ovócitos imaturos com baixa competência, assim como espermatozoides com baixa motilidade ou integridade de DNA comprometida, reduzem a capacidade de desenvolvimento embrionário (Roelen, 2020; Bollwein; Malama, 2023; Mo et al., 2023).

Na PIVE bovina, a maioria dos ovócitos é retirada precocemente de folículos imaturos, o que torna essencial a MIV para que eles terminem seu desenvolvimento para atingirem a qualidade e competência ovocitária necessária para serem fecundados posteriormente. A maturação nuclear é avaliada pela presença do primeiro corpúsculo polar e indica a transição à metáfase II (MII), com taxas que variam entre 70–85% após cerca de 18–22 h de MIV. Por outro lado, a maturação citoplasmática envolve redistribuição de organelas, acúmulo de RNAs/proteínas maternas e preparo bioquímico para fecundação e desenvolvimento

embrionário, fatores esses não visíveis microscopicamente e avaliados indiretamente pela taxa de formação de blastocisto. Embora a maturação nuclear ocorra em cerca de 70–85% dos casos, apenas 30–40% dos ovócitos completam a maturação citoplasmática de forma eficaz, refletida na proporção de ovócitos que atingem o estágio de blastocisto (Pujol; López-Béjar; Paramio, 2004; Koyama et al., 2014).

A competência ovocitária para o desenvolvimento embrionário depende de diversos fatores, incluindo o tamanho do folículo, a morfologia do complexo cúmulus-ovócito (CCOs), a idade da doadora e o ambiente folicular, o qual está diretamente relacionado ao estado metabólico e hormonal do animal (Caixeta et al., 2009; Pontelo et al., 2021).

Os ovócitos provenientes de folículos bovinos com diâmetro entre 3 e 8 mm são rotineiramente utilizados para a PIVE, pois nesse estágio o ovócito já completou o seu crescimento, acumulando a maioria das reservas citoplasmáticas necessárias. Folículos menores que 3 mm contêm ovócitos imaturos, com menor capacidade de maturação e desenvolvimento, resultando em taxas inferiores de sucesso na produção de embriões. Por outro lado, folículos maiores que 8 mm contem ovócitos com maior competência (Karami Shabankareh et al., 2015), mas também podem conter ovócitos em processo de atresia ou degeneração, o que compromete a qualidade do ovócito e reduz sua. Esses resultados indicam que, embora o tamanho do folículo influencie a qualidade ovocitária, ele não é o único fator determinante da competência para o desenvolvimento.

A qualidade morfológica dos ovócitos bovinos é geralmente classificada em graus que vão de 1 a 4, baseando-se na aparência dos CCOs, no que se refere a quantidade e coloração das células de cumulus e no aspecto do citoplasma. Ovócitos de grau 1 apresentam múltiplas camadas compactas de células do cúmulus (mais de três), com citoplasma homogêneo e granulações finas, sendo considerados os mais competentes para a produção *in vitro* de embriões, com maior capacidade de maturação, fecundação e desenvolvimento até blastocisto. Ovócitos de grau 2 têm células do cumulus compactas, porém com menos camadas e citoplasma com pequenas áreas irregulares, apresentando competência intermediária. Os de grau 3 apresentam citoplasma heterogêneo ou vacuolizado, com células do cumulus menos compactas e áreas desnudas, mostrando menor potencial de desenvolvimento. Já os ovócitos de grau 4 possuem citoplasma heterogeneamente pigmentado, com células do cumulus ausente ou expandidas, sendo os menos competentes e com baixa chance de desenvolvimento embrionário. Essa classificação é amplamente usada para seleção de ovócitos em programas de pesquisa,

pois correlaciona-se diretamente com o sucesso na obtenção de embriões viáveis (Pujol; López-Béjar; Paramio, 2004; Caixeta; Dode, 2010; Wrenzycki; Stinshoff, 2013; Pontelo et al., 2021).

A idade da doadora também é um fator que influencia a competência dos ovócitos, sendo que animais muito jovens ou mais velhos tendem a apresentar ovócitos com menor potencial de desenvolvimento em comparação com fêmeas em idade reprodutiva ideal. Vários estudos têm mostrado consistentemente que, embora um grande número de CCOs possa ser recuperado de animais pré-púberes, em torno de 35-90% de recuperação em ruminantes, dependendo da estimulação ovariana e da espécie (Baldassarre, 2021), as taxas de desenvolvimento embrionário são baixas em várias espécies incluindo bovinos (Armstrong; Kotaras; Earl, 1997; Baldassarre; Bordignon, 2018; Baldassarre, 2021), ovinos (Armstrong; Kotaras; Earl, 1997) e bubalinos (Baldassarre; Bordignon, 2018).

Esses resultados evidenciam que ovócitos de animais pré-púberes têm uma competência para o desenvolvimento reduzida em comparação com ovócitos de animais adultos. Maturação incompleta ou atrasadas (Taneja et al., 2000), aquisição da competência para o desenvolvimento compromissada (Duby et al., 1996), alteração no perfil de metilação do DNA (Bernal-Ulloa et al., 2016; Fang et al., 2016) redução nos níveis de vários genes, regulação do metabolismo de lipídios e glucose afetado (Soto-Heras; Paramio, 2020) e, maior sensibilidade ao estresse (Gutiérrez-Añez et al., 2021), são algumas das causas envolvidas na redução da capacidade de desenvolvimento *in vitro* desse ovócitos (Duby et al., 1996; Currin; Baldassarre; Bordignon, 2021).

O envelhecimento materno, por sua vez, também afeta profundamente a qualidade dos ovócitos bovinos. Estudos indicam que, em animais mais velhos, as taxas de produção embrionária podem ser aproximadamente 50% inferiores em comparação com fêmeas mais jovens (Magata et al., 2021). Evidências crescentes indicam que o envelhecimento materno está associado ao aumento dos danos causados pelo estresse oxidativo, comprometimento dos sistemas de defesa antioxidante e alterações na sinalização bidirecional entre o ovócito e as células do cúmulo (Smits et al., 2023). Essas alterações principalmente relacionadas à redução da função e do número de mitocôndrias, comprometem a competência do ovócito para o desenvolvimento embrionário saudável (Iwata, 2016).

Diversos estudos sugerem que ovócitos maturados *in vivo* apresentam maior competência de desenvolvimento do que aqueles maturados *in vitro*. Evidências que sustentam essa maior competência após a maturação *in vivo* incluem maiores taxas de blastocisto (Rizos et al., 2002; Sprícigo et al., 2016) e melhor a cinética de desenvolvimento dos embriões (Egashira et al.,

2019). Esses resultados indicam que o ambiente folicular após o pico de hormônio luteinizante (LH), é essencial para aquisição da completa competência de desenvolvimento dos ovócitos bovinos. De fato, ovócitos maturados *in vivo* diferem significativamente daqueles maturados *in vitro* em diversos aspectos relacionados à competência de desenvolvimento. Estudos demonstram diferenças nos estoques de mRNA (Katz-Jaffe et al., 2009), na distribuição dos grânulos corticais (Egashira et al., 2019), no conteúdo de ATP (Somfai et al., 2011) e na quantidade de lipídios (Faria et al., 2021). Para a maturação *in vivo* e obtenção de ovócitos para a PIVE, os animais recebem várias aplicações de hormônio folículo estimulante (FSH) o que proporcionar um ambiente adequado para a aquisição da competência e, posteriormente uma administração de LH, para induzir a ovulação (Sprícigo et al., 2016).

Dessa forma, com o objetivo de melhorar a competência de desenvolvimento dos ovócitos, a administração de FSH antes da Ovum Pick-Up (OPU) (pré-tratamento com FSH) tem sido amplamente investigada (Sugimura et al., 2012; Sprícigo et al., 2016). Esse protocolo também foi testado em animais pré-púberes, e a estimulação com FSH por um período igual ou superior a 72 horas resultou em um aumento significativo na população de folículos, além de melhorar a taxa de blastocisto (Currin et al., 2017). Nessa linha, uma das alternativas propostas é o *coasting*, que consiste na administração de dose reduzidas de FSH seguida por um período de privação hormonal antes da aspiração folicular. Esse intervalo permite a maturação final dos folículos dominantes, enquanto folículos menores entram em regressão, resultando em ovócitos com maior maturação citoplasmática e maior potencial de desenvolvimento. Assim, o *coasting* ajuda a equilibrar a quantidade e a qualidade dos ovócitos recuperados, reduzindo os impactos negativos da superestimulação no animal (Fernandes et al., 2020; Zhang; Luo, 2025). Em bovinos, a aplicação dessa técnica com um período de privação de 48 horas após a última dose de FSH resultou em um aumento significativo tanto no número de folículos recrutados quanto na taxa de blastocistos, que atingiu $80 \pm 9\%$ no oitavo dia de cultivo *in vitro* (Blondin et al., 2002).

Além dos fatores citados acima, a qualidade dos ovócitos é altamente sensível a fatores ambientais como o estresse térmico e a demanda nutricional da doadora de ovócitos. O estresse térmico, especialmente em regiões tropicais, compromete a dinâmica folicular ao aumentar a produção de EROs, induzir apoptose em células da granulosa e alterar a abundância relativa de mRNA envolvida na maturação ovocitária (Alemu et al., 2018; Khan et al., 2020). Como consequência, há uma redução na taxa de crescimento folicular, menor qualidade do citoplasma e comprometimento da competência de desenvolvimento embrionário. Os resultados mostram

que a exposição ao calor intenso, especialmente 30 a 60 dias antes da aspiração folicular, reduz significativamente o número de ovócitos viáveis e a produção de embriões de alta qualidade (grau I) (Torres-Júnior et al., 2008).

Do ponto de vista nutricional, dietas deficientes em antioxidantes como vitaminas A, E, C e minerais como selênio e zinco reduzem a capacidade do ovócito de neutralizar o estresse oxidativo, afetando sua viabilidade. Além disso, desequilíbrios energéticos, tanto negativos quanto positivos, podem interferir na secreção de hormônios reprodutivos e comprometer a composição do fluido folicular, impactando negativamente a maturação e o desenvolvimento do ovócito (Kendrick et al., 1999). Assim, tanto o estresse térmico quanto falhas no manejo nutricional reduzem significativamente a competência ovocitária e, conseqüentemente, os resultados da produção *in vitro* de embriões (Feng et al., 2024). Em um estudo, novilhas que receberam a dieta com maior aporte energético (NP2) apresentaram 49% mais ovócitos recuperados e 42% mais ovócitos viáveis por sessão de aspiração folicular por OPU em comparação ao grupo controle (NP1). Embora não tenha havido diferença significativa na taxa de clivagem entre os grupos, a taxa de blastocistos no dia 7 (D7) foi maior no grupo NP2 (29,7%) em relação ao NP1 (24,4%), embora ainda inferior ao grupo controle com ovócitos de vacas adultas (36,3%) (De Toledo et al., 2023).

2.2.2. Ambiente e condições de cultivo

Apesar da qualidade dos ovócitos ser fundamental, o ambiente artificial de cultivo representa um dos maiores desafios para a PIVE. O cultivo *in vitro* expõe os embriões a condições que diferem significativamente do ambiente fisiológico, como maior concentração de oxigênio, variações de temperatura, exposição à luz e composição dos meios, fatores que podem prejudicar o desenvolvimento, aumentar a apoptose e comprometer a qualidade final dos embriões (Mo et al., 2023; Salek et al., 2025).

A tensão de oxigênio durante o processo *in vitro* é geralmente maior do que a encontrada no trato reprodutivo, o que pode levar à geração excessiva de EROs. Além disso, a exposição a luz durante os procedimentos laboratoriais também pode induzir danos oxidativos aos gametas. Esses fatores, somados à composição dos meios de cultivo, que muitas vezes não atendem completamente às necessidades metabólicas do embrião, resultam em estresse oxidativo (Agarwal et al., 2008, 2012).

A redução da tensão de oxigênio durante a PIVE tem demonstrado efeitos positivos no desenvolvimento embrionário. Estudos mostram que a maturação em 5% de O₂, comparada à condição atmosférica de 20% de O₂, aumenta as taxas de clivagem e blastocisto, além de melhorar a qualidade embrionária, especialmente quando combinada com meio livre de soro (Pereira et al., 2010). Outros autores também observaram que essa baixa condição atmosférica favorece a abundância relativa de mRNA de genes relacionados à função mitocondrial e defesa antioxidante, enquanto a alta oxigenação ativa vias de estresse oxidativo e apoptose (De Lima et al., 2024). De forma complementar, a baixa oxigenação em todas as etapas da PIVE melhora não apenas o rendimento embrionário, mas também a qualidade celular, a expressão de genes antioxidantes e a criotolerância dos embriões, reforçando que esse ambiente mais próximo do fisiológico é essencial para resultados superiores (Báez et al., 2024).

Além da tensão de oxigênio, outros fatores relacionados ao meio de cultivo influenciam significativamente a eficiência da PIVE. Estudos recentes demonstraram que é possível reduzir substancialmente os componentes do fluido do oviduto sintético (SOF) sem comprometer o desenvolvimento embrionário. A redução de 75% dos nutrientes no meio (SOF25), quando comparada à formulação padrão (SOF100), não afetou as taxas de clivagem, formação de blastocistos, padrão de metilação dos embriões, taxa de prenhez, perdas gestacionais entre os dias 30 e 60, nem a taxa de nascimento (De Oliveira Leme et al., 2025). Esses achados sugerem que a composição do meio pode ser simplificada sem comprometer o desenvolvimento embrionário, indicando que os meios convencionais podem conter nutrientes em excesso. No entanto, a fonte proteica, especialmente no cultivo embrionário, tem impacto significativo sobre a eficiência da PIVE. Diversos estudos indicam que a remoção do soro fetal bovino (SFB) do meio de cultivo aumenta significativamente as taxas de blastocisto, afeta a qualidade embrionária, o metabolismo, a abundância relativa de mRNA e a criotolerância (Del Collado et al., 2016; Soto-Moreno et al., 2021; Arias et al., 2022; Kussano; Leme; Dode, 2023). Entretanto, é importante destacar que, embora o SFB contribua para o aumento das taxas de produção, sua presença está associada a efeitos indesejáveis, e sua remoção tem sido relacionada à melhora na qualidade dos embriões produzidos (Mun et al., 2017; Sena-Netto et al., 2020; Cuellar et al., 2025).

As condições de temperatura e o estresse térmico, também exercem influência crítica sobre a qualidade embrionária como amplamente demonstrado na literatura (Hansen, 2019; Naranjo-Gómez et al., 2021). Evidências recentes mostram que o estresse térmico durante a MIV (41 °C)

não impactou diretamente a maturação dos ovócitos, mas embriões derivados desses ovócitos apresentaram alterações importantes no perfil bioenergético mitocondrial, aumento nos níveis de EROs e sinais de estresse no retículo endoplasmático (Held-Hoelker et al., 2025). O impacto do calor sobre os embriões também é bem estabelecido: os estágios iniciais, como o de zigoto e 2 células, são particularmente sensíveis, com significativa redução nas taxas de blastocisto. Nesses casos, os efeitos incluem danos estruturais, aumento na geração de EROs e fragmentação do DNA. Por outro lado, embriões mais avançados, como os em estágio de blastocisto, desenvolvem maior resistência ao estresse térmico devido ao acúmulo de antioxidantes, como a glutathiona reduzida (GSH) e à expressão de proteínas de choque térmico, como a HSP70 (Naranjo-Gómez et al., 2021). Dessa forma, otimizar os meios e as condições de cultivo, com ajustes na composição nutricional, fonte proteica, tensão de oxigênio e controle térmico, é fundamental para maximizar a competência dos ovócitos e a qualidade dos blastocistos produzidos. A adição de aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento, macromoléculas e antioxidantes são estratégias promissoras para esse fim (Nagai, 2001; Ferré et al., 2020b; Krisher; Herrick, 2024).

2.3. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio na produção de EROs, seja por aumento na produção dessas espécies ou por deficiências nas defesas naturais do sistema *in vitro* que não conseguem neutralizá-las adequadamente. Isso destaca a importância de utilizar antioxidantes nos meios de cultivo da PIVE. Nesse contexto, o estresse oxidativo pode ter efeitos prejudiciais sobre as células, reduzindo a eficiência da maturação devido a alterações e mortes celulares, o que compromete o desenvolvimento embrionário e leva a taxas reduzidas de produção de blastocistos (Ferreira; Matsubara, 1997; Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Agarwal et al., 2008).

2.3.1. Produção de espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres, ou EROs, são moléculas geradas naturalmente pelo metabolismo celular e desempenham papéis importantes na transdução de sinais intracelulares, controle do ciclo celular, diferenciação e apoptose (Sies, 2017). A produção de EROs, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, está relacionada às condições ambientais às quais os ovócitos e embriões são expostos (Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Agarwal et al., 2008).

As EROs são eletronicamente instáveis e reativas com diversos compostos próximos, podendo gerar diferentes consequências dependendo de sua interação com agentes oxidantes ou redutores. A mitocôndria é o principal local de produção de EROs, por meio da respiração celular que envolve o oxigênio (O_2). A alta reatividade do O_2 , devido à sua configuração eletrônica, faz com que ele seja um dos principais geradores de radicais livres, como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) como representadas na Figura 1. Esse processo ocorre durante o metabolismo aeróbico, onde o O_2 , destinado a esse processo, interage com outras moléculas da cadeia transportadora de elétrons, tanto nos processos mitocondriais quanto no retículo endoplasmático, formando radicais livres como a hidroxila. O radical peróxido de hidrogênio e o radical superóxido também possuem natureza citotóxica, pois grande parte deles é convertido em radical hidroxila (Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Agarwal et al., 2008).

As EROs participam de diversos processos fisiológicos, como sinalização celular, regeneração tecidual, foliculogênese, esteroidogênese ovariana, maturação ovocitária, ovulação, formação e funcionamento dos corpos lúteos, luteólise, desenvolvimento embrionário, implantação embrionária, manutenção da gestação e início do parto. No entanto, quando produzidos em excesso, podem causar alterações e morte celular (Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Agarwal et al., 2008, 2012).



Figura 1. Imagens ilustrativa das espécies reativas de oxigênio mais comuns presentes no meio biológico, Hidroxila (OH^\cdot), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e Superóxido (O_2^-).

2.3.2. Efeito das espécies reativas de oxigênio

Em nível molecular, as EROs promovem a oxidação de lipídios, proteínas e DNA. A peroxidação lipídica leva à formação de compostos tóxicos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE), que afetam a fluidez e integridade de membranas celulares e organelas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático. Aminoácidos sulfurados, como

cisteína e metionina, são oxidados, resultando em carbonilação, agregação e perda funcional de proteínas. No DNA, radicais hidroxila induzem quebras de fita e oxidação de bases, como a formação de 8-oxo-guanina, que pode provocar mutações e ativar mecanismos de apoptose, especialmente no DNA mitocondrial. Esses danos oxidativos também afetam processos epigenéticos, interferindo na metilação do DNA e na modificação de histonas, o que compromete a abundância relativa de mRNA durante o desenvolvimento embrionário e pode ter efeitos duradouros sobre o fenótipo pós-natal (Ferreira; Matsubara, 1997; Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Agarwal et al., 2008, 2012; Sies, 2017; Deluao et al., 2022).

Em nível celular, a presença excessiva de EROs altera profundamente a fisiologia e a estrutura das células. Um dos primeiros alvos do estresse oxidativo é a membrana plasmática, cuja integridade é comprometida pela oxidação dos fosfolipídios que a compõem. Isso leva à perda de seletividade da membrana, dificultando o controle do ambiente intracelular e permitindo assim a entrada descontrolada de íons e outras moléculas, prejudicando o equilíbrio osmótico e a homeostase da célula (Ferreira; Matsubara, 1997; Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Agarwal et al., 2008, 2012; Sies, 2017; Deluao et al., 2022).

Outro efeito importante das EROs ocorre sobre as mitocôndrias, que além de serem uma das principais fontes de EROs, também são altamente sensíveis ao seu acúmulo. Em situações de estresse oxidativo, a membrana mitocondrial sofre despolarização, comprometendo a produção de ATP. A célula entra então em déficit energético, o que afeta processos fundamentais como o transporte ativo, contração do citoesqueleto e divisão celular. Em células reprodutivas, como ovócitos e embriões, esse comprometimento mitocondrial está diretamente associado à perda de competência dos gametas para o desenvolvimento embrionário seguinte (Ferreira; Matsubara, 1997; Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Agarwal et al., 2008, 2012; Sies, 2017; Deluao et al., 2022).

A exposição prolongada a altos níveis de EROs pode ainda desencadear mecanismos celulares de autodegradação, como a autofagia ou, em casos mais graves, a apoptose. A célula percebe o dano como irreversível e ativa rotas de morte programada como forma de evitar a propagação de danos para células vizinhas. Isso leva à fragmentação celular, formação de corpos apoptóticos e perda funcional do tecido. Em sistemas de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo pode comprometer a morfologia e a viabilidade embrionária, resultando em blastômeros fragmentados, vacuolização excessiva e falhas no processo de compactação

(Ferreira; Matsubara, 1997; Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Agarwal et al., 2008, 2012; Sies, 2017; Deluao et al., 2022).

Por fim, as EROs comprometem a comunicação entre células, principalmente em estruturas que dependem de conexões gap-junctions, como as células do cumulus ao redor do ovócito. O acúmulo de EROs pode causar desorganização dessas conexões e interromper o fluxo de nutrientes e sinais regulatórios, o que prejudica o suporte ao ovócito em maturação ou ao embrião em desenvolvimento inicial. Dessa forma, mesmo sem causar morte celular imediata, as EROs podem deteriorar funções essenciais para o sucesso (Ferreira; Matsubara, 1997; Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Agarwal et al., 2008, 2012; Sies, 2017; Deluao et al., 2022).

2.4. Alternativas para minimizar o estresse oxidativo

Para reduzir a produção de EROs e, conseqüentemente, o estresse oxidativo, as células contam com sistemas antioxidantes naturais. No entanto, em condições *in vitro*, estratégias externas como o controle da tensão de oxigênio durante o cultivo embrionário e a adição de antioxidantes aos meios têm sido amplamente utilizadas para mitigar esses efeitos e preservar a qualidade embrionária (Kitagawa et al., 2004; Ferré et al., 2020b).

2.4.1. Atmosfera gasosa

Altas concentrações de O₂ elevam a produção de EROs, provocando peroxidação lipídica, danos ao DNA e apoptose, o que reduz as taxas de clivagem e de blastocisto (Yuan et al., 2003). Portanto, controlar a tensão de O₂ é crucial para preservar o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Embora a maioria dos laboratórios ainda utilize atmosfera convencional (20 % O₂), a utilização de sistemas hipóxicos (5% de O₂) tem se tornado cada vez mais comum, por mimetizarem as condições fisiológicas da tuba uterina e do útero, reduzirem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), minimizarem o estresse oxidativo e resultando em embriões de melhor qualidade (Yuan et al., 2003; Pereira et al., 2010; El-Sanea et al., 2021).

Estudos recentes reforçam os benefícios da baixa tensão de oxigênio ao longo das diferentes etapas da PIVE. Báez e colaboradores (2024) demonstraram que a manutenção de 5% de O₂ durante todas as fases da PIVE, MIV, FIV e CIV, aumentou significativamente a taxa de blastocistos (de 32% para 45%), além de melhorar a viabilidade após vitrificação. Os blastocistos cultivados em 5% de O₂ apresentaram maior número de células (125 ± 10) do que os expostos a 20% de O₂ (100 ± 8), indicando melhor qualidade embrionária (Báez et al., 2024).

Além dos efeitos sobre o desenvolvimento e metabolismo, a tensão de oxigênio também impacta o controle epigenético inicial. Foi observado que a maturação de ovócitos em 5% de O₂ alterou significativamente os níveis de metilação global do DNA no pro-núcleo materno, em comparação ao grupo cultivado em 20% de O₂. Esses achados sugerem que a redução da tensão de oxigênio não apenas melhora os índices produtivos e a qualidade celular dos embriões, mas também influencia mecanismos epigenéticos importantes para o sucesso da PIVE (Bennemann; Grothmann; Wrenzycki, 2018).

Mais recentemente, estudos têm investigado a possibilidade de reduzir ainda mais a tensão de oxigênio, propondo condições de ultra hipóxia (<2% de O₂). Foi comparado normóxia (20%), hipóxia (5%) e ultra hipóxia, observando que a maior taxa de blastocistos (38%) foi obtida sob hipóxia, enquanto a normóxia e a ultra hipóxia resultaram em apenas 13% e 4,6%, respectivamente. Além disso, os embriões cultivados em hipóxia exibiram mais transcritos de genes relacionados à glicólise e ao metabolismo lipídico, refletindo um perfil metabólico mais próximo ao fisiológico. Esses resultados indicam que, embora a ultra hipóxia seja uma estratégia emergente, a hipóxia moderada (5% de O₂) ainda oferece o melhor equilíbrio entre desenvolvimento embrionário e qualidade celular (Boskovic et al., 2025).

2.4.2. Uso de antioxidantes

Os antioxidantes compreendem uma variedade de compostos, incluindo enzimas, aminoácidos, substratos energéticos e compostos fenólicos, e podem ser classificados em duas categorias principais: enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase, peroxirredoxinas e NADPH-quinona oxidoreductase, desempenham um papel fundamental no controle dos níveis de EROs dentro das células. Por outro lado, os antioxidantes não enzimáticos ajudam na proteção contra danos oxidativos por meio de inibição e eliminação de EROs, além de auxiliar na reparação de danos causados por oxidação (Deluao et al., 2022).

Para otimizar a eficácia da PIVE, é essencial selecionar antioxidantes que sejam estáveis, seguros e com baixa toxicidade para os ovócitos e embriões (Agarwal; Gupta; Sharma, 2005). Além disso, a suplementação com antioxidantes pode melhorar as taxas de sobrevivência dos embriões após a criopreservação, especialmente em estágios avançados como blastocistos (BL) e blastocistos expandidos (BX) (Madrid Gaviria et al., 2019; Ishii et al., 2024).

Como os ovócitos e embriões produzidos *in vitro* não possuem mecanismos de defesa tão eficientes quanto no ambiente *in vivo*, os antioxidantes desempenham um papel crucial na proteção contra o estresse oxidativo. Entre os antioxidantes frequentemente utilizados estão a hipotaurina (Guérin; Guillaud; Ménézo, 1995), glutathiona (Magata et al., 2021), cisteamina (De Matos et al., 2002), ITS (Dos Santos Mendonça-Soares et al., 2022), ácido ascórbico (Torres et al., 2019), melatonina e compostos naturais, que têm mostrado resultados benéficos consistentes na melhoria da qualidade dos embriões (Kitagawa et al., 2004; Rocha-Frigoni et al., 2015; Fidelis et al., 2020).

A hipotaurina é gerada pela oxidação da cisteamina pela radical hidroxila e atua na neutralização das EROs, convertendo-se rapidamente em taurina. Além de atuar como sequestradora de EROs, a hipotaurina tem demonstrado benefícios na melhoria das taxas de blastocistos em bovinos (Manjunatha et al., 2009). Além disso, observaram que a inclusão de hipotaurina nos meios de fecundação *in vitro* pode aumentar as taxas de produção de embriões bovinos (Guérin; Guillaud; Ménézo, 1995).

A glutathiona, um tri-peptídeo não proteico composto por glutamina, cisteína e glicina, é encontrada nas células dos mamíferos e desempenha diversas funções essenciais. Ela atua como um reservatório natural de cisteína, regula a síntese de proteínas, remove compostos tóxicos das células e está envolvida na produção de leucotrienos. Além disso, a glutathiona participa do metabolismo do ácido ascórbico, das comunicações intercelulares e do transporte intracelular de cobre. A presença de glutathiona reduzida (GSH) é crucial tanto *in vitro* quanto *in vivo* para o desenvolvimento ovocitário e embrionário, uma vez que ajuda a reduzir os efeitos citotóxicos das EROs. A glutathiona existe principalmente na forma reduzida e na forma oxidada (GSSG), sendo a forma reduzida a predominante. Seus efeitos durante a maturação e cultivo *in vitro* diminuí os efeitos citotóxicos das EROs e melhora a produção de embriões bovinos (Luvoni; Keskinetepe; Brackett, 1996; De Matos; Furnus, 2000; Li et al., 2014).

A cisteamina é um antioxidante importante que reduz EROs, como o radical hidroxila. Ela também facilita a conversão da glutathiona oxidada em glutathiona reduzida, aumentando seus níveis, conseqüentemente, a disponibilidade de cisteína, um aminoácido essencial para a produção de glutathiona (Lott et al., 2011). Quando a cisteamina é oxidada pelo radical hidroxila, ela se transforma em hipotaurina. Assim, a inclusão de cisteamina nos meios da PIVE pode melhorar as taxas de desenvolvimento e a qualidade dos embriões, promovendo a produção de glutathiona e, portanto, beneficiando a maturação e o cultivo *in vitro* de embriões bovinos. O uso

de cisteamina durante a maturação e cultivo *in vitro* resultou em melhorias significativas nas taxas de blastocistos e na qualidade embrionária (De Matos; Furnus, 2000; De Matos et al., 2002; Merton et al., 2013).

Sobre os efeitos do ITS e do ácido fólico a suplementação com ITS mostrou-se particularmente promissora em cultivo individual. O ITS resultou em taxas de clivagem e blastocisto comparáveis às obtidas em cultivo em grupo (Dos Santos Mendonça-Soares et al., 2022). O efeito parece ser sinérgico: a insulina estimula o metabolismo energético e a proliferação celular; a transferrina fornece ferro de forma controlada, reduzindo estresse oxidativo; e o selênio atua como cofator de enzimas antioxidantes, protegendo o DNA embrionário. Quando avaliado durante a MIV, CIV ou em ambos os períodos, o ITS isolado não alterou significativamente as taxas de desenvolvimento em relação ao controle; contudo, sua combinação com ácido ascórbico (AA) nas 12h finais da MIV elevou tanto a quantidade quanto a qualidade dos blastocistos, sugerindo que o suporte metabólico suplementar pode ser mais efetivo em estágios tardios da maturação (Guimarães et al., 2016).

Por outro lado, o ácido fólico, não melhorou diretamente as taxas de desenvolvimento embrionário em cultivo individual, mas promoveu modificações no padrões de metilação do DNA, especialmente no gene IGF2, sugerindo um potencial efeito epigenético, ainda sem repercussão imediata sobre a morfologia ou a viabilidade embrionária (Dos Santos Mendonça-Soares et al., 2022).

O ácido ascórbico, é um antioxidante também utilizados na produção *in vitro* de embriões, mas apresenta resultados variáveis dependendo da forma e do momento de suplementação (Guimarães et al., 2016; Torres et al., 2019). Quando utilizado na forma de complexo com ciclodextrina (AA-CD), demonstrou efeitos positivos sobre o metabolismo lipídico embrionário afetando a abundância relativa de mRNA de genes lipogênicos e os níveis de ácidos graxos insaturados, sugerindo melhorar a qualidade embrionária. Esses achados indicam que o ácido ascórbico pode ser uma ferramenta útil não apenas por sua ação antioxidante, mas também por influenciar vias metabólicas importantes durante o desenvolvimento embrionário (Torres et al., 2019).

Além dos antioxidantes mais comuns outros compostos com ação antioxidante têm mostrado potencial na PIVE, já foi demonstrado que o extrato etanólico de folhas do Cerrado, adicionado ao cultivo *in vitro*, aumentou as taxas de clivagem (79,8% vs. 70,2% no controle), blastocisto

(38,4% vs. 30,1% no controle) e, principalmente, a sobrevivência pós-descongelamento (72,5% vs. 58,3% no controle), além de reduzir a produção de EROs (Fidelis et al., 2020). Outros compostos naturais também têm sido testados com resultados promissores, tais como extrato de quercetina (Khadrawy et al., 2020) e resveratrol (Tonekam et al., 2025), reforçando o potencial do uso de antioxidantes naturais para melhorar a qualidade embrionária e a criotolerância em sistemas *in vitro*.

A melatonina, tem se destacado como um antioxidante promissor na PIVE, e age diretamente na neutralização de EROs e, indiretamente, na regulação da atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Sua suplementação tem sido associada ao aumento das taxas de clivagem e blastocisto, à melhora da qualidade embrionária e à regulação de genes relacionados ao estresse oxidativo e à apoptose (Cruz et al., 2014; Wang et al., 2014b).

2.5. Uso da melatonina

A melatonina é um hormônio sintetizado principalmente pela glândula pineal, mas também por órgãos periféricos, como medula óssea, linfócitos, olhos e trato gastrointestinal (Reiter, 1991). Derivada do triptofano, sua estrutura lipofílica permite atravessar membranas celulares com facilidade, desempenhando múltiplas funções, destacando-se como reguladora do ciclo circadiano e potente antioxidante (Reiter, 1991).

Além de seu papel como regulador do ritmo circadiano, a melatonina é um antioxidante não enzimático que atua como um sequestrador de EROs, protegendo proteínas, lipídios e DNA do dano oxidativo. Ela neutraliza radicais como OH⁻, O₂⁻ e H₂O₂, sem gerar subprodutos nocivos, e ainda origina metabólitos antioxidantes secundários como AFMK (N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiamina) e AMK (N¹-acetil-5-metoxiquinuramina) (Tsantarliotou et al., 2007; Galano; Tan; Reiter, 2011). A melatonina também exerce efeitos antioxidantes indiretos, ao se ligar a seus receptores de membrana e ativar a via de sinalização do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2). Esse cofator se liga a elementos de resposta antioxidante (ARE) em genes-alvo, como GSS (precursor da glutathione), SOD1 e CAT (Rodrigues-Cunha et al., 2016; Ahmadi; Ashrafizadeh, 2020).

Esses mecanismos conferem à melatonina a capacidade de reduzir os níveis intracelulares de EROs (Su et al., 2015; Tang et al., 2024; Zhang et al., 2025a), diminuir a peroxidação lipídica, evidenciada por menores concentrações de MDA (Tang et al., 2024) e aumentar os níveis de antioxidantes endógenos, como a GSH e a SOD (Lavrentiadou et al., 2023; Tang et al., 2024). Esses efeitos estão associados à ativação da via Nrf2-Keap1 (Tang et al., 2024; Zhang et al., 2025a) e à indução da expressão de genes como HO-1, CAT, GPx e NQO1 (Silva et al., 2024).

A melatonina contribui significativamente para a preservação da integridade mitocondrial e celular de ovócitos (Tutt et al., 2023; Zhang et al., 2025a). Em ovócitos expostos a agentes estressores, como o β -hidroxibutirato, a melatonina preserva o potencial de membrana mitocondrial, reduz a abundância relativa de mRNA de caspase-3 e protege contra a apoptose precoce (Islam et al., 2025; Zhang et al., 2025a). Efeitos semelhantes foram observados em células do cumulus e de Sertoli, onde a melatonina atuou como protetora frente a danos oxidativos induzidos por peróxido de hidrogênio (Tang et al., 2024; Islam et al., 2025).

Adicionalmente, a melatonina auxilia na manutenção da comunicação entre ovócitos e células do cúmulo, preservando as junções gap e reduzindo a apoptose nessas células, o que assegura suporte adequado ao ovócito durante o cultivo *in vitro* (Islam et al., 2025). Em tecidos ovarianos bovinos cultivados *in vitro*, a melatonina estimula a ativação de folículos primordiais e aumenta a deposição de colágeno na matriz extracelular, por mecanismos mediados por seus receptores e pela via mTORC1 (Silva et al., 2024).

A melatonina também tem sido recentemente associada à regulação do metabolismo lipídico em ovócitos, especialmente por meio da regulação de enzimas-chave envolvidas na lipólise e na β -oxidação de ácidos graxos. Esse efeito parece ser mediado pela ativação do receptor MT2, um GPCR acoplado à proteína Gi, cuja sinalização inibe a adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMPc intracelular e, por consequência, a atividade da PKA. A queda no AMPc desencadeia alterações em cascatas de sinalização celular, podendo ativar vias como MAPK e PI3K/Akt, que influenciam diretamente a homeostase lipídica e a sobrevivência celular. Dessa forma, a melatonina contribui para a diminuição do acúmulo lipídico em ovócitos e células do cúmulo, favorecendo o uso dos lipídios como fonte energética (Jin et al., 2017, 2022; Vasconcelos et al., 2024).

A suplementação com melatonina (10^{-9} M) na MIV de suínos diminuiu significativamente o conteúdo de triglicerídeos nos ovócitos e os níveis de espécies reativas de oxigênio, aumentou

a taxa de clivagem e blastocistos (Jin et al., 2017). Posteriormente, o mesmo grupo, visualizou que a suplementação da melatonina proporcionou menor mobilização de lipídios e com o bloqueio dos receptores de melatonina (MT1 e MT2) as taxas de desenvolvimento embrionário foram menor que o controle reforçando seu papel na regulação do metabolismo lipídico e maturação ovocitária (Jin et al., 2022). Já o estudo (He et al., 2018) observou que a suplementação da melatonina na MIV em suínos aumentou o acúmulo de gotículas lipídicas, favoreceu a organização do fuso e o alinhamento cromossômico, além de melhorar as taxas de clivagem e desenvolvimento de blastocistos.

Outra ação da melatonina é atividade mitocondrial e na formação de novas mitocôndrias principalmente se deve por sua capacidade antioxidante e reguladora do metabolismo celular. A melatonina é capaz de atravessar facilmente as membranas celulares e se acumular nas mitocôndrias, onde neutraliza as EROs geradas durante o metabolismo mitocondrial, reduzindo o estresse oxidativo e protegendo a integridade das organelas. Além disso, a melatonina melhora a eficiência da cadeia transportadora de elétrons, evitando o desacoplamento do complexo IV, o que contribui para a manutenção do potencial de membrana mitocondrial e para a produção adequada de ATP. Ela também estimula a expressão de enzimas antioxidantes mitocondriais, como a superóxido dismutase (SOD2), com a mediação da sirtuína 3 (SIRT3), promovendo a biogênese mitocondrial e a homeostase energética. Esses efeitos combinados resultam em maior atividade mitocondrial, melhor qualidade do ovócito e maior competência para a maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro* (Izyumov et al., 2010; He et al., 2018).

Recentemente, a melatonina tem despertado interesse não apenas por seu papel antioxidante e seus diversos benefícios, mas também por sua influência sobre mecanismos epigenéticos durante o desenvolvimento embrionário. Entre esses mecanismos, a metilação do DNA destaca-se como um dos mais amplamente conhecidos e investigados. Trata-se da adição de um grupo metil ao quinto átomo de carbono da citosina no DNA, processo fundamental para o funcionamento do organismo. Sob condições fisiológicas, os padrões de metilação são específicos e controlados para cada tecido, sendo conduzidos pelas DNA metiltransferases (DNMTs). Existem dois principais tipos de metilação do DNA: a metilação de manutenção, realizada pela DNMT1, e a metilação *de novo*, conduzida pelas DNMT3A e DNMT3B. Regiões promotoras de genes ativos geralmente apresentam baixos níveis de metilação, enquanto genes

silenciados apresentam níveis elevados. (Jones et al., 1998; Okano et al., 1999; Wu; Zhang, 2014; Mendonça et al., 2015; Menezo et al., 2016).

Estudos demonstram que a melatonina regula a expressão de enzimas fundamentais envolvidas na metilação e desmetilação do DNA, como as DNMTs e as TET dioxygenases (Linowiecka et al., 2023). Essa ação contribui para a preservação da integridade epigenética de embriões cultivados *in vitro*, minimizando alterações indesejadas nos padrões de abundância relativa de mRNA que poderiam comprometer sua viabilidade e desenvolvimento (Linowiecka et al., 2023). Em ovócitos bovinos, a melatonina promoveu modificações epigenéticas necessárias, como o aumento da acetilação global de H3K9 e a redução da metilação dessa mesma de histonas, sem afetar significativamente a metilação global do DNA (Tutt et al., 2023).

Em embriões clonados suínos, a melatonina no meio de cultivo também demonstrou capacidade de favorecer a reprogramação epigenética correta, favorecendo a desmetilação do gene de pluripotência Oct4, mantendo a metilação de genes imprinted (H19/Igf2) e promovendo a remetilação de genes específicos de tecido, como Thy1. Adicionalmente, genes relacionados à ativação do genoma zigótico (Eif1a), pluripotência (Oct4, Nanog, Sox2), imprinting (Igf2, H19) e qualidade embrionária (Cdx2, ATP1b1) foram significativamente regulados positivamente, enquanto genes de diferenciação precoce (Thy1, Col5a2) foram silenciados (Liang et al., 2017). Além disso, em embriões clonados suínos, a melatonina favoreceu a formação do pseudo-pronúcleo (Liang et al., 2017), aumentou a taxa de desenvolvimento embrionário bovino e suíno antes da ativação do genoma zigótico e reduziu o bloqueio do desenvolvimento (Su et al., 2015; Liang et al., 2017). Também melhora a qualidade dos blastocistos clonados, aumentando o número total de células (Su et al., 2015; Liang et al., 2017).

No sistema de PIVE bovinos, a suplementação de melatonina durante a MIV demonstrou melhorar a maturação do ovócito, as taxas de clivagem e blastocistos, aumentar os níveis de glutathiona e melhorar a função mitocondrial, reduzindo o acúmulo de EROs (Tian et al., 2014; Marques et al., 2018; Hao et al., 2021). Benefícios semelhantes foram observados em modelos suínos, onde a melatonina também na MIV melhora a expansão do cumulus, a qualidade do ovócito, o rendimento do blastocisto e também a diminuição dos níveis de EROs e apoptose (Do et al., 2015; Rodrigues-Cunha et al., 2016; Lee et al., 2018). Como em modelos murinos, a melatonina durante a MIV também diminui os níveis de EROs, resultando em melhor qualidade embrionária e resultados de desenvolvimento (Bahadori et al., 2013; Yang et al., 2021). É importante ressaltar que os efeitos benéficos da melatonina vão além da maturação,

pois sua adição ao meio CIV tem sido associada a melhores taxas de clivagem, blastocisto e eclosão, níveis elevados de glutatona e distribuição mitocondrial necessária em várias espécies (Wang et al., 2014a, 2014b; Yang et al., 2017; Pang et al., 2019). Essas descobertas apoiam o potencial da melatonina para influenciar positivamente vários estágios do desenvolvimento embrionário.

Em cultivo *in vitro*, a melatonina também tem mostrado maior criotolerância e sobrevivência dos embriões após o descongelamento (Kuwayama et al., 2005; Wang et al., 2014b; Fidelis et al., 2020; Feuchard et al., 2025; Salek et al., 2025). Os benefícios da melatonina na criopreservação de gametas também já foram extensivamente demonstrados em várias espécies. Seu efeito antioxidante está presente em processo de criopreservação reduzindo significativamente o estresse oxidativo em espermatozoides, ovócitos e embriões neste processo (Marques et al., 2021; Ji et al., 2023; Niu et al., 2024; Zhang et al., 2024). Essa ação contribui para a diminuição da apoptose (Marques et al., 2021; Zhang et al., 2024), protegendo as células contra danos estruturais e funcionais (Ji et al., 2023; Zhang et al., 2024). Esse efeito benéfico durante a criopreservação, tem sido relatada em ovócitos humanos aumentando as taxas de sobrevivência pós-descongelamento, maior desenvolvimento embrionário subsequente, e maiores taxas de implantação, e nascimentos (Zhang et al., 2024). No que se refere a criopreservação de embriões a melatonina influencia na abundância relativa de mRNA de genes envolvidos na defesa celular, como os antioxidantes (Marques et al., 2021) e os relacionados ao reparo de DNA (ex.: HIF1A, PARP1, XPA) (Ji et al., 2023) melhorando a resposta a criopreservação. Também regula positivamente vias importantes para a sinalização celular e sobrevivência embrionária, como Wnt, PI3K/AKT, MAPK, Ras, ErbB e sinalização por cálcio, importantes na reparação de danos pós criopreservação (Ji et al., 2023). Com isso aumenta a homeostase celular contra o estresse ambiental, melhorando taxas de desenvolvimento, qualidade embrionária, maior viabilidade após vitrificação e maior estabilidade no desenvolvimento (Marques et al., 2021).

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Ashok *et al.* Redox Considerations in Female Reproductive Function and Assisted Reproduction: From Molecular Mechanisms to Health Implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1375–1404, ago. 2008.
- AGARWAL, Ashok *et al.* The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 49, 2012.
- AGARWAL, Ashok; GUPTA, Sajal; SHARMA, Rakesh K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 28, dez. 2005.
- AHMADI, Zahra; ASHRAFIZADEH, Milad. Melatonin as a potential modulator of Nrf2. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 11–19, fev. 2020.
- ALEMU, Teshome Wondie *et al.* Oxidative and endoplasmic reticulum stress defense mechanisms of bovine granulosa cells exposed to heat stress. **Theriogenology**, v. 110, p. 130–141, abr. 2018.
- ARIAS, María Elena *et al.* Simple and Efficient Chemically Defined In Vitro Maturation and Embryo Culture System for Bovine Embryos. **Animals**, v. 12, n. 21, p. 3057, 7 nov. 2022.
- ARMSTRONG, D. T.; KOTARAS, P. J.; EARL, C. R. Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 3, p. 333, 1997.
- AUSTIN, Cr. Observations on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 581, 1951.
- BÁEZ, Francisco *et al.* Low oxygen tension during in vitro embryo production improves the yield, quality, and cryotolerance of bovine blastocysts. **Animal Science Journal**, v. 95, n. 1, p. e13941, jan. 2024.
- BAHADORI, Mohammad Hadi *et al.* Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo development in mice. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 11, n. 1, p. 11–18, jan. 2013.
- BALDASSARRE, Hernan. Laparoscopic Ovum Pick-Up Followed by In Vitro Embryo Production and Transfer in Assisted Breeding Programs for Ruminants. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 216, 17 jan. 2021.

BALDASSARRE, Hernan; BORDIGNON, Vilceu. Laparoscopic ovum pick-up for in vitro embryo production from dairy bovine and buffalo calves. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 191–196, 2018.

BARRETT, Perry; BOLBOREA, Matei. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 4, p. 376–388, maio 2012.

BENNEMANN, Johanna; GROTHMANN, Hanna; WRENZYCKI, Christine. Reduced oxygen concentration during in vitro oocyte maturation alters global DNA methylation in the maternal pronucleus of subsequent zygotes in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 85, n. 11, p. 849–857, nov. 2018.

BERNAL-ULLOA, Sandra Milena *et al.* Cyclic AMP Affects Oocyte Maturation and Embryo Development in Prepubertal and Adult Cattle. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0150264, 29 fev. 2016.

BLONDIN, Patrick *et al.* Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes I. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 38–43, 1 jan. 2002.

BOLLWEIN, H.; MALAMA, E. Review: Evaluation of bull fertility. Functional and molecular approaches. **animal**, v. 17, p. 100795, maio 2023.

BOSKOVIC, Nina *et al.* Oxygen level alters energy metabolism in bovine preimplantation embryos. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 11327, 2 abr. 2025.

BRACKETT, Benjamin G. *et al.* Normal Development Following In Vitro Fertilization in the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147–158, 1 ago. 1982.

CAIXETA, Ester Siqueira *et al.* Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655, 2009.

CAIXETA, Ester Siqueira; DODE, Margot Alves Nunes. AVALIAÇÕES DA COMPETÊNCIA OVOCITÁRIA EM BOVINOS. 2010.

CORDOVA, A. *et al.* Effects of EGF and melatonin on gene expression of cumulus cells and further *in vitro* embryo development in bovines. **Zygote**, v. 30, n. 5, p. 600–610, out. 2022.

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

CUELLAR, Camila J. *et al.* Interactions between type of culture medium and addition of serum on development and gene expression of bovine blastocysts produced in vitro. **Physiological Genomics**, v. 57, n. 4, p. 256–265, 1 abr. 2025.

CURRIN, Luke *et al.* The effect of age and length of gonadotropin stimulation on the in vitro embryo development of Holstein calf oocytes. **Theriogenology**, v. 104, p. 87–93, dez. 2017.

CURRIN, Luke; BALDASSARRE, Hernan; BORDIGNON, Vilceu. In Vitro Production of Embryos from Prepubertal Holstein Cattle and Mediterranean Water Buffalo: Problems, Progress and Potential. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2275, 1 ago. 2021.

DE LIMA, Camila Bruna *et al.* Dynamics of transcription is affected by oxygen tension and developmental speed during in vitro production of bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 59, n. 5, p. e14620, maio 2024.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 761–771, fev. 2000.

DE OLIVEIRA LEME, Ligiane *et al.* Reduction of nutrients concentration in culture medium has no effect on bovine embryo production, pregnancy and birth rates. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 4839, 9 fev. 2025.

DE TOLEDO, Ricardo Braz *et al.* Effect of food supplementation on *in vitro* embryo production and growth performance in prepubertal Nelore heifers. **Animal Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 5087–5096, 11 dez. 2023.

DEL COLLADO, Maite *et al.* Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 11, p. 1721, 2016.

DELUAO, Joshua C. *et al.* OXIDATIVE STRESS AND REPRODUCTIVE FUNCTION: Reactive oxygen species in the mammalian pre-implantation embryo. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 164, n. 6, p. F95–F108, 1 dez. 2022.

DO, L. T. K. *et al.* Melatonin Supplementation During In Vitro Maturation and Development Supports the Development of Porcine Embryos. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 50, n. 6, p. 1054–1058, dez. 2015.

DOS SANTOS MENDONÇA-SOARES, Anelise *et al.* The use of insulin-transferrin-selenium (ITS), and folic acid on individual in vitro embryo culture systems in cattle. **Theriogenology**, v. 184, p. 153–161, maio 2022.

DUBY, R. T. *et al.* Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 121–130, jan. 1996.

EALY, Alan D.; WOOLDRIDGE, Lydia K.; MCCOSKI, Sarah R. BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 6, p. 2555–2568, 30 maio 2019.

EGASHIRA, Junki *et al.* Efficient *in vitro* embryo production using *in vivo*-matured oocytes from superstimulated Japanese Black cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 65, n. 2, p. 183–190, 2019.

EL-SANEA, Amro M. *et al.* Effect of oxygen tension and antioxidants on the developmental competence of buffalo oocytes cultured in vitro. **Veterinary World**, v. 14, n. 1, p. 78–84, 2021.

- FANG, Yi *et al.* Global DNA methylation and related mRNA profiles in sheep oocytes and early embryos derived from pre-pubertal and adult donors. **Animal Reproduction Science**, v. 164, p. 144–151, jan. 2016.
- FARIA, O. A. C. *et al.* Maturation system affects lipid accumulation in bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 33, n. 5, p. 372, 2021.
- FENG, Xiaoyi *et al.* Heat-Stress Impacts on Developing Bovine Oocytes: Unraveling Epigenetic Changes, Oxidative Stress, and Developmental Resilience. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 9, p. 4808, 28 abr. 2024.
- FERNANDES, C. A. C. *et al.* Short communication: Does previous superovulation affect fertility in dairy heifers? **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 11, p. 10862–10866, nov. 2020.
- FERRÉ, L. B. *et al.* Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14, n. 5, p. 991–1004, 2020a.
- FERRÉ, Luis B. *et al.* Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 6, p. 659–676, jun. 2020b.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, mar. 1997.
- FEUCHARD, Viviane Luzia Da Silva *et al.* Reactive oxygen species attenuation improves the quality of vitrified-warmed bovine embryos. **Animal Reproduction**, v. 22, n. 1, p. e20240035, 2025.
- FIDELIS, Andrei. **Antioxidantes associados à pressão hidrostática sobre a viabilidade embrionária pós desvitrificação**. [S.l.]: Universidade Federal de Uberlândia, 5 fev. 2013.
- FIDELIS, Andrei Antonioni Guedes *et al.* Ethanolic Extract of Dried Leaves from the Cerrado Biome Increases the Cryotolerance of Bovine Embryos Produced In Vitro. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–16, 22 nov. 2020.
- GALANO, Annia; TAN, Dun Xian; REITER, Russel J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination: Melatonin as an antioxidant. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 1–16, ago. 2011.
- GUÉRIN, P.; GUILLAUD, J.; MÉNÉZO, Y. Andrology: Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro. **Human Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 866–872, abr. 1995.
- GUIMARÃES, A. L. S. *et al.* Effect of insulin–transferrin–selenium (ITS) and L -ascorbic acid (AA) during *in vitro* maturation on *in vitro* bovine embryo development. **Zygote**, v. 24, n. 6, p. 890–899, dez. 2016.
- GUTIÉRREZ-AÑEZ, Juan Carlos *et al.* Melatonin enhances in vitro developmental competence of cumulus-oocyte complexes collected by ovum pick-up in prepubertal and adult dairy cattle. **Theriogenology**, v. 161, p. 285–293, fev. 2021.

HANSEN, Peter J. Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted reproduction. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 497–507, 2019.

HAO, Tong *et al.* Melatonin improves the maturation and developmental ability of bovine oocytes by up-regulating GJA4 to enhance gap junction intercellular communication. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 33, n. 14, p. 760–771, nov. 2021.

HARL, Audra W. *et al.* Maturation of bovine cumulus oocyte complexes in follicular fluid with or without estradiol, progesterone or the combination affects cumulus cell expansion and blastocyst development. **PLOS One**, v. 20, n. 6, p. e0321266, 2 jun. 2025.

HE, Bin *et al.* Melatonin-induced increase of lipid droplets accumulation and in vitro maturation in porcine oocytes is mediated by mitochondrial quiescence. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 1, p. 302–312, jan. 2018.

HELD-HOELKER, Eva *et al.* Heat stress during maturation of bovine oocytes profoundly impacts the mitochondrial bioenergetic profile and causes endoplasmic reticulum stress in subsequent blastocysts. **Biology of Reproduction**, p. ioaf070, 30 mar. 2025.

HOLM, Peter; CALLESEN, Henrik. In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. **Reproduction Nutrition Development**, v. 38, n. 6, p. 579–594, 1998.

ISHII, Toshimichi *et al.* Carnosine supplementation in cryopreservation solution improved frozen-thawed bovine embryo viability. **Journal of Reproduction and Development**, v. 70, n. 5, p. 279–285, 2024.

ISHIZUKA, B. *et al.* The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. **Journal of Pineal Research**, v. 28, n. 1, p. 48–51, jan. 2000.

ISLAM, Md Nuronnabi *et al.* Melatonin improves the in vitro growth of bovine oocytes collected from early antral follicles by maintaining oocyte-cumulus cell communication. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 24, n. 1, p. e12629, jan. 2025.

IWATA, Hisataka. Age-associated events in bovine oocytes and possible countermeasures. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 15, n. 3, p. 155–164, jul. 2016.

IZYUMOV, D. S. *et al.* Mitochondria as source of reactive oxygen species under oxidative stress. Study with novel mitochondria-targeted antioxidants — the “Skulachev-ion” derivatives. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, n. 2, p. 123–129, fev. 2010.

Ji, Pengyun *et al.* Melatonin improves the vitrification of sheep morulae by modulating transcriptome. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1212047, 18 out. 2023.

JIN, Jun-Xue *et al.* Melatonin regulates lipid metabolism in porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 62, n. 2, p. e12388, mar. 2017.

JIN, Jun-Xue *et al.* Melatonin Regulates Lipid Metabolism in Porcine Cumulus–Oocyte Complexes via the Melatonin Receptor 2. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. 687, 31 mar. 2022.

JONES, Peter L. *et al.* Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nature Genetics**, v. 19, n. 2, p. 187–191, jun. 1998.

KARAMI SHABANKAREH, Hamed *et al.* In vitro developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 13, n. 10, p. 615–622, out. 2015.

KATZ-JAFFE, M. G. *et al.* Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 939–946, abr. 2009.

KEANE, Jessica A.; EALY, Alan 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**, v. 14, n. 2, p. 330, 21 jan. 2024.

KENDRICK, K. W. *et al.* Effects of Energy Balance on Hormones, Ovarian Activity, and Recovered Oocytes in Lactating Holstein Cows Using Transvaginal Follicular Aspiration. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1731–1741, ago. 1999.

KHADRAWY, Omar *et al.* Quercetin supports bovine preimplantation embryo development under oxidative stress condition via activation of the Nrf2 signalling pathway. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 10, p. 1275–1285, out. 2020.

KHAN, Adnan *et al.* Evaluation of heat stress effects on cellular and transcriptional adaptation of bovine granulosa cells. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 25, dez. 2020.

KITAGAWA, Yuichiro *et al.* Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1186–1197, out. 2004.

KOMNINO, Eliza Rossi *et al.* Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157561, 16 jun. 2016.

KORKMAZ, Ahmet; REITER, Russel J. Epigenetic regulation: a new research area for melatonin? **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 1, p. 41–44, jan. 2008.

KOYAMA, Keisuke *et al.* Estimation of the Optimal Timing of Fertilization for Embryo Development of *In Vitro*-Matured Bovine Oocytes Based on the Times of Nuclear Maturation and Sperm Penetration. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 5, p. 653–659, 2014.

KRISHER, Rebecca L.; HERRICK, Jason R. Bovine embryo production in vitro: evolution of culture media and commercial perspectives. **Animal Reproduction**, v. 21, n. 3, p. e20240051, 2024.

KUSSANO, Nayara Ribeiro; LEME, Ligiane De Oliveira; DODE, Margot Alves Nunes. Protein source in maturation media affects gene expression in cumulus cells and embryo development in cattle. **Animal Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 1247–1260, 1 ago. 2023.

KUWAYAMA, Masashige *et al.* Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, n. 3, p. 300–308, jan. 2005.

- LAVRENTIADOU, Sophia N. *et al.* Melatonin Protects Bovine Spermatozoa by Reinforcing Their Antioxidant Defenses. **Animals**, v. 13, n. 20, p. 3219, 15 out. 2023.
- LEE, Sanghoon *et al.* Synergistic effects of resveratrol and melatonin on in vitro maturation of porcine oocytes and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 114, p. 191–198, jul. 2018.
- LI, Xiao Xia *et al.* Glutathione and cysteine enhance porcine preimplantation embryo development in vitro after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 309–314, jan. 2014.
- LIANG, Shuang *et al.* Melatonin enhances the developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos by preventing DNA damage induced by oxidative stress. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11114, 11 set. 2017.
- LINOWIECKA, Kinga *et al.* Melatonin: A Potential Regulator of DNA Methylation. **Antioxidants**, v. 12, n. 6, p. 1155, 25 maio 2023.
- LONERGAN, Patrick; FAIR, Trudee. Maturation of Oocytes in Vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 255–268, 15 fev. 2016.
- LOTT, W. M. *et al.* Influence of cysteine in conjunction with growth factors on the development of in vitro-produced bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 46, n. 4, p. 585–594, ago. 2011.
- LUVONI, Gaia C.; KESKINTEPE, Levent; BRACKETT, Benjamin G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, n. 4, p. 437–443, abr. 1996.
- MADRID GAVIRIA, Stephania *et al.* Effect of resveratrol on vitrified in vitro produced bovine embryos: Recovering the initial quality. **Cryobiology**, v. 89, p. 42–50, ago. 2019.
- MAGATA, F. *et al.* Glutathione ethyl ester improved the age-induced decline in the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 167, p. 37–43, jun. 2021.
- MANJUNATHA, B. M. *et al.* Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 44, n. 1, p. 12–16, fev. 2009.
- MARQUES, Tc *et al.* Melatonin reduces apoptotic cells, SOD 2 and HSPB 1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 226–236, fev. 2018.
- MARQUES, Thaisa Campos *et al.* Blastocoel fluid removal and melatonin supplementation in the culture medium improve the viability of vitrified bovine embryos. **Theriogenology**, v. 160, p. 134–141, jan. 2021.
- MEHAISEN, Gamal M. K. *et al.* Antioxidant Capacity of Melatonin on Preimplantation Development of Fresh and Vitrified Rabbit Embryos: Morphological and Molecular Aspects. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139814, 6 out. 2015.

- MENDONÇA, Anelise Dos Santos *et al.* Characterization of the IGF2 Imprinted Gene Methylation Status in Bovine Oocytes during Folliculogenesis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0142072, 30 out. 2015.
- MENEZO, Yves J. R. *et al.* Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 33, n. 6, p. 668–683, dez. 2016.
- MERTON, J. S. *et al.* Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 365–371, set. 2013.
- MO, Luoyu *et al.* Factors Influencing the Maturation and Developmental Competence of Yak (*Bos grunniens*) Oocytes In Vitro. **Genes**, v. 14, n. 10, p. 1882, 27 set. 2023.
- MUN, Seong-Eun *et al.* Dual effect of fetal bovine serum on early development depends on stage-specific reactive oxygen species demands in pigs. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175427, 13 abr. 2017.
- NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1291–1301, abr. 2001.
- NARANJO-GÓMEZ, Juan Sebastian *et al.* Heat stress on cattle embryo: gene regulation and adaptation. **Heliyon**, v. 7, n. 3, p. e06570, mar. 2021.
- NICOLÁS, Ana Caroline Chaves Vall *et al.* Colony-stimulating factor 2 (CSF2) does not significantly affect cellular and molecular parameters, or blastocyst rates under in vitro culture conditions with reduced nutrient concentrations. **Theriogenology**, v. 243, p. 117464, set. 2025.
- NIU, Peng *et al.* Effects of melatonin on sperm quality, enzyme activity, antioxidant gene expression and fertility of cryopreserved bovine semen. **Theriogenology**, v. 226, p. 104–109, set. 2024.
- OKANO, M. *et al.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247–257, 29 out. 1999.
- PANG, S. F. *et al.* Neuroendocrinology of melatonin in reproduction: recent developments. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 14, n. 3–4, p. 157–166, jun. 1998.
- PEREIRA, Michele M. *et al.* Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 7, p. 1074, 2010.
- PONTELO, Thais Preisser *et al.* Histone deacetylase inhibitor during in vitro maturation decreases developmental capacity of bovine oocytes. **PLOS ONE**, v. 16, n. 3, p. e0247518, 5 mar. 2021.

PUJOL, Marc; LÓPEZ-BÉJAR, Manel; PARAMIO, Maria-Teresa. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 735–744, fev. 2004.

REITER, Russel J. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions*. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 2, p. 151–180, maio 1991.

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

ROCHA-FRIGONI, Nathália Alves De Souza *et al.* Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of *in vitro* culture. **Zygote**, v. 23, n. 2, p. 159–168, abr. 2015.

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

RODRIGUEZ-OSORIO, N. *et al.* Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 3, p. 283–288, out. 2007.

ROELEN, Bernard A. J. Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 98, 2020.

SALEK, Farzaneh *et al.* Factors Affecting the Success of Ovum Pick-Up, In Vitro Production and Cryopreservation of Embryos in Cattle. **Animals**, v. 15, n. 3, p. 344, 25 jan. 2025.

SANCHES, Bruno Valente *et al.* A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1147–1151, abr. 2016.

SENA-NETTO, Severino B. *et al.* The Replacement of Fetal Bovine Serum with Bovine Serum Albumin During Oocyte Maturation and Embryo Culture Does Not Improve Blastocyst Quality After Slow Freezing Cryopreservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, n. 3, p. 171–179, 1 jun. 2020.

SIES, Helmut. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, p. 613–619, abr. 2017.

SILVA, Bianca R. *et al.* Melatonin acts through different mechanisms to control oxidative stress and primordial follicle activation and survival during in vitro culture of bovine ovarian tissue. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 86, p. 106824, jan. 2024.

SJUNNESSON, Ylva. *In vitro* fertilisation in domestic mammals—a brief overview. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v. 125, n. 2, p. 68–76, 2 abr. 2020.

SMITH, Gary; MONTEIRO DA ROCHA, Andre. Advances in Embryo Culture Systems. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 30, n. 03, p. 214–221, jun. 2012.

SMITS, Myrthe A. J. *et al.* Human ovarian aging is characterized by oxidative damage and mitochondrial dysfunction. **Human Reproduction**, v. 38, n. 11, p. 2208–2220, 2 nov. 2023.

SOMFAI, Tamás *et al.* Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 7, p. 912, 2011.

SOTO-HERAS, Sandra; PARAMIO, Maria-Teresa. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 342–350, out. 2020.

SOTO-MORENO, Edgar Joel *et al.* Serum supplementation during bovine embryo culture affects their development and proliferation through macroautophagy and endoplasmic reticulum stress regulation. **PLOS ONE**, v. 16, n. 12, p. e0260123, 9 dez. 2021.

SOVERNIGO, Tc *et al.* Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 561–569, ago. 2017.

SPRÍCIGO, José Felipe W. *et al.* Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 2054–2062, nov. 2016.

STOJKOVIC, Miodrag *et al.* Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture1. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904–909, 1 mar. 2001.

SU, Jianmin *et al.* Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 4, p. 455–468, nov. 2015.

SUGIMURA, Satoshi *et al.* Follicular growth-stimulated cows provide favorable oocytes for producing cloned embryos. **Cellular Reprogramming**, v. 14, n. 1, p. 29–37, fev. 2012.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 948–952, 10 nov. 2015.

TANEJA, Maneesh *et al.* Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes In Vitro and In Vivo: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation1. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 206–213, 1 jan. 2000.

TANG, Ying *et al.* Melatonin Improves H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Sertoli Cells Through Nrf2-Keap1 Signaling Pathway. **Genes**, v. 15, n. 12, p. 1544, 28 nov. 2024.

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

TONEKAM, Kamolchanok *et al.* Resveratrol Supplementation in In Vitro Maturation and Culture Medium: Enhancing Blastocyst Viability After Vitrification. **Animal Science Journal**, v. 96, n. 1, p. e70061, jan. 2025.

TORRES, Viviana *et al.* Ascorbic acid–cyclodextrin complex alters the expression of genes associated with lipid metabolism in bovine in vitro produced embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 1, p. 55–62, jan. 2019.

- TORRES-JÚNIOR, J. R. De S. *et al.* Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 155–166, jan. 2008.
- TSANTARLIOTOU, M. P. *et al.* The effect of melatonin on bovine *in vitro* embryo development. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. sup1, p. 488–489, jan. 2007.
- TUTT, Desmond A. R. *et al.* Developmental, cytogenetic and epigenetic consequences of removing complex proteins and adding melatonin during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, p. 1280847, 23 out. 2023.
- VASCONCELOS, Erlandia M. *et al.* Impact of reducing lipid content during *in vitro* embryo production: A systematic review and meta-analysis. **Theriogenology**, v. 222, p. 31–44, jul. 2024.
- VIANA, J. H. M. *et al.* Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. 2012.
- VIANA, Joao Henrique Moreira. Development of the world farm animal embryo industry over the past 30 years. **Theriogenology**, v. 230, p. 151–156, dez. 2024a.
- VIANA, Joao HM. 2023 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. 2024b.
- WANG, Feng *et al.* Melatonin Improves the Quality of *In Vitro* Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93641, 2 abr. 2014.
- WRENZYCKI, C.; STINSHOFF, H. Maturation Environment and Impact on Subsequent Developmental Competence of Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. s1, p. 38–43, set. 2013.
- WU, Hao; ZHANG, Yi. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. **Cell**, v. 156, n. 1–2, p. 45–68, 16 jan. 2014.
- YANG, Jinyu *et al.* Melatonin promotes *in vitro* maturation of vitrified-warmed mouse GV oocytes potentially by modulating MAD2 protein expression of SAC component through MTRs. **Cryobiology**, v. 102, p. 82–91, out. 2021.
- YANG, Minghui *et al.* Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2059, 27 nov. 2017.
- YUAN, Y. Q. *et al.* Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1585–1596, abr. 2003.
- ZHANG, Chao *et al.* Melatonin application during cryopreservation improves the development and clinical outcomes of human vitrified–warmed oocytes. **Cryobiology**, v. 115, p. 104902, jun. 2024.

ZHANG, Jiawei; LUO, Haoshu. Development of Recombinant Follicle-Stimulating Hormone for the Superovulation of Cattle: A Review. **Veterinary Sciences**, v. 12, n. 3, p. 264, 12 mar. 2025.

ZHANG, Kaiyan *et al.* Melatonin protects bovine oocyte from β HB-induced oxidative stress through the Nrf2 pathway. **Theriogenology**, v. 234, p. 64–72, mar. 2025a.

ZHANG, Peipei *et al.* Supplementation of Forskolin and Linoleic Acid During IVC Improved the Developmental and Vitrification Efficiency of Bovine Embryos. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 9, p. 4151, 27 abr. 2025b.

CAPÍTULO II

**MELATONINA MELHORA A PRODUÇÃO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA BOVINA
POR VIAS ANTIOXIDANTES, LIPÍDICAS E EPIGENÉTICAS**

RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos da suplementação de melatonina durante a produção de embriões bovinos *in vitro* (PIVE), considerando seu impacto no desenvolvimento embrionário, estresse oxidativo, metabolismo lipídico, atividade mitocondrial, abundância relativa de mRNA, padrões específicos de metilação do DNA e criotolerância. Foram testados quatro tratamentos: Controle (sem melatonina), melatonina na maturação (MIV + Mlt), no cultivo (CIV + Mlt) ou em ambos (MIV /CIV+ Mlt). A melatonina melhorou significativamente a taxa de blastocisto em D7 e a cinética do desenvolvimento, reduziu os níveis de EROs e lipídios intracelulares e aumentou a atividade mitocondrial. Os efeitos mais significativos foram observados no grupo CIV + Mlt. Na análise de abundância relativa de mRNA, a melatonina modulou genes relacionados à resposta antioxidantes (SOD1, CAT, GSS) e à regulação epigenética (TET1, TET3, DNMT3A). Embora não tenha alterado a abundância relativa de mRNA de genes relacionados ao metabolismo lipídico, observou-se redução no conteúdo lipídico dos embriões. A análise dos padrões de metilação revelou hipometilação em regiões repetitivas do DNA (Satellite I e LINE-1), especialmente nos grupos tratados com melatonina. No entanto, não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto à criotolerância e às taxas de apoptose. Conclui-se que a melatonina exerce efeitos positivos multifatoriais, independentemente da fase em que é adicionada. Contudo, sua suplementação durante o CIV, promoveu os benefícios mais consistentes, evidenciando maior qualidade e potencial de uso nas técnicas reprodutivas.

Palavras-chave: bovino, estresse oxidativo, abundância relativa de mRNA, metilação, criopreservação

ABSTRACT

This study evaluated the effects of melatonin supplementation during bovine *in vitro* embryo production (IVEP), considering its impact on embryonic development, oxidative stress, lipid metabolism, mitochondrial activity, gene expression, specific DNA methylation patterns in repeat elements, and cryotolerance. Four treatments were tested: Control (without melatonin), melatonin at maturation (IVM + Mlt), culture (IVC + Mlt) or both (IVM/IVC + Mlt). Melatonin significantly improved blastocyst rate in D7, developmental kinetics, reduced EROs and intracellular lipid levels, and increased mitochondrial activity. The most significant effects were observed in the IVC + Mlt group. In gene expression, melatonin modulated antioxidant (SOD1, Cat, GSS), epigenetic (TET1, TET3, DNMT3A) genes, and although it did not alter lipid gene expression, it reduced lipid content. Methylation analysis showed patterns of hypomethylation in repetitive regions (Satellite I and LINE-1), and even more so in the melatonin-treated groups. However, no significant differences were observed between treatments in terms of cryotolerance and apoptosis rates. It is concluded that melatonin exerts positive multifactorial effects regardless of where it is used, however, when added to the IVC medium, it is visibly promoting more benefits to embryos by increasing the quality and potential for biotechnological use.

Keywords: bovine, oxidative stress, gene expression, methylation, cryopreservation.

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm demonstrado que embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIVE) apresentam menor capacidade de desenvolvimento quando comparados aos gerados *in vivo*. Essa redução na qualidade está principalmente associada a distúrbios na homeostase celular, possivelmente causados por desequilíbrios nos principais processos biológicos (Holm; Callesen, 1998; Rizos et al., 2002). Entre os diversos fatores envolvidos, o ambiente de cultivo exerce um papel crucial no desenvolvimento embrionário. Parâmetros como temperatura, concentração de oxigênio e composição do meio de cultivo devem refletir, o mais fielmente possível, as condições fisiológicas para promover o desenvolvimento adequado do embrião. Desvios desses parâmetros podem comprometer a viabilidade e a competência embrionária. Assim, o estabelecimento de sistemas de maturação *in vitro* (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV) que mimetizem com maior precisão o ambiente *in vivo* é fundamental para melhorar a eficiência e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (Ferré et al., 2020; Mo et al., 2023; Salek et al., 2025).

Dada a importância da suplementação com antioxidante nos meios utilizados na PIVE, diversos estudos têm investigado o uso de diferentes compostos durante a maturação e/ou cultivo embrionário, incluindo a quercetina (Khadrawy et al., 2020) ácido ascórbico (Guimarães et al., 2016), resveratrol (Sovernigo et al., 2017), cisteamina (Guimarães et al., 2016) e glutathione (De Matos; Furnus, 2000). Entre estes, a melatonina tem se destacado devido às suas potentes propriedades antioxidantes e por seus efeitos fisiológicos mais amplos (Tsantarliotou et al., 2007; Galano; Tan; Reiter, 2011). A melatonina (Mlt) (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio sintetizado pela glândula pineal em mamíferos que não apenas regula os ritmos circadianos, mas também desempenha papéis importantes na regulação imunológica, regulação metabólica e metabolismo lipídico (Reiter, 1991; Brzezinski, 1997; Pang et al., 1998).

O papel da melatonina no combate ao estresse oxidativo está bem documentado, pois reduz diretamente as EROs e aumenta indiretamente a produção de glutatona, minimizando os danos ao DNA e a apoptose (Rodriguez-Osorio et al., 2007; Barrett; Bolborea, 2012; Wang et al., 2014b; Do et al., 2015). Em sistemas de PIVE bovinos, a suplementação de melatonina durante a MIV tem demonstrado benefícios relevantes, como a redução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), o aumento dos níveis de glutatona, a melhora da função mitocondrial, a diminuição de apoptose e a elevação das taxas de clivagem e formação de blastocistos. Esses efeitos positivos foram observados em diferentes modelos, incluindo bovinos (Tian et al., 2014; Marques et al., 2018; Hao et al., 2021), suínos (Rodriguez-Osorio et al., 2007; Do et al., 2015; Lee et al., 2018) e murinos (Bahadori et al., 2013; Pang et al., 2019; Yang et al., 2021). Entretanto, os efeitos benéficos da melatonina vão além da maturação, pois sua adição ao meio CIV também tem sido associada a melhores taxas de clivagem, de blastocistos e eclosão, níveis elevados de glutatona e melhor distribuição mitocondrial em várias espécies (Wang et al., 2014a, 2014b; Yang et al., 2017). No geral, esses achados reforçam o papel da melatonina como agente protetor contra o estresse oxidativo e influenciando positivamente vários estágios do desenvolvimento embrionário.

Além de suas propriedades antioxidantes bem estabelecidas, a melatonina tem sido associada à regulação do metabolismo lipídico e mecanismos epigenéticos, particularmente em modelos murinos e suínos. Em suínos, a suplementação de melatonina durante a MIV reduziu o tamanho das gotículas lipídicas, aumentou os transcritos de genes relacionados à lipogênese e lipólise, juntamente com o aumento do conteúdo de ácidos graxos, atividade mitocondrial e níveis de ATP (Jin et al., 2017, 2022), reforçando seu papel multifacetado. Da mesma forma, estudos em embriões suínos produzidos por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) mostraram que a melatonina melhorou a eficiência da clonagem mediando a metilação do DNA, além de reduzir o estresse oxidativo e a apoptose (Liang et al., 2017; Qu et al., 2020). Em embriões de TNCS bovinos, a melatonina aumentou os níveis globais de acetilação de H3K9, melhorou a função mitocondrial e melhorou os resultados do desenvolvimento embrionário (Su et al., 2015). No entanto, em bovinos, os efeitos da melatonina sobre o conteúdo lipídico dos embriões seus desdobramentos na qualidade embrionária ainda são pouco compreendidos. Da mesma forma, sua atuação como mediadora de mecanismos epigenéticos, particularmente no que se refere à metilação do DNA, permanece pouco explorada nessa espécie, apesar da importância desses mecanismos na regulação do desenvolvimento e na viabilidade embrionária.

Além disso, embora os efeitos positivos tenham sido demonstrados quando a melatonina é adicionada durante a MIV ou CIV separadamente, o impacto da suplementação contínua ao longo de todo o processo de PIVE ainda não foi totalmente elucidado. Portanto, mais investigações são necessárias para esclarecer os mecanismos de ação da melatonina e definir a estratégia de suplementação mais eficaz para aprimorar os resultados da PIVE bovina.

Assim, este estudo teve como objetivo investigar se a suplementação contínua durante todo o processo de PIVE é mais eficaz do que sua aplicação pontual em etapas isoladas e, avaliar os efeitos da melatonina sobre o desenvolvimento e qualidade embrionária, o metabolismo lipídico e os mecanismos epigenéticos em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODO

Todos os reagentes utilizados neste estudo, exceto quando indicado, foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O material biológico foi obtido a partir de ovários coletados em abatedouros, e todos os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes estabelecidas pela Lei de Proteção Animal (nº 10.468, 2020).

Para avaliar os efeitos da melatonina, os ovócitos foram alocados em quatro grupos experimentais: (1) Controle (CT): maturação e cultivo sem melatonina; (2) MIV + Mlt: melatonina apenas no meio de maturação; (3) CIV + Mlt: melatonina apenas no meio de cultivo; e (4) MIV/CIV + Mlt: melatonina em ambos os meios. A concentração de melatonina utilizada foi de 10^{-9} M (Marques et al., 2018).

2.1. Coleta de Ovócitos Imaturos

Os ovários foram coletados em matadouros locais imediatamente após o abate e transportados para o laboratório em solução salina a 0,9% (NaCl 0,9%) suplementada com sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina G (100 UI/mL), a 32-36°C.

Complexos cumulus-ovócitos (CCOs) foram aspirados de folículos com diâmetros variando de 3 a 8 mm usando uma agulha hipodérmica de 18 G acoplada a uma seringa de 10 mL. Após a aspiração, o pellet contendo os ovócitos foi deixado decantar em tubo cônico por pelo menos 10 min. Em seguida, 10 mL do sobrenadante do fluido folicular foram centrifugados a $700 \times g$ por 5 min e utilizado para recuperação e seleção de CCOs. Apenas CCOs com três ou mais camadas de células do cumulus e um citoplasma uniforme, ou aqueles exibindo granulações finas, foram selecionados para os experimentos.

2.2. Produção *in vitro* de embriões

A PIVE foi realizada conforme descrito por (Kussano; Leme; Dode, 2023). Brevemente, após a seleção dos CCOs, grupos de 25-30 ovócitos foram transferidos para gotas de meio de maturação, cobertos com óleo mineral e cultivados por 22 a 24 horas. O meio de maturação *in vitro* consistiu em meio TCM-199 com sais de Earl (Gibco® BRL, Burlington, ON, Canadá), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 0,01 UI/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 0,1 mg/mL de L-glutamina, 0,075 mg/mL de amicacina, e 0,1 µM de cisteamina.

Após a maturação, os CCOs foram transferidos para gotas de meio de fecundação (Fert-TALP) cobertas com óleo mineral (Parrish; Krogenaes; Susko-Parrish, 1995). Para a fecundação, o sêmen de um touro Nelore (*Bos taurus indicus*) previamente testado foi processado usando um gradiente descontínuo de Percoll (GE® Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) (Machado et al., 2009). Os espermatozoides selecionados foram então adicionados à gota de fecundação na concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL e co-incubados com os ovócitos maturados por 18 a 20 horas. O dia da fecundação foi considerado como dia zero (D0). Após esse período, os possíveis zigotos foram parcialmente desnudados e transferidos para gotas de meio de cultivo SOF (fluido sintético de oviduto), conforme descrito por Holm et al. (1999), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, citrato de sódio (0,35 mM), mio-inositol (2,8 mM) e albumina sérica bovina (BSA, 4 mg/mL), sendo as gotas cobertas com óleo mineral. Todo o cultivo foi realizado a 38,5 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ e umidade controlada.

O impacto da suplementação de melatonina durante a MIV e/ou CIV na quantidade e qualidade dos embriões produzidos *in vitro* foi avaliado usando 5.806 ovócitos em 21 repetições. O desenvolvimento embrionário foi avaliado no dia 2 (D2) quanto à clivagem e nos dias 6 e 7 (D6 e D7) quanto à formação de blastocisto e cinética de desenvolvimento. Em D7, blastocistos expandidos foram usados para análises adicionais, incluindo abundância relativa de mRNA, perfil de metilação do DNA, coloração com H₂DCFDA, BODIPY 493/503, MitoTracker Deep Red e Hoechst 33342, bem como avaliação de criotolerância.

2.3. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio

Os níveis intracelulares de EROs em blastocistos expandidos foram quantificados usando diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) (Jin et al., 2022). H₂DCFDA foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenado como solução estoque. Para uso, H₂DCFDA foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 1% de BSA até uma concentração final de 50 µM. Os BX foram lavados três vezes em PBS-BSA e incubados em uma gota de 400 µL de H₂DCFDA por 30 min a 38,5°C no escuro. As avaliações subsequentes foram realizadas usando um microscópio de fluorescência (Zeiss® Axioplott). Para obter e quantificar as intensidades do sinal de fluorescência (pixels). Foi utilizado um comprimento de onda de 488 nm, com potência de excitação de 9,14% e emissão registrada na faixa entre 475 e 535 nm. As imagens fluorescentes obtidas foram analisadas por meio do software ImageJ® (National Institutes of Health, EUA).

2.4. Avaliação da atividade mitocondrial, acúmulo de gotículas lipídicas e contagem total de células

O procedimento foi realizado conforme descrito por (Faria et al., 2021) com pequenas modificações para aplicação em embriões bovinos. Os blastocistos expandidos foram lavados três vezes em PBS suplementado com polivinilpirrolidona (PVP) a 0,3% e incubados por 30 min com MitoTracker™ Deep Red FM (400 nM), diluído em SOF, a uma temperatura entre 35 e 37 °C. Em seguida, foram lavados três vezes em PBS-PVP, fixados por uma hora em paraformaldeído a 4%, lavados novamente três vezes em PBS-PVP e armazenados a 4 °C em paraformaldeído a 1% por até sete dias. Posteriormente, os embriões foram lavados três vezes em PBS-PVP e permeabilizados por 30 min em PBS contendo 0,2% de Triton X-100 à temperatura ambiente. Após nova lavagem tripla em PBS-PVP, os embriões foram corados com BODIPY™ 493/503 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) na concentração de 20 µg/mL, previamente diluído em 50 µL de etanol absoluto e, em seguida, em 950 µL de PBS, por uma hora. Após nova lavagem tripla em PBS-PVP, os embriões foram montados em placas de 35 mm, em gotas de 8 µL de PBS-PVP, e analisados em microscópio confocal Leica SP8 (New Orleans, LA, EUA)

Todas as amostras foram analisadas e fotografadas com uma objetiva de 20x, usando um laser de argônio a 488 nm e um espectro de fluorescência entre 495 e 505 nm para visualizar gotículas lipídicas. Para avaliação da atividade mitocondrial, foi utilizado um laser de 638 nm, com emissão/excitação a 644/665 nm. Os embriões foram submetidos a até 50 cortes transversais, espaçados de 4 μm . O empilhamento Z foi usado para criar uma imagem de seções sobrepostas. Para a atividade mitocondrial, foi utilizado o número médio de pixels. Para avaliação das gotículas lipídicas, após a criação da imagem final de cada embrião, a imagem foi ajustada para tons de cinza (imagem de 8 bits), e uma proporção da área lipídica (número de pixels) foi medida e dividida pela área total do embrião (μm^2). Ambas as avaliações foram realizadas por meio do software ImageJ (National Institutes of Health).

Após avaliação com Mito Tracker e BODIPY, os embriões foram lavados três vezes em PBS-PVP e corados com Hoechst 33342 (10 mg/mL) por 15 min no escuro, lavados três vezes novamente em PBS-PVP e montados em lâminas em gotas de 8 μL de PBS-PVP. O número total de células foi contado por microscopia de fluorescência (Zeiss® Axioplot).

2.5.RT-qPCR

Para quantificação da abundância relativa de mRNA, foram utilizados 4 pools de 25 D7 BX de cada tratamento. Os embriões foram então colocados em microtubos com 5 μL de PBS e armazenados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até a extração do RNA. A extração do RNA total dos blastocistos foi realizada usando o RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi então utilizado para síntese de cDNA com o GoScript Reverse Transcriptase Kit (Promega®, Madison, Wisconsin, EUA), com Oligo-dT (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e primers aleatórios (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em um volume final de 30 μL , seguindo as instruções do fabricante. As reações foram realizadas a $70\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, seguidas por uma etapa de anelamento de 5 min a $25\text{ }^\circ\text{C}$, uma extensão de 60 min a $42\text{ }^\circ\text{C}$ e inativação da enzima a $70\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. A qPCR foi realizada usando o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações de qPCR foram realizadas usando o GoTaq qPCR Master Mix Kit (Promega®). As eficiências dos primers foram calculadas usando diluições seriadas (1/4). Cada amostra foi analisada em triplicata, e a especificidade de cada amplicon foi determinada com base na análise da curva de dissociação e tamanho do amplicon em um gel de agarose. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μL usando cDNA

equivalente a 0,59 D7 BX/reação. As reações foram otimizadas para fornecer a máxima eficiência de amplificação para cada gene (Tabela 1). As condições de amplificação foram de 95 ° C por 1 min, seguido por 50 ciclos de desnaturação a 95 ° C por 15 s e anelamento e extensão a 60 ° C por 1 min, com dissociação (curva de fusão) a 60–95 ° C.

A nomenclatura, sequências e concentrações de primers, tamanhos de amplicons e números de acesso ao GenBank, eficiências de primer e temperatura de dissociação estão listados na Tabela 1. Genes relacionados à reprogramação epigenética [DNA metiltransferase 3 alfa (DNMT3A), DNA metiltransferase 3 beta (DNMT3B), Dioxygenase Ten-Eleven Translocation metilcitosina 1 (TET1), Dioxygenase Ten-Eleven Translocation metilcitosina 2 (TET2), Dioxygenase Ten-Eleven Translocation metilcitosina 3 (TET3)], estresse oxidativo [Superóxido dismutase 1 (SOD1), Glutathione sintetase (GSS), Catalase (CAT)], e metabolismo lipídico [Carnitina palmitoiltransferase 1A (CPT1A), Perilipina 2 (PLIN2), Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ)] foram analisados. O GAPDH foi selecionado como o gene de referência para normalização dos dados (Vandesompele et al., 2002). A abundância relativa de mRNA de cada gene foi calculada pelo método $\Delta\Delta C_t$ com correção de eficiência pelo método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Tabela 1. Informações dos primers utilizados para quantificação da abundância relativa de mRNA por qPCR, incluindo número de acesso no GenBank, seqüências dos primers, tamanho do amplicon (pares de bases), temperatura de dissociação, eficiência dos primers e valor médio de Ct.

| Genes | Seqüências | [] Primer (nM) | AS (bp) | GB | PF (%) | TM (°C) | CT Médio |
|---------------|--|-----------------------|---------|----------------|---------|------------|----------|
| DNMT3A | F: TTTCCAATGTGCCATGACAGCGAC R: GGGCCCACTCGATCATTTGTTTGT | 200 | 82 | NM_001206502.1 | 114.726 | 83 | 31.81 |
| DNMT3B | F: CAACAAGCAACCAGAGAATAAG R: CAACATCCGAAGCCATTTG | 200 | 161 | NM_181813.2 | 112.048 | 85 | 34.60 |
| TET1 | F: GTATGCTCCAGCTGCTTATC R: CCACTGTGCTCCCATTATTC | 200 | 167 | XM_015469834.1 | 108.166 | 84 | 30.81 |
| TET 2 | F: GTAGGGACATTTCTCCTTATTC R: CAGCTGCACTGTAGTTATGG | 200 | 157 | XM_010828077.2 | 105.302 | 81 | 34.73 |
| TET 3 | F: GTAACCCAGGTGATTCTGATAC R: CAGCAGCCTATCTGCTAATC | 200 | 200 | XM_015465317.1 | 101.853 | 81 | 34.39 |
| SOD 1 | F- GGGAGATACAGTCGTGGTAA R- CCAACATGCCTCTCTTCATC | 300 | 171 | NM_174615.2 | 105.63 | 82 | 30.90 |
| Catalase | F: GAATGAGGAGCAGAGGAAAC R: CTCCGACCCTCAGAGATTAG | 300 | 241 | NM_001035386.2 | 95.38 | 83 | 31.53 |
| GSS | F- GAGAGGGTGGAGGTAACAA R- TCTTTCCTCCCTGACATAG | 300 | 213 | NM_001015630.1 | 104.03 | 85 | 32.35 |
| CPT1A | F- GTTGCTGATGACGGCTATG R- CCCAGAAGTGCTAAGAGATTTAC | 300 | 199 | NM_001304989.2 | 101.59 | 83 | 31.24 |
| PLIN2 | F: CGGCTACGATGATACAGATG R: TGCGAAACACAGAGTAGATG | 300 | 200 | NM_173980.2 | 93.63 | 85 | 31.88 |
| PPAR γ | F- GTCAGTACTGTCGGTTTCAG R- CAGCGGGAAGGACTTTATG | 300 | 200 | NM_181024.2 | 100.152 | 85 | 34.77 |
| GAPDH | F: GGCCTGAACACGAGAAGTATAA R: CCCTCCACGATGCCAAAG T | 300 | 118 | NM_001034034.2 | 94.54 | 84 | 28.35 |

AS: Tamanhos de amplicon; GB: GenBank; PF: Eficiência do primer; F (para frente); R (reverso); pb (par de bases); TM (temperatura de dissociação).

2.6. Análise de metilação do DNA

A análise do perfil de metilação do DNA Satellite I e do LINE-1 foi realizada pela técnica de PCR bissulfito. Essas regiões foram selecionadas por representarem uma grande proporção do genoma eucariótico, pois são sequências altamente repetitivas e amplamente distribuídas por todo o genoma. Dessa forma, a metilação dessas regiões pode refletir padrões epigenéticos globais do DNA genômico (López-Flores; Garrido-Ramos, 2012).

Três pools de cinco D7 BX produzidos pelos tratamentos Controle, MIV + Mlt, CIV + Mlt e MIV/CIV + Mlt foram utilizados para análise de metilação do DNA. Primeiro, os embriões foram removidos do meio de cultivo e lavados três vezes com PBS livre de cálcio e magnésio. Os embriões foram então colocados em microtubos com 5 µL de PBS e armazenados a -80 °C até a extração do DNA genômico. O DNA genômico foi isolado dos blastocistos, conforme relatado anteriormente (Mendonça et al., 2015). As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C até uso posterior. Os primers foram desenhados para flanquear ilhas CpG nas sequências repetitivas de DNA do Satellite I e LINE-1. As sequências de primers, os números de acesso do GenBank, os números de CpG analisados e o tamanho do amplicon estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Primers para análise de metilação das regiões genômicas Satellite I e LINE-1.

| Região genômica | Sequência de primer (5'-3') | GenBank | CpG sites | Comprimento amplicon (bp) |
|--------------------|---|------------|-----------|---------------------------|
| Satellite I | F: TGTAGATTGGGGATAGGAGAGTTAG R: CCCCTACTTTATCTAAAAAAATTACCTT | AH001157.2 | 23 | 347 |
| LINE-1 | F: GGTAAATATTTGTTTGAGAAGGTG R: RTTCCCTCTATTATATCTTCTTCTATTAC | DQ000238.1 | 27 | 505 |

F (sentido); R (reverso); BP (par de bases).

As amostras de DNA foram tratadas com bissulfito de sódio usando o EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit (Zymo Research, Orange, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Amostras de DNA tratadas com bissulfito de sódio foram submetidas à amplificação por PCR em duplicata para cada amostra. A PCR foi realizada em um volume total de 20 µL compreendendo 1X tampão Taq, 1,5 e 1,0 mM de MgCl₂ (Satellite I e LINE-1, respectivamente), 0,4 mM dNTPs, 1U de Platinum™ Taq DNA Polimerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), 0,25 µM de cada primer (direto e reverso) e 2 µL de DNA tratado com bissulfito. A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguida de 45 ciclos a 94 °C por 45 s, 45 e 62 °C (Satellite I e LINE-1, respectivamente) por 40s e 72°C por 1min, terminando com uma extensão final a 72°C por 20min.

Após a PCR, os amplicons foram purificados a partir de géis de agarose usando o kit Wizard™ SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega™, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Amplicons purificados foram clonados no vetor de clonagem TOPO TA (sistema de vetor PCR 2.1-TOPO®, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e transferidos para células DH5α usando um protocolo de choque térmico. O DNA do plasmídeo foi isolado usando o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega™, Madison, WI, EUA) e os clones individuais foram sequenciados usando o sequenciamento do ciclo BigDye® e um sequenciador automatizado ABI3100.

A qualidade do eletroferograma foi analisada usando a análise de qualidade do eletroferograma (<http://lbi.cenargen.embrapa.br/phph/>) e os padrões de metilação foram processados usando a ferramenta de quantificação para análise de metilação (QUMA, <http://quma.cdb.riken.jp/top/index.html>) (Kumaki; Oda; Okano, 2008). As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de referência do GenBank (números de acesso mostrados na Tabela 2). Foram utilizadas apenas sequências originadas de clones com $\geq 90\%$ de identidade e conversão de citosina ($n = 348$: LINE-1: 188; Satellite I: 160). A conversão de citosinas não-CpG foi usada para calcular a eficiência do tratamento com bissulfito, e o padrão de metilação das citosinas CpG foi usado para identificar clones individuais de diferentes modelos de DNA. Assim, cada clone de DNA individual foi determinado por seu padrão de metilação e considerado como uma réplica. Em seguida, foi realizada uma análise comparativa de metilação de cada sítio individual de CpG entre os grupos de tratamento. Uma análise adicional também foi realizada para comparar o número de alelos hipometilados ($\leq 20\%$) e alelos hipermetilados ($\geq 80\%$) entre os tratamentos. Como a metilação de CpG de sítios específicos pode interferir na ligação de fatores de transcrição e, subsequentemente, afetar a abundância relativa de mRNA, o software TFBIND INPUT (<https://tfbind.hgc.jp/>) foi usado para identificar possíveis locais de ligação de fatores de transcrição nessas regiões.

2.7. Vitrificação e aquecimento de blastocistos expandidos

Com o objetivo de elucidar a viabilidade e a qualidade embrionária quanto à criotolerância dos embriões, a vitrificação foi realizada em cerca de 60 BX em D7 de cada tratamento, de acordo com o método Cryotop®, conforme descrito anteriormente (Kuwayama et al., 2005) com algumas modificações. As soluções de vitrificação e manuseio foram pré-aquecidas a 38°C

antes do uso. A solução de manutenção (SM) foi utilizada para manipular os embriões durante a vitrificação e também serviu de base para as soluções de vitrificação, constituídas por TCM-199 com sais de Hank, L-glutamina e HEPES 25 mM (Gibco® BRL, Burlington, ON, Canadá), suplementado com 20% de SFB.

Os embriões de cada tratamento foram expostos à solução de vitrificação 1 (SV1), também conhecida como solução de equilíbrio, contendo 7,5% de etilenoglicol (EG) e 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) dissolvidos em SM, por um período de 9 min. Posteriormente, foram transferidos para a solução de vitrificação 2 (SV2), ou a solução final de vitrificação, composta por 15% de EG, 15% de DMSO e 0,5 M de sacarose diluída em SM, por 45 s.

Um grupo de até 5 embriões foi posicionado em um dispositivo de vitrificação (WTA - Soluções para Reprodução Animal, Cravinhos, SP, Brasil), e todo o excesso de solução de vitrificação foi removido até restar apenas uma fina camada inferior a 0,1 µL. Por fim, o dispositivo contendo os embriões foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido (N₂).

O processo de aquecimento e reidratação dos embriões foi realizado a uma temperatura controlada de 38,5°C., e imediatamente imersos na primeira solução de descongelamento (SD1), contendo 1 M de sacarose diluída em SM, onde permaneceram por 1 min. Em seguida, foram transferidos para a segunda solução de descongelamento (SD2), contendo 0,5 M de sacarose diluída em SM, onde permaneceram por 3 min. Em seguida, os embriões foram transferidos para o SM e mantidos por no mínimo 5 min e no máximo 10 min até serem transferidos de volta para a gota de cultivo correspondente ao grupo experimental, e foram cultivados por mais 24 h. A reexpansão, a eclosão e a degeneração foram avaliadas 12 e 24 h após o descongelamento. Para cada dia de aquecimento e avaliação, um novo grupo controle (Controle Fresco), não submetido ao processo de vitrificação e no mesmo estágio de desenvolvimento dos embriões vitrificados, foi incluído em todas as avaliações.

2.8. Número total e porcentagem de células apoptóticas

Após 24 h de descongelamento, os blastocistos reexpandidos foram analisados quanto ao número total e apoptótico de células (Fidelis et al., 2020). Embriões frescos foram usados como controle dos embriões vitrificados. Para a marcação foi utilizado o kit Click-iT® TUNEL Alexa Fluor®, com controle positivo (DNase), negativo e grupos experimentais submetidos à reação

TdT e posteriormente à reação Click-iT. Posteriormente, os embriões foram corados com Hoechst 33342 e analisados em microscópio de fluorescência. Os filtros usados para capturar os comprimentos de onda de excitação de 495/519 nm para Alexa Fluor 488 e 350/461 nm para Hoechst 33342. Para cada blastocisto, o número total de células (coloração Hoechst 33342) e o número total de células apoptóticas (TUNEL) foram determinados. A porcentagem de células apoptóticas foi então calculada com base nesses valores.

2.9. Análises estatísticas

As análises foram realizadas usando os softwares GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) e QUMA. Dados sobre taxas de clivagem, desenvolvimento de blastocisto em D6 e D7, cinética de desenvolvimento embrionário, reexpansão, eclosão e degeneração foram comparados entre os grupos experimentais usando o teste Qui-quadrado. Além disso, os dados de níveis de ROS, atividade mitocondrial, área de gotículas lipídicas, número total de células, número total de células apoptóticas e porcentagem de apoptose foram comparados entre os tratamentos usando análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de teste de Tukey.

Os dados de abundância relativa de mRNA foram comparados entre os grupos experimentais pela ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer ou quando comparados dois a dois pelo teste t de amostras independentes. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). A comparação da metilação global de cada região duas a duas foi feita usando o teste de Mann-Whitney. Além disso, a análise comparativa de metilação de sítio CpG individual foi realizada usando o teste exato de Fisher. Na análise de alelos hiper/hipometilados, os grupos foram classificados como alta ($\geq 80\%$) e baixa ($\leq 20\%$) metilação, os dados dessas análises foram comparados entre os grupos experimentais usando o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher quando comparados dois a dois.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito da melatonina na produção e desenvolvimento embrionário

Os efeitos da melatonina na produção embrionária e na cinética do desenvolvimento foram avaliados utilizando um total de 5.806 ovócitos, dos quais 2.373 embriões foram produzidos, resultando em uma taxa média de produção de 40,87% em vinte e uma repetições.

Conforme apresentado na Tabela 3, não houve diferenças significativas entre os tratamentos nos dias 2 (D2) e 6 (D6) de cultivo. No entanto, no dia 7 (D7), o grupo controle apresentou uma taxa significativamente menor de formação de blastocistos em comparação com todos os grupos suplementados com melatonina. Entre os tratamentos com melatonina, o grupo MIV não diferiu significativamente ($p > 0,05$) dos grupos CIV e MIV/CIV, os quais, por sua vez, diferiram entre si ($p < 0,05$).

Tabela 3. Produção *in vitro* de embriões bovinos submetidos a diferentes tratamentos com suplementação de melatonina nos meios de cultivo.

| Tratamento | N. Ovócitos | Clivagem (D2) | Blastocisto (D6) | Blastocistos (D7) |
|---------------|-------------|---------------|------------------|----------------------------|
| Controle | 1356 | 1132 (83.48%) | 102 (7.52%) | 481 (35.47%) ^a |
| MIV + Mlt | 1540 | 1295 (84.09%) | 124 (8.05%) | 659 (42.79%) ^{bc} |
| CIV + Mlt | 1533 | 1299 (84.74%) | 114 (7.44%) | 677 (44.16%) ^c |
| MIV/CIV + Mlt | 1377 | 1150 (83.51%) | 108 (8.84%) | 556 (40.38%) ^b |

Grupo controle: sem adição de melatonina. N: número; D2: segundo dia; D6: sexto dia; D7: sétimo dia; Mlt: melatonina; MIV: *maturação in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*.

^{a,b,c} Valores com letras diferentes dentro das mesmas colunas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Em relação à cinética do desenvolvimento embrionário mostrada na Tabela 4, foram observadas diferenças ($p < 0,05$) nos estágios de blastocisto inicial (BI) e blastocisto (BL) no dia 6 (D6) entre o grupo controle e todos os grupos tratados com melatonina. Ainda no D6, no estágio BX, o grupo CIV + Mlt foi o único tratamento com melatonina que diferiu ($p < 0,05$) do controle. No entanto, no D7, os embriões dos grupos tratados com melatonina exibiram uma

taxa de desenvolvimento mais rápida, como evidenciado por uma maior porcentagem ($p < 0,05$) de blastocistos eclodidos em comparação com o grupo controle.

Tabela 4. Desenvolvimento embrionário às 144 horas (D6) e 168 horas (D7) pós-inseminação sob diferentes tratamentos com suplementação de melatonina nos meios de produção *in vitro*.

| Tratamento | Blastocisto (D6) | | | | | Blastocisto (D7) | | | | |
|---------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|----------|-------|------------------|-------------|-------------|------------------------|-------|
| | BI | BL | BX | BE | Total | BI | BL | BX | BE | Total |
| Controle | 79 (77.5%) ^a | 22 (21.6%) ^a | 1 (0.9%) ^a | 0 (0.0%) | 102 | 63 (13.1%) | 139 (28.9%) | 272 (56.5%) | 7 (1.5%) ^a | 481 |
| MIV + Mlt | 72 (58.0%) ^b | 47 (37.9%) ^b | 5 (4.1%) ^{ab} | 0 (0.0%) | 124 | 84 (12.7%) | 195 (29.5%) | 357 (54.2%) | 23 (3.6%) ^b | 659 |
| CIV + Mlt | 69 (60.5%) ^b | 38 (33.3%) ^b | 7 (6.2%) ^b | 0 (0.0%) | 114 | 82 (12.1%) | 180 (26.6%) | 392 (57.9%) | 23 (3.4%) ^b | 677 |
| MIV/CIV + Mlt | 60 (55.5%) ^b | 43 (39.8%) ^b | 5 (4.7%) ^{ab} | 0 (0.0%) | 108 | 72 (12.9%) | 146 (26.2%) | 309 (55.6%) | 29 (5.3%) ^b | 556 |

Grupo controle: sem adição de melatonina. N: número; D2: segundo dia; D6: sexto dia; D7: sétimo dia; Mlt: melatonina; MIV: maturação *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*; BI: blastocisto inicial; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BE: blastocisto eclodido.

^{a,b,c} Valores com letras diferentes dentro das mesmas colunas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3.2. Efeito da melatonina nos níveis de EROS

Conforme mostrado na Figura 1, os níveis de EROS, medidos pela intensidade de fluorescência do corante H₂DCFDA, foram menores ($p < 0,05$) nos grupos suplementados com melatonina: MIV + Mlt ($43,2 \pm 4,5\%$), CIV + Mlt ($41,8 \pm 4,4\%$) e MIV/CIV + Mlt ($41,4 \pm 4,1\%$) em comparação com o grupo Controle ($78,1 \pm 9,7\%$).

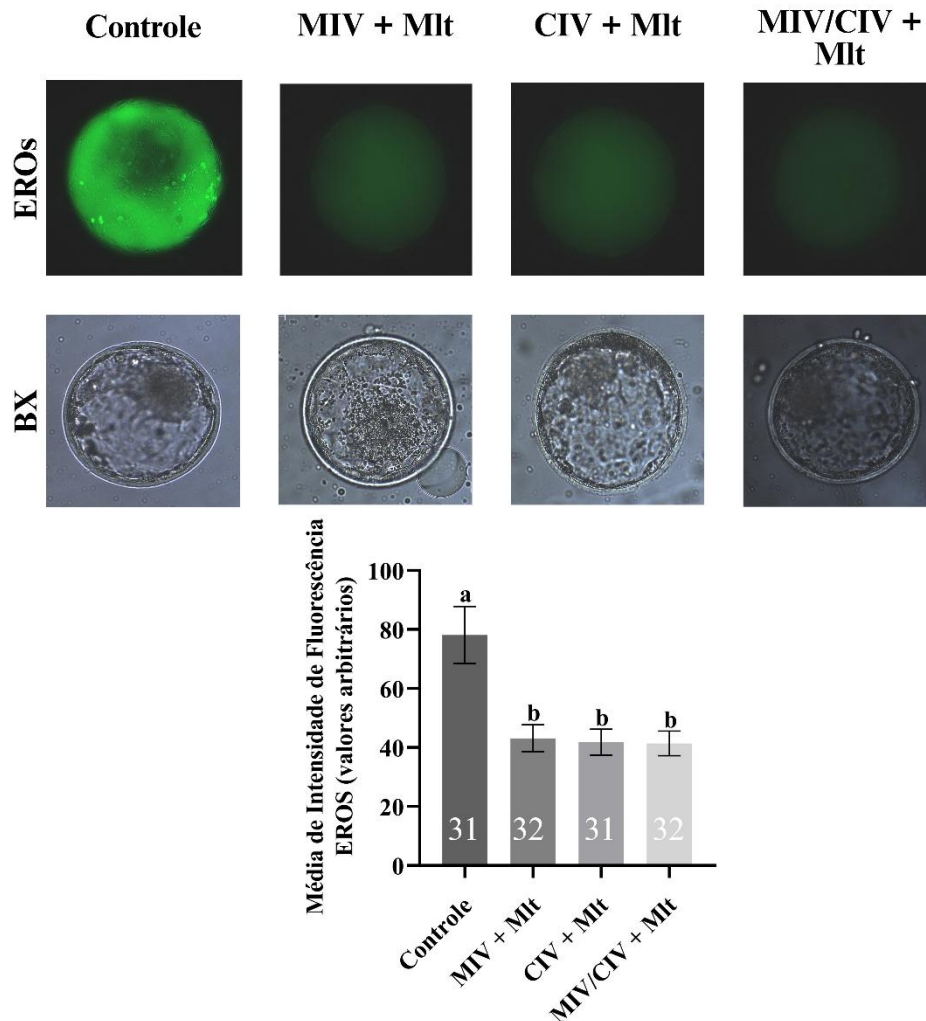


Figura 1. Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares avaliados por H₂DCFDA em diferentes grupos de tratamentos. (1) Controle: sem adição de melatonina; (2) MIV + Mlt: melatonina adicionada durante a maturação *in vitro*; (3) CIV + Mlt: melatonina adicionada durante o cultivo *in vitro*; (4) MIV/CIV + Mlt: melatonina adicionada durante a maturação e cultivo *in vitro*.

^{a,b,c} Valores com letras sobrescritas diferentes entre colunas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3.3. Efeito da melatonina na atividade mitocondrial, acúmulo de gotículas lipídicas e número total de células

Os resultados da atividade mitocondrial, acúmulo de gotículas lipídicas e contagem total de células são apresentados na Figura 2. O conteúdo lipídico foi menor em todos os grupos tratados com melatonina em comparação com o grupo controle ($23,91 \pm 6,37\%$). A maior redução foi

observada no grupo em que a melatonina esteve presente durante as duas etapas, MIV/CIV + Mlt ($10,56 \pm 3,02\%$). No entanto, o grupo em que a melatonina foi suplementada apenas durante a CIV ($13,72 \pm 4,56\%$) apresentou redução intermediária, estatisticamente semelhante aos outros dois grupos tratados com melatonina, apenas na MIV ($16,26 \pm 3,36\%$) e presente em ambas as etapas ($p < 0,05$).

Ao contrário do conteúdo lipídico, a atividade mitocondrial foi maior em todos os grupos tratados com melatonina em comparação com o Controle. A maior atividade mitocondrial foi observada nos grupos em que a melatonina estava presente durante a MIV (MIV + Mlt e MIV/CIV + Mlt), que foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$). No entanto, ambos apresentaram atividade significativamente maior ($p < 0,05$) do que o grupo CIV + Mlt, que teve um aumento intermediário.

Em relação à contagem total de células, avaliada usando Hoechst 33342, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos Controle, MIV + Mlt, CIV + Mlt e MIV/CIV + Mlt.

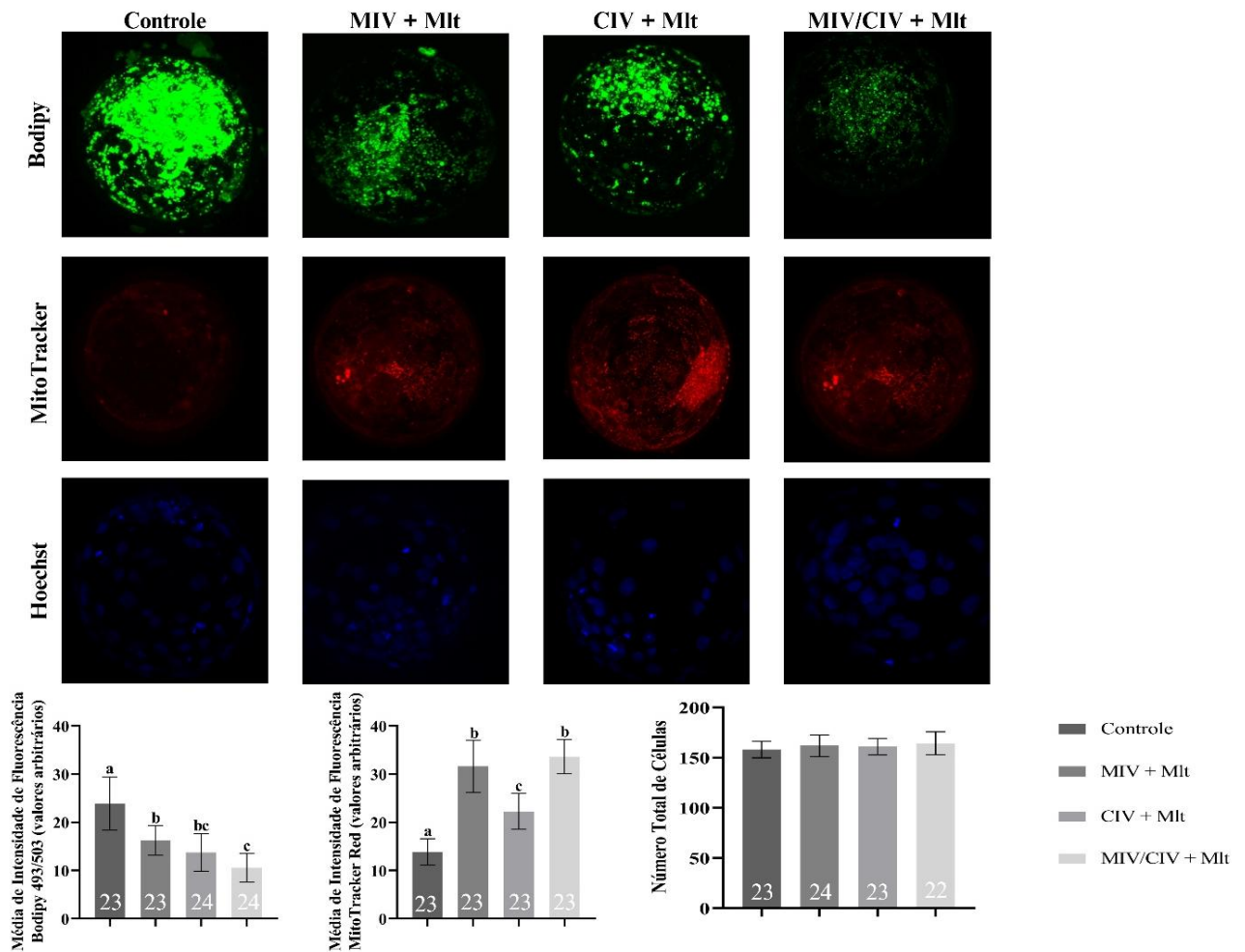


Figura 2. Níveis de gotículas lipídicas intracelulares em blastocistos avaliados por BODIPY 493/503, níveis de atividade mitocondrial avaliados por Mito Tracker Deep Red e contagem total de células por Hoechst 33342 em diferentes grupos de tratamentos. (1) Controle: sem adição de melatonina; (2) MIV + Mlt: melatonina adicionada durante a maturação *in vitro* ; (3) CIV + Mlt: melatonina adicionada durante o cultivo *in vitro* ; (4) MIV/CIV + Mlt: melatonina adicionada durante a maturação e cultivo *in vitro*.

a,b,c Valores com letras sobrescritas diferentes entre colunas são significativamente diferentes pelo ANOVA ($p < 0,05$).

3.4. Efeito da melatonina na criotolerância de embriões

Em relação à criotolerância embrionária, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos de tratamento ($p > 0,05$), em termos de desenvolvimento, degeneração e reexpansão embrionária 12 ou 24 horas após o descongelamento (Tabela 5).

Da mesma forma, não foram detectadas diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos na análise do número total de células e porcentagem de células apoptóticas (Tabela 6). Todas essas análises também foram avaliadas no grupo de embriões frescos (controle de embriões vitrificados) e foram incluídas nas análises estatísticas (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Taxas de blastocistos expandidos, eclodidos, degenerados, não reexpandidos e reexpandidos 12 e 24 horas após o reaquecimento de embriões produzidos *in vitro* na presença ou ausência de melatonina.

| Tratamento | Aquecidos | 12h pós-reaquecimento | | | | | 24h pós-reaquecimento | | | | |
|---------------|-----------|-----------------------|-------------|-----------|------------|--------------|-----------------------|-------------|-----------|------------|--------------|
| | | BX | BE | DEG | NR | Reexpandidos | BX | BE | DEG | NR | Reexpandidos |
| Controle | 49 | 32 (65.31%) | 5 (10.20%) | 3 (6.12%) | 9 (18.37%) | 37 (75.51%) | 23 (46.94%) | 14 (28.57%) | 3 (6.12%) | 9 (18.37%) | 37 (75.51%) |
| MIV + Mlt | 53 | 35 (66.04%) | 8 (15.09%) | 4 (7.55%) | 6 (11.32%) | 43 (81.13%) | 22 (41.51%) | 21 (39.62%) | 4 (7.55%) | 6 (11.32%) | 43 (81.13%) |
| CIV + Mlt | 63 | 41 (65.08%) | 11 (17.46%) | 4 (6.35%) | 7 (11.11%) | 52 (82.54%) | 25 (39.68%) | 27 (42.86%) | 4 (6.35%) | 7 (11.11%) | 52 (82.54%) |
| MIV/CIV + Mlt | 51 | 33 (64.71%) | 6 (11.76%) | 4 (7.84%) | 8 (15.69%) | 39 (76.47%) | 21 (41.18%) | 18 (35.29%) | 4 (7.84%) | 8 (15.69%) | 39 (76.47%) |

Grupo controle: sem adição de melatonina. Mlt: melatonina; MIV: maturação *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*; BX: blastocisto expandido; BE: blastocisto eclodido, DEG: degenerado; NR: não reexpandido.

^{a, b, c} Valores com letras diferentes dentro das mesmas colunas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 6. Número total de células, número de células apoptóticas e proporção de células apoptóticas em blastocistos expandidos 24 horas após o reaquecimento, produzidos *in vitro* na presença ou ausência de melatonina.

| Tratamentos | N. Embriões | Total células | Total células apoptóticas | Taxa apoptótica (%) |
|-----------------|-------------|----------------|---------------------------|---------------------|
| Controle Fresco | 22 | 186.50 ± 14.41 | 14.09 ± 3.22 | 7.60 ± 1.83 |
| Controle | 24 | 181.67 ± 17.37 | 13.75 ± 3.35 | 7.64 ± 1.96 |
| MIV + Mlt | 20 | 181.50 ± 9.12 | 13.90 ± 3.51 | 7.72 ± 2.15 |
| CIV + Mlt | 19 | 185.84 ± 15.21 | 13.05 ± 3.91 | 7.06 ± 2.13 |
| MIV/CIV + Mlt | 21 | 179.48 ± 15.62 | 12.95 ± 3.73 | 7.19 ± 1.91 |

Grupo controle: sem adição de melatonina. Mlt: melatonina; MIV: maturação *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*; N: número.

^{a, b, c} Valores com letras diferentes nas mesmas colunas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3.5. Quantificação da abundância relativa de mRNA

A Figura 3 mostra a análise dos níveis de mRNA para os genes SOD1, GSS, CAT, CPT1A, PLIN2, PPAR γ , TET1, TET2, TET3, DNMT3A e DNMT3B em blastocistos. Dentre todos os genes avaliados, apenas a glutatona sintetase (GSS) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos MIV + Mlt e CIV + Mlt, com maiores níveis de transcritos no grupo MIV.

Quando cada grupo tratado com melatonina foi comparado individualmente com o controle, foram observados padrões de transcritos distintos de genes relacionados ao estresse oxidativo (SOD1, CAT e GSS) (Figura 4). O grupo CIV + Mlt apresentou níveis mais baixos de transcritos de SOD1, CAT e GSS em comparação com o controle ($p < 0,10$), enquanto o grupo MIV + Mlt exibiu uma abundância relativa de mRNA aumentada de GSS ($p < 0,10$).

Em relação aos genes associados ao metabolismo lipídico (CPT1A, PLIN2 e PPAR γ) (Figura 5), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com melatonina ($p > 0,05$).

Em contraste, foram observadas diferenças na abundância relativa de mRNA dos genes relacionados à reprogramação epigenética (DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2, TET3) (Figura 6 e 7). Os níveis de mRNA de TET1 foram significativamente menores no grupo CIV + Mlt em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), enquanto os níveis de TET3 foram significativamente maiores nesse mesmo grupo ($p \leq 0,05$). Além disso, a abundância relativa de mRNA de DNMT3A foi reduzida no grupo MIV/CIV + Mlt em relação ao controle ($p < 0,05$).

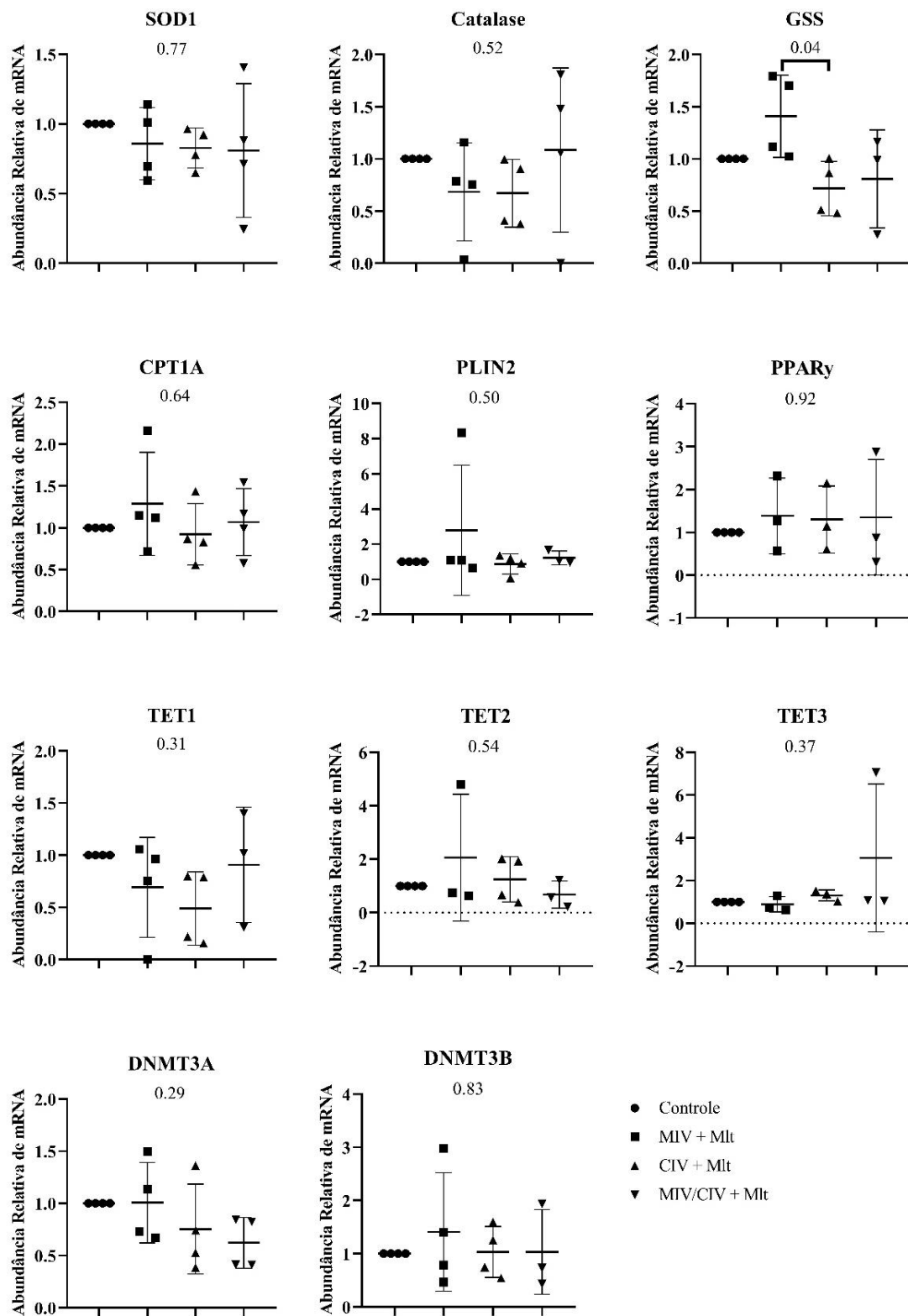


Figura 3. Níveis de transcritos de genes relacionados à reprogramação epigenética - DNMT3A (DNA metiltransferase 3 alfa), DNMT3B (DNA metiltransferase 3 beta), TET1 (Translocação Ten-Eleven metilcitosina dioxigenase 1), TET2 (Translocação Ten-Eleven metilcitosina dioxigenase 2) e TET3 (Translocação Ten-Eleven metilcitosina dioxigenase 3); estresse oxidativo - SOD1 (Superóxido Dismutase 1), GSS (Glutationa Sintetase) e CAT (Catalase); e metabolismo lipídico - CPT1A (Carnitina Palmitoiltransferase 1A), PLIN2 (Perilipina 2) e PPAR γ (Peroxisoma Proliferator-Activated Receptor Gamma). Foram avaliados 25 blastocistos expandidos bovinos do dia 7 para cada tratamento, analisados em triplicata. Comparação de todos os grupos entre si pelo teste ANOVA.

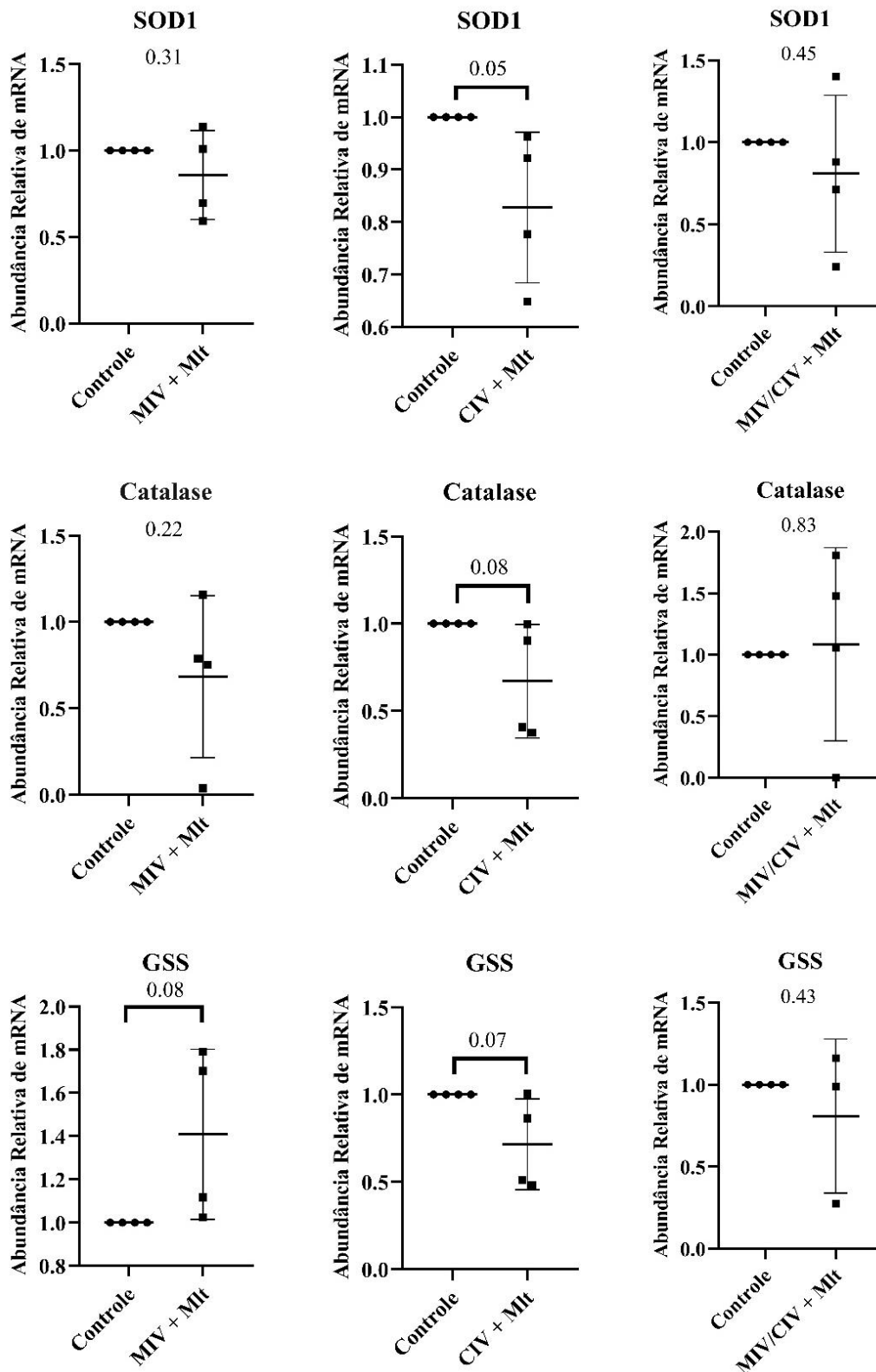


Figura 4. Níveis de transcritos de genes relacionados ao estresse oxidativo, SOD1 (Superóxido Dismutase 1), GSS (Glutathiona Sintetase) e CAT (Catalase). Foram avaliados blastocistos expandidos de dia 7 de desenvolvimento. Foram avaliados 25 blastocistos expandidos bovinos do dia 7 para cada tratamento, analisados em triplicata. Comparação feita de cada grupo contendo melatonina com o controle pelo teste t.

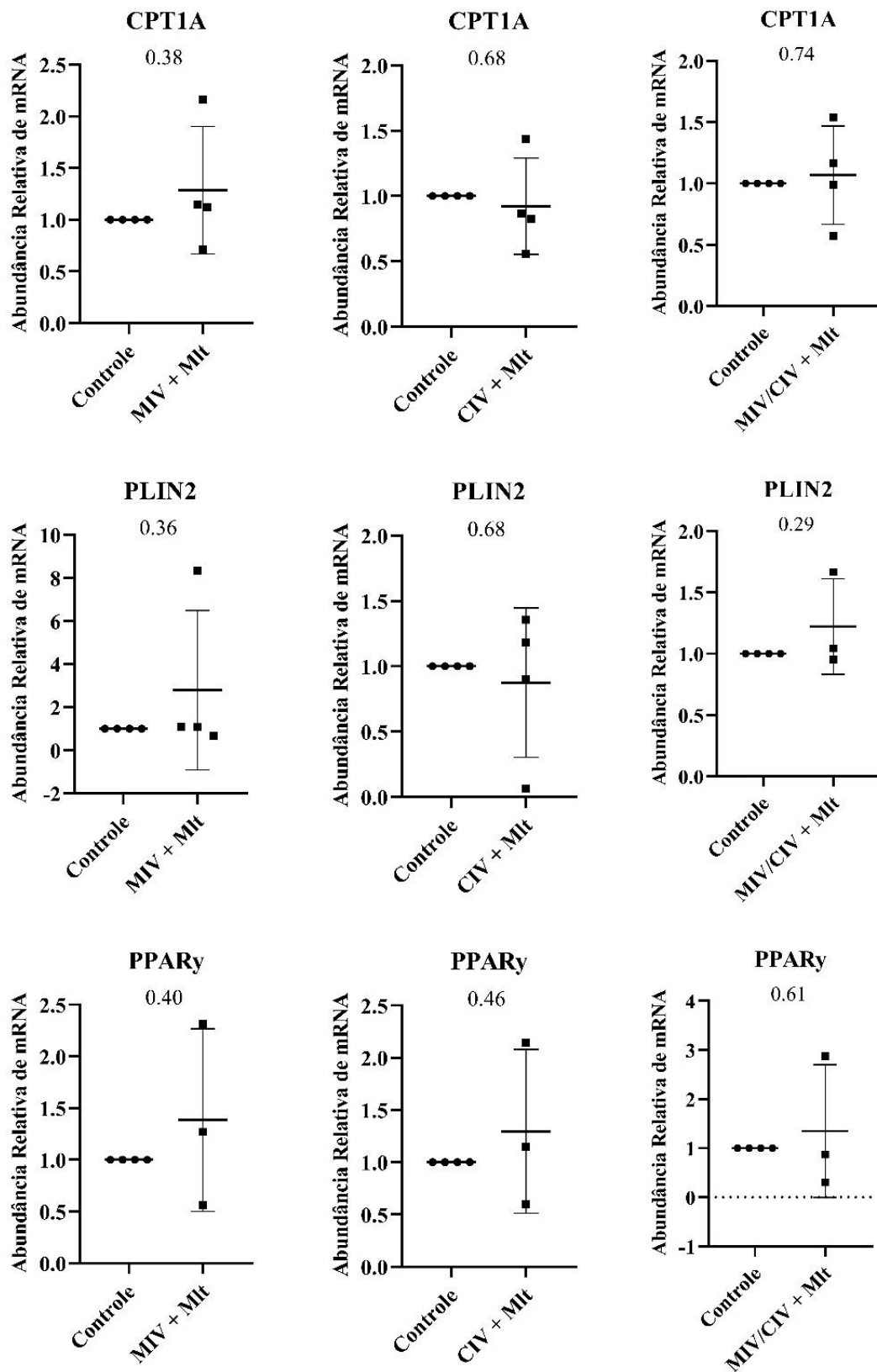


Figura 5. Níveis de transcritos de genes relacionados ao metabolismo lipídico, CPT1A (Carnitina Palmitoiltransferase 1A), PLIN2 (Perilipina 2) e PPAR γ (Peroxisoma Proliferator-Activated Receptor Gamma). Foram avaliados 25 blastocistos expandidos bovinos do dia 7 para cada tratamento, analisados em triplicata. Comparação feita de cada grupo contendo melatonina com o controle pelo teste t.

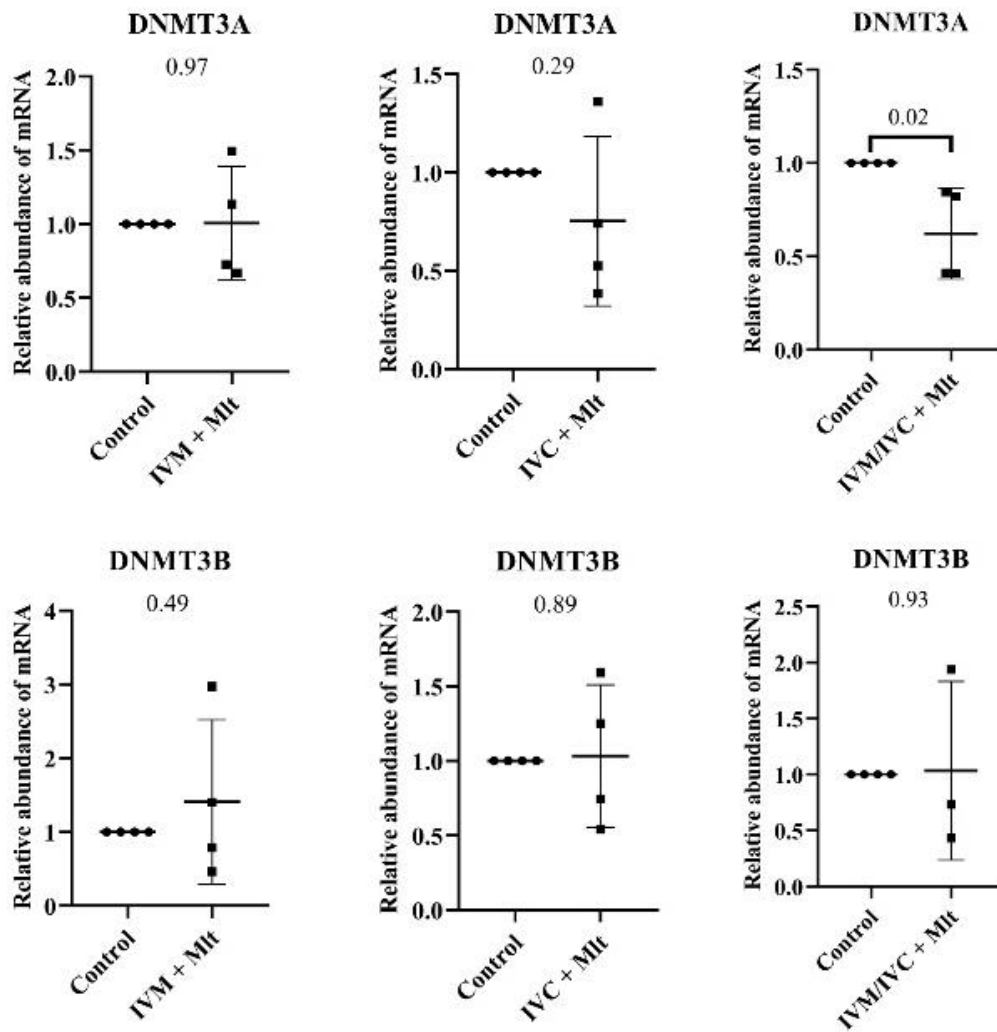


Figura 6. Níveis de transcritos de genes relacionados à reprogramação epigenética - DNMT3A (DNA metiltransferase 3 alfa), DNMT3B (DNA metiltransferase 3 beta). Foram avaliados 25 blastocistos expandidos bovinos do dia 7 para cada tratamento, analisados em triplicata. Comparação feita de cada grupo contendo melatonina com o controle pelo teste t.

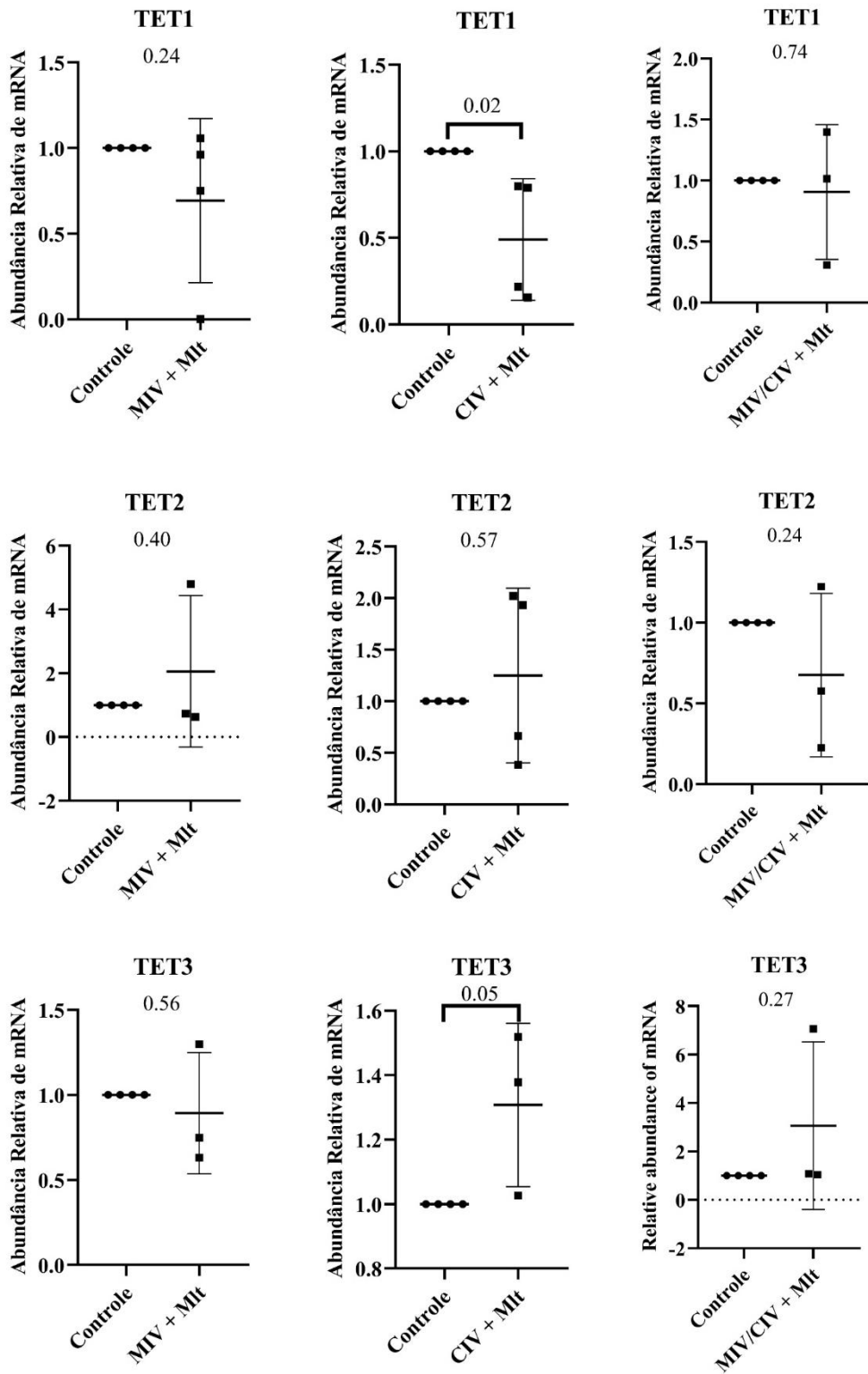


Figura 7: Níveis de transcritos de genes relacionados à reprogramação epigenética - TET1 (Dioxigenase 1 de Translocação Ten-Eleven), TET2 (Dioxigenase 2 de Translocação Ten-Eleven) e TET3 (Metilcitosina dioxigenase 3 de Translocação Ten-Eleven). Foram avaliados 25 blastocistos expandidos bovinos do dia 7 para cada tratamento, analisados em triplicata. Comparação feita de cada grupo contendo melatonina com o controle pelo teste t.

3.6. Efeito da melatonina no perfil de metilação do DNA

Foi avaliado o perfil de metilação em regiões de sequências repetitivas de DNA (Satellite I e LINE-1). Os resultados são mostrados nas Figuras 8, 9 e 10. Em relação ao padrão de metilação global do Satellite I (Figura 8A), não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com melatonina e o controle ($p > 0,05$). Todos os grupos exibiram um padrão hipometilado. Da mesma forma, para o gene LINE-1 (Figura 9A), o padrão de hipometilação foi observado em todos os tratamentos. No entanto, ao comparar o grupo MIV + Mlt ($5,0\% \pm 10,9$) com o controle ($10,1\% \pm 17,8$), o grupo MIV + Mlt exibiu significativamente menos metilação ($p < 0,05$) (Figura 9A).

Em seguida, analisamos a porcentagem de metilação em cada sítio CpG individualmente para o Satellite I (Figura 8B). Em todas as situações em que ocorreram diferenças, os grupos tratados com melatonina exibiram CpGs menos metilados em comparação com o grupo controle ($p < 0,10$) (Figura 8B). No LINE-1 (Figura 9B), o grupo exposto à melatonina durante a maturação e a cultivo (MIV + Mlt) diferiu do controle nos sítios CpG 22 e 23, com os grupos tratado com melatonina apresentando uma metilação do DNA significativamente menor ($p < 0,05$).

Além disso, na análise comparativa da metilação por CpG do Satellite I e LINE-1 (figuras 8B e 9B, respectivamente), observou-se que a CpG 18 e as CpGs 22/23 do Satellite I e LINE-1, respectivamente, foram diferencialmente metiladas entre o controle e o tratamento CIV + Mlt. A metilação de CpGs específicos pode afetar a ligação de fatores de transcrição e, consequentemente, a abundância relativa de mRNA. Portanto, o software TFBIND INPUT (<https://tfbind.hgc.jp/>) foi utilizado para pesquisar se as sequências próximas a esses sítios CpGs poderiam ser sequências de ligação de fatores de transcrição. Nessas regiões contendo essas CpGs, a sequência de consenso encontrada M00211 V\$PADS (NGTGGTCTCGAGGCCACG) teve similaridade de 0,87 (em uma escala de 0,0 – 1,0) com a sequência de ligação do fator de transcrição PAX. Esta corresponde ao domínio de ligação ao DNA da proteína PAX (fatores de transcrição de domínio pareado), de acordo com o banco de dados TRANSFAC®.

Satellite I

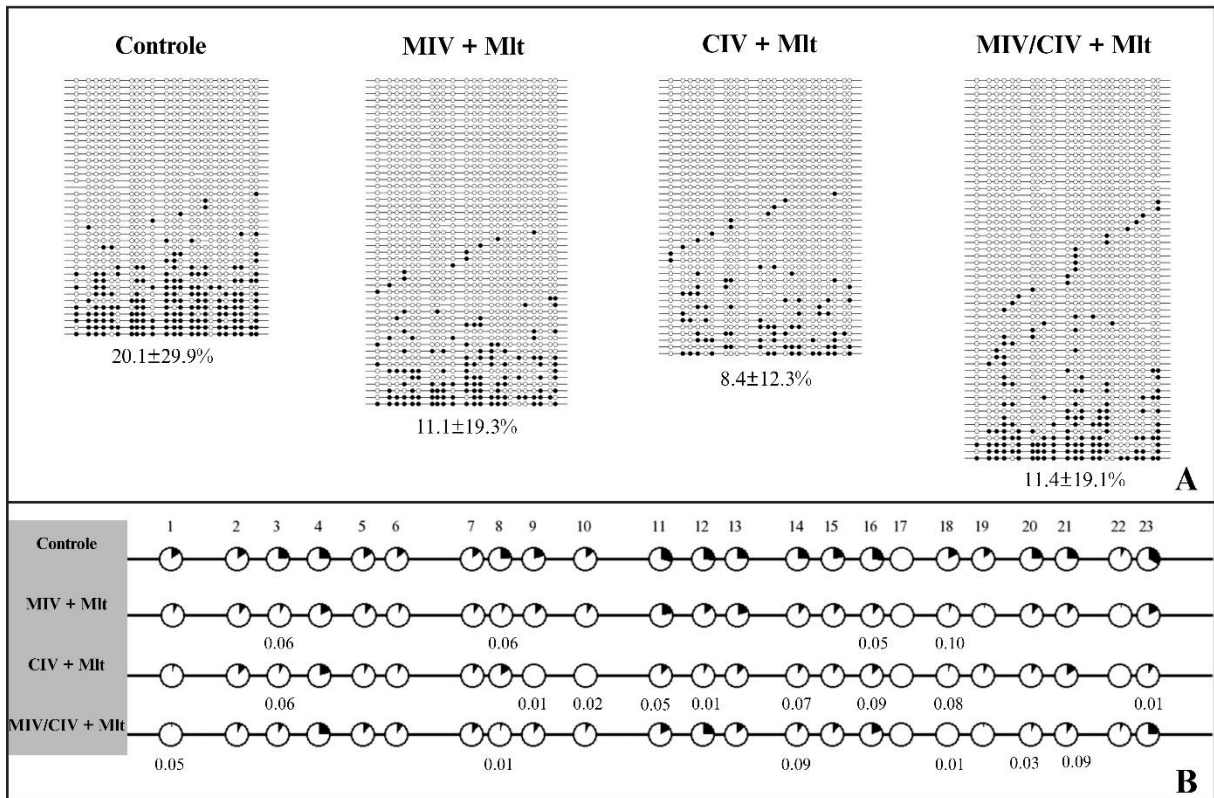


Figura 8. Perfil de metilação do DNA do Satellite I. (A) Perfil de metilação global da região Satellite I entre os grupos controle e melatonina. Os círculos pretos representam citosinas metiladas e os círculos brancos representam citosinas não metiladas. (B) Análise comparativa da metilação por sítios CpG entre os grupos controle e melatonina. Cada linha representa um clone de DNA individual e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG. A porcentagem de metilação do DNA para cada tratamento (Controle; MIV + Mlt; CIV + Mlt; MIV/CIV + Mlt) é representada como média \pm desvio padrão da média. (1-23) representa o número de CpGs de cada amostra. Valores de $p \leq 0,10$ são mostrados. O teste de Mann-Whitney foi usado para análise de metilação global, enquanto o teste exato de Fisher foi usado para comparação por sítio CpG.

LINE-1

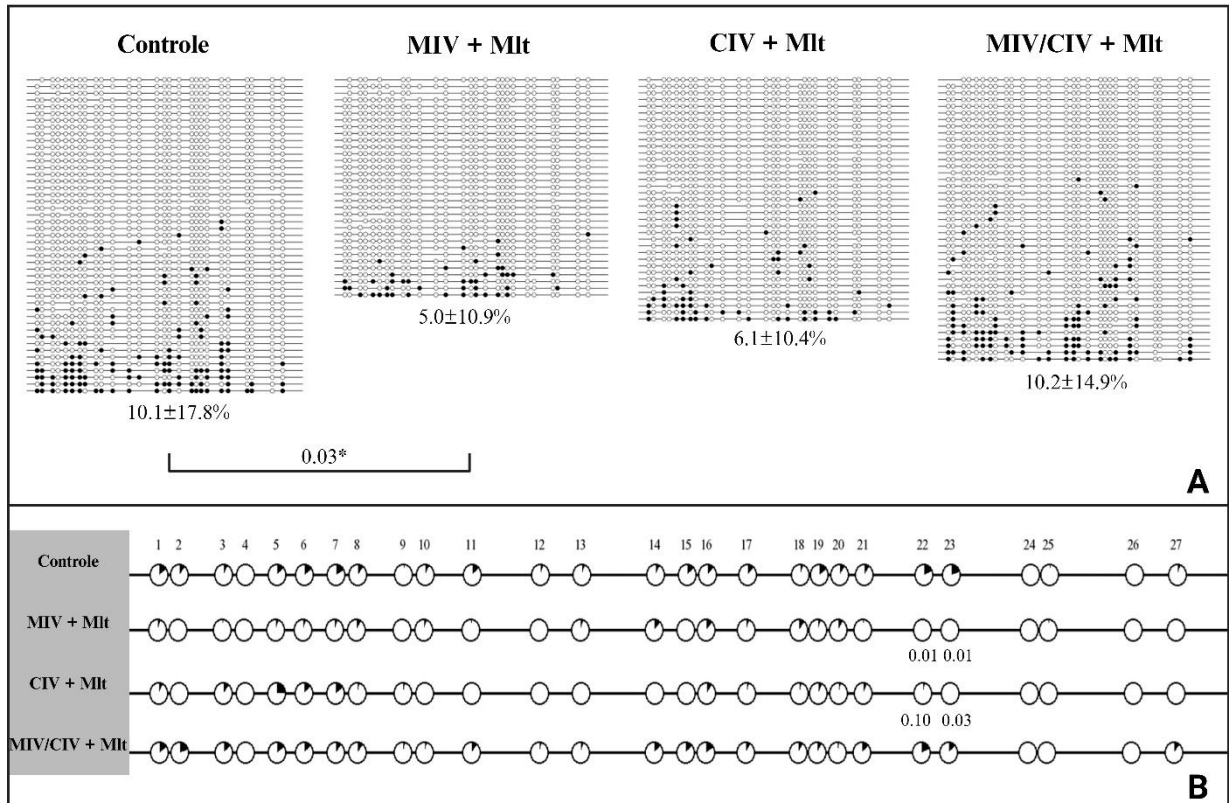


Figura 9. Perfil de metilação do DNA LINE-1. (A) Perfil de metilação global da região LINE-1 entre os grupos controle e melatonina. Os círculos pretos representam citosinas metiladas e os círculos brancos representam citosinas não metiladas. (B) Análise comparativa da metilação por sítios CpG entre os grupos controle e melatonina. Cada linha representa um clone de DNA individual e cada círculo representa um dinucleotídeo CpG. A porcentagem de metilação do DNA para cada tratamento (Controle; MIV + Mlt; CIV + Mlt; MIV/CIV + Mlt) é representada como média \pm desvio padrão da média. (1-23) representa o número de CpGs de cada amostra. Valores de $p \leq 0,10$ são mostrados. O teste de Mann-Whitney foi usado para análise de metilação global, enquanto o teste exato de Fisher foi usado para comparação por sítio CpG.

Na análise dos alelos hiper e hipometilados ($\geq 80\%$ e $\leq 20\%$, respectivamente) (Figura 10), os dados referentes à região Satellite I (Figura 10A) mostraram que o tratamento CIV + Mlt apresentou um número significativamente maior de alelos hipometilados ($\leq 20\%$) em comparação ao controle ($p < 0,05$). Em relação à região LINE-1 (Figura 10B), todos os tratamentos contendo melatonina, assim como o controle, apresentaram maior frequência de alelos hipometilados ($\leq 20\%$).

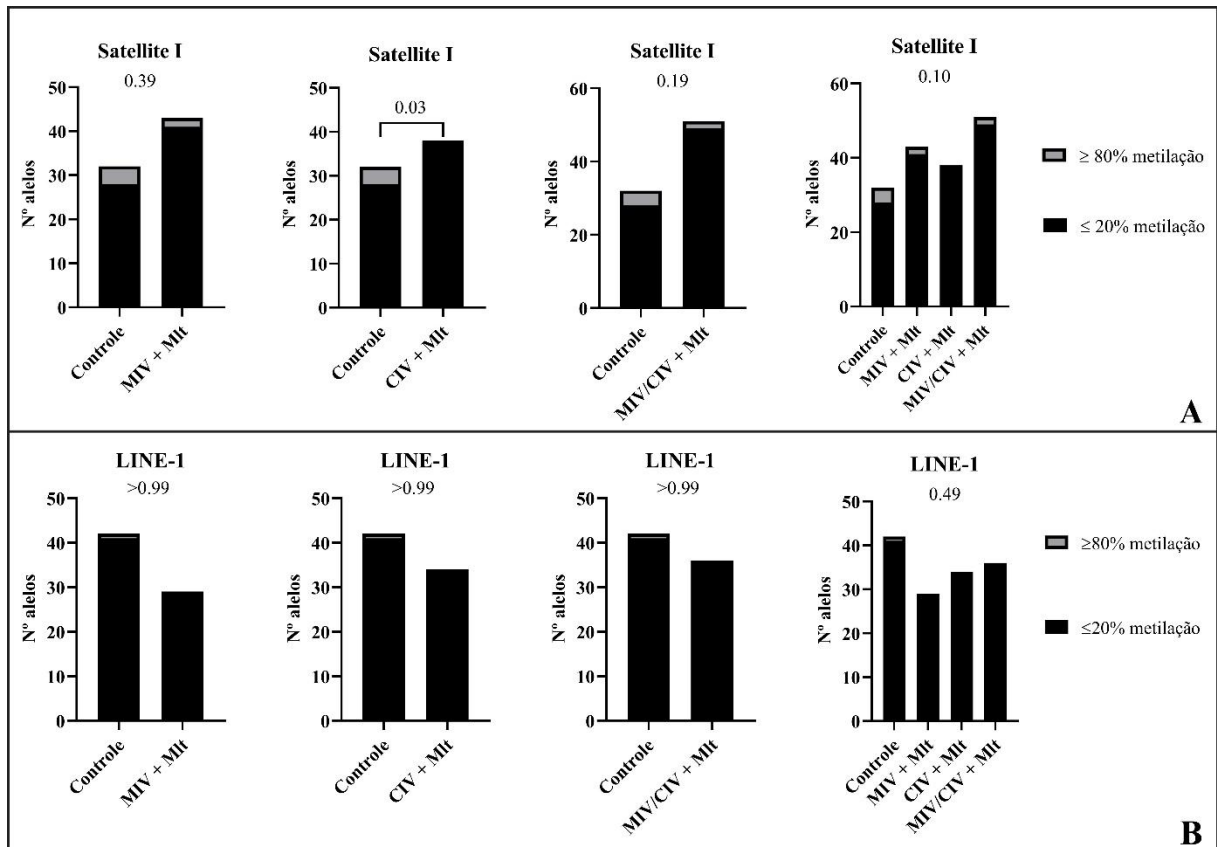


Figura 10. Comparação entre frequência/número de alelos hiper/hipometilados (80/20%). A: região Satellite I. B: região LINE-1 Os dados foram comparados entre os grupos experimentais usando o teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher quando comparados ao controle com os grupos melatonina.

4. DISCUSSÃO

A melatonina surge como uma opção promissora para melhorar a eficiência da PIVE, não apenas por seu conhecido potencial antioxidante, mas também por suas ações benéficas adicionais sobre o metabolismo e mecanismos epigenéticos. Portanto, neste estudo, nosso objetivo foi examinar esses efeitos em embriões bovinos e determinar o período ideal durante a PIVE, quando a melatonina oferece os maiores benefícios.

Inicialmente, avaliamos a produção de blastocisto nos diferentes tratamentos. Nossos resultados mostraram que a suplementação de melatonina não afetou a taxa de clivagem ou a formação de blastocisto no D6, mas teve um impacto significativo no D7, onde todos os grupos tratados com melatonina exibiram uma taxa de blastocisto mais alta do que o controle. Esse achado está de acordo com estudos anteriores, que também mostraram melhora ao usá-la durante a MIV em bovinos (Tian et al., 2014; Wang et al., 2017; Yang et al., 2017; Zhao et al., 2018) e CIV (Wang et al., 2014a, 2014b; Lira et al., 2020). Embora poucos estudos tenham avaliado os efeitos da suplementação de melatonina ao longo de todo o processo de PIVE, nossos achados demonstram que seu impacto positivo na produção de blastocisto é mantido independentemente do momento ou duração da suplementação.

Esses efeitos benéficos da melatonina podem ser atribuídos principalmente às suas propriedades antioxidantes, pois reduz as EROs, neutralizando diretamente os radicais livres, hidroxilas (OH^-), superóxidos (O_2^-) e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2), que são os mais abundantes e prejudiciais ao ambiente biológico. No entanto, embora os grupos MIV + Mlt e CIV/MIV + Mlt tenham tido melhor desempenho do que o controle, estes foram inferiores ao grupo CIV + Mlt em termos de produção de embriões. Esse achado sugere que a exposição à melatonina por apenas 24 h, como ocorre na MIV, pode ser insuficiente para alcançar os mesmos benefícios observados com a suplementação durante a CIV, e que a exposição contínua à melatonina durante a MIV e a CIV não oferece vantagens adicionais, ao contrário de nossas

expectativas iniciais. Em vez disso, a exposição prolongada pode ter induzido um efeito negativo, possivelmente devido à regulação excessiva das vias metabólicas e da sinalização celular, fenômeno também observado anteriormente em um estudo que utilizou melatonina em MIV e CIV, em conjunto, na produção *in vitro* de embriões bovinos (Marques et al., 2018).

O efeito positivo da melatonina também foi evidente na cinética do desenvolvimento, um importante indicador da qualidade embrionária (Wang et al., 2014b; Yang et al., 2017). O desenvolvimento embrionário mais rápido observado nos grupos tratados pode ser o resultado das ações combinadas da melatonina na proteção contra o estresse oxidativo, mediando a progressão do ciclo celular e regulando a apoptose. Esses mecanismos contribuem coletivamente para um ambiente mais favorável para o desenvolvimento embrionário oportuno, resultando em embriões de maior qualidade, como evidenciado por sua cinética de desenvolvimento acelerada. Isso é ainda corroborado pelos níveis reduzidos de EROs que observamos nos grupos tratados com melatonina, reforçando seu papel protetor. Consistente com nossos achados, estudos anteriores relataram reduções semelhantes nas EROs após o uso de melatonina tanto no MIV quanto no CIV de bovinos (Gao et al., 2012; Su et al., 2015; Yang et al., 2017; Marques et al., 2018) atribuído às suas propriedades diretas de eliminação de radicais livres e sua capacidade de regular positivamente enzimas antioxidantes endógenas, como SOD e CAT (Cavallari et al., 2019). Essas enzimas desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase redox dentro das células, apoiando ainda mais a viabilidade e o desenvolvimento do embrião (Rodriguez et al., 2004). Apesar dos benefícios na produção e cinética de embriões, não houve diferença no número total de células nos tratamentos com a ausência ou presença de melatonina nos meios de cultivo. Isso sugere que a melatonina pode ter efeitos benéficos na qualidade do desenvolvimento embrionário e na proteção contra o estresse oxidativo sem afetar diretamente o número de células, o que também foi encontrado em outros trabalhos em bovinos usando melatonina em MIV e CIV (Marques et al., 2018).

Devido aos efeitos antioxidantes observados da melatonina, analisamos a abundância relativa de mRNA relacionados ao estresse oxidativo com o objetivo de compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na sua ação. Já foi relatado que a melatonina não apenas atua diretamente como eliminadora de radicais livres, mas também influencia vias antioxidantes por meio de seus receptores de membrana, ativando a via de sinalização Nrf2 (Ahmadi; Ashrafizadeh, 2020). Esse fator de transcrição regula a abundância relativa de mRNA de genes como GSS (envolvido na síntese de glutatona), SOD1 e CAT (Ahmadi; Ashrafizadeh, 2020).

Em nosso estudo, ao comparar todos os tratamentos simultaneamente, observamos que apenas o grupo MIV + Mlt apresentou níveis significativamente mais elevados de transcritos de GSS em relação ao grupo CIV + Mlt. No entanto, quando cada tratamento foi comparado individualmente ao controle, os embriões do grupo CIV + Mlt exibiram níveis mais baixos de transcritos para esses genes relacionados ao estresse oxidativo. Isso pode refletir uma necessidade reduzida de respostas antioxidantes endógenas devido ao efeito protetor direto da melatonina. Tal resposta sugere um ambiente redox mais estável, no qual os embriões dependem de proteínas antioxidantes preexistentes em vez de regular positivamente a transcrição gênica, indicando uma condição menos estressante e mais favorável para o desenvolvimento embrionário. Esses achados moleculares corroboram nossos resultados de desenvolvimento embrionário, indicando que, no D7 do cultivo *in vitro*, o grupo CIV + Mlt não apenas apresentou desempenho superior em termos de desenvolvimento em comparação com os demais grupos tratados com melatonina, como também foi o único a exibir alterações moleculares significativas em relação ao controle. Em conjunto, essas evidências reforçam a hipótese de que a melatonina promove um ambiente mais estável e propício ao desenvolvimento embrionário, sobretudo quando suplementada durante a fase de CIV.

Considerando que a melatonina foi recentemente relatada como reguladora do metabolismo lipídico em ovócitos suínos (Jin et al., 2017, 2022), investigamos esse efeito em embriões bovinos. De fato, nossos resultados demonstraram que a melatonina reduziu o acúmulo de gotículas lipídicas em embriões bovinos em todos os grupos. Este efeito pode ser mediado pela regulação da melatonina das principais enzimas metabólicas, promovendo a utilização de lipídios e reduzindo o armazenamento, aumentando a lipólise e a β -oxidação de ácidos graxos (Jin et al., 2017, 2022). Foi também observado que esse efeito de redução lipídica foi mais pronunciado com a exposição contínua à melatonina durante a MIV e a CIV, reforçando a ligação entre o conteúdo lipídico do ovócito e os estoques lipídicos embrionários (De Lima et al., 2023). Para obter uma visão mais profunda dos mecanismos moleculares subjacentes a essa redução fenotípica, analisamos a expressão de genes-chave envolvidos no metabolismo lipídico (CPT1A, PLIN2 e PPAR γ). No entanto, apesar da diminuição observada nas gotículas lipídicas, não detectamos alterações significativas na quantidade de transcritos desses genes. Essa discrepância pode ser devido a efeitos em outras vias metabólicas não avaliadas aqui, como, por exemplo, a via AMPK ou SIRT1 (Vasconcelos et al., 2024). No geral, esses achados sugerem que a influência da melatonina no conteúdo lipídico provavelmente envolve

mecanismos regulatórios mais amplos além da regulação direta da abundância relativa de mRNA.

Os lipídios são uma fonte primária de energia por meio da β -oxidação nas mitocôndrias, o que motivou a investigação da atividade mitocondrial. Observou-se que o grupo controle apresentou menor atividade mitocondrial em comparação aos grupos tratados com melatonina. A redução nos estoques lipídicos intracelulares sugere maior oxidação de ácidos graxos pelas mitocôndrias para a geração de ATP. Estudos anteriores associam esse menor acúmulo de lipídios ao aumento da β -oxidação mitocondrial, produção de energia e melhor desenvolvimento embrionário (Jin et al., 2017, 2022; Vasconcelos et al., 2024). No entanto, quando a melatonina foi usada apenas na CIV, a atividade mitocondrial foi menor do que nos outros grupos tratados. Pesquisas indicam que a melatonina regula a atividade mitocondrial em ovócitos suínos durante a maturação (Liang et al., 2017; Jin et al., 2017, 2022) e promove a biogênese mitocondrial por meio da ativação de genes específicos (Izyumov et al., 2010). Assim, a exposição à melatonina durante a MIV pode induzir adaptações mitocondriais precoces, explicando a menor atividade mitocondrial no grupo suplementado apenas durante a CIV.

Também avaliamos se a suplementação de melatonina poderia melhorar a criotolerância de embriões produzidos *in vitro*. Apesar de seus efeitos benéficos sobre o estresse oxidativo e o desenvolvimento embrionário, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas taxas de apoptose ou sobrevida após a criopreservação (Marques et al., 2021). Esses resultados sugerem que, embora a melatonina melhore certos aspectos da qualidade do embrião, ela não melhora diretamente a resistência à vitrificação e ao aquecimento. Esse resultado foi inesperado, pois a melatonina reduziu fenotipicamente o acúmulo de gotículas lipídicas, um efeito geralmente associado à melhora da criotolerância. No entanto, essa falta de efeito pode ser atribuída à natureza multifatorial da criotolerância, que é influenciada não apenas pelo estresse oxidativo, mas também por fatores como compactação celular, diferenciação, integridade genômica, organização citoplasmática e estabilidade da membrana, aspectos que podem não ter sido suficientemente modificados pela suplementação de melatonina (Ferré et al., 2020a; Salek et al., 2025).

Além de seus efeitos antioxidantes e metabólicos, a melatonina tem sido recentemente associada à regulação da reprogramação epigenética, um processo essencial para o desenvolvimento embrionário adequado (Korkmaz; Reiter, 2008; Su et al., 2015b; Liang et al.,

2017; Tutt et al., 2023). Diante disso, investigamos se a suplementação com melatonina poderia influenciar eventos epigenéticos em embriões bovinos. Para isso, inicialmente quantificamos os níveis de mRNA das principais enzimas envolvidas nos processos de metilação e desmetilação do DNA. Comparando cada tratamento com o controle, observamos que os níveis de transcritos dos genes TET1 e TET3 foram alterados no grupo CIV + Mlt. Especificamente, este grupo apresentou níveis aumentados de mRNA de TET3 e redução de transcritos de TET1, sugerindo que a melatonina influencia a reprogramação epigenética de maneira estágio-específica.

Estudos sugerem que o TET 1 desempenha um papel essencial na manutenção de células-tronco embrionárias, especialmente regulando a abundância relativa de mRNA de genes pluripotentes como o Nanog e OCT4. Sua ausência leva ao aumento da metilação nos promotores e perda do estado pluripotente, porém sua superexpressão não causa redução geral de 5mC como TET3 (Ito et al., 2010; Montgomery; Uh; Lee, 2024). Por outro lado, o TET 3, atua principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, como o zigoto, e está envolvido na desmetilação do DNA paterno pós-fecundação. (Ito et al., 2010; Zhang et al., 2020; Montgomery; Uh; Lee, 2024). Além disso, o grupo MIV/CIV + Mlt apresentou uma redução significativa na abundância relativa de mRNA de DNMT3A, o que pode indicar uma potencial retomada ativa *de* metilação *de novo*, necessário para a estabilização dos perfis epigenéticos após a desmetilação (Okano et al., 1999). Para complementar os dados de abundância relativa de mRNA e obter insights mais profundos sobre o impacto epigenético da melatonina, avaliamos os padrões globais de metilação do DNA.

Para avaliar o padrão de metilação do DNA, usamos dois DNA repetitivos específicos, Satellite I (Silveira et al., 2018; De Oliveira Leme et al., 2025) e um LINE-1 (Spadafora, 2015), que são sequências de DNA altamente repetitivas e distribuídas ao longo do genoma, constituindo uma parte considerável dos genomas eucarióticos (López-Flores; Garrido-Ramos, 2012; Pezer et al., 2012; Spadafora, 2015). Portanto, eles podem refletir padrões específicos de metilação do DNA em todo o genoma. Em nosso estudo, a única diferença detectada foi que o grupo MIV + Mlt apresentou menor nível de metilação na região LINE-1 em comparação com o controle, sugerindo que a exposição à melatonina durante a MIV pode estar envolvida na regulação epigenética de elementos repetitivos. Um padrão semelhante foi observado no Satellite I de blastocistos derivados de PIVE, onde a hipometilação também foi detectada (Kaneda et al., 2011; De Oliveira Leme et al., 2025).

A porcentagem de metilação de cada sítio CpG no Satellite I foi avaliada, o tratamento CIV + Mlt apresentou um maior número de CpG (9) menos metilado em comparação com o controle, indicando que a melatonina também pode afetar especificamente a metilação genômica durante o cultivo de embriões. Esses achados corroboram estudos anteriores que demonstram a influência da melatonina na regulação epigenética em embriões clones suínos, interferindo tanto na metilação do DNA quanto nos perfis de abundância relativa de mRNA (Liang et al., 2017; Qu et al., 2020) Na análise da hiper/hipometilação dos alelos, observamos que no grupo CIV + Mlt no Satellite I, havia mais alelos hipometilados do que no grupo controle, corroborando os demais achados desse mesmo tratamento em outras análises comentadas acima.

A análise de metilação do Satellite I e LINE-1 revelou que alguns sítios específicos de CpG (DMCs) dentro desses elementos repetitivos foram hipometilados no grupo CIV + Mlt em comparação com o controle. Embora essas alterações não caracterizem uma região diferencialmente metilada (DMR), algumas das sequências em torno dessas DMCs mostraram alta semelhança com motivos/sequências conhecidos de ligação a fatores de transcrição, particularmente aqueles reconhecidos pelas proteínas da família PAX. A presença desses motivos sugere que tais regiões podem ser potenciais locais de ligação para fatores de transcrição PAX, cuja capacidade de se ligar ao DNA pode ser influenciada pelo estado de metilação da sequência alvo. Os membros da família de genes PAX, são os principais reguladores do desenvolvimento embrionário e da organogênese - incluindo músculos, rins, crista neural e formação de olhos (Noll, 1993; Dahl; Koseki; Balling, 1997; Wang et al., 2008; Blake; Ziman, 2014; Paixão-Côrtes; Salzano; Bortolini, 2015; Shaw; Barr; Üren, 2024). Além de seu papel clássico na ligação ao DNA e na regulação transcricional, as proteínas PAX podem recrutar complexos de remodelação da cromatina que influenciam a conformação da cromatina por meio de marcas de histonas ativadoras ou repressivas (Kim et al., 2009; Patrício et al., 2013; Mayran; Pelletier; Abraham et al., 2015; Drouin, 2015). Portanto, a hipometilação observada pode mediar a acessibilidade ou afinidade de ligação dos fatores PAX a essas regiões, influenciando a abundância relativa de mRNA, embora essa hipótese não tenha sido mais explorada no presente estudo.

Em conjunto, os dados sugerem que o efeito da melatonina nas marcas epigenéticas é dependente do estágio em que ela é adicionada ao sistema, o que reforça a importância do tempo em sua suplementação durante a produção de embriões *in vitro*. Notadamente, no grupo CIV +

Mlt, houve um aumento de transcritos de TET3 e uma diminuição nos transcritos de TET1 - enzimas envolvidas na desmetilação do DNA, respectivamente, acompanhadas por uma maior proporção de CpGs e alelos hipometilados na região Satellite I. Esses achados destacam a fase CIV como uma janela crítica para a regulação epigenética da melatonina.

5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo indicam que a suplementação com melatonina durante o cultivo *in vitro* (CIV) é a estratégia mais eficaz para promover o desenvolvimento embrionário bovino, quando comparada à suplementação em etapas isoladas ou durante todo o processo de PIVE. Entre os grupos tratados, o CIV + Mlt apresentou os efeitos mais consistentes, incluindo redução no acúmulo lipídico, aumento da atividade mitocondrial e alterações em marcadores epigenéticos, sugerindo uma ação multifatorial da melatonina. Esses achados demonstram, pela primeira vez em bovinos, que a melatonina regula positivamente o metabolismo lipídico e mitocondrial, além de influenciar mecanismos epigenéticos, contribuindo para a produção de embriões de maior qualidade e potencial de aplicação em programas de biotecnologia e reprodução assistida.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, Saji *et al.* The Groucho-associated Phosphatase PPM1B Displaces Pax Transactivation Domain Interacting Protein (PTIP) to Switch the Transcription Factor Pax2 from a Transcriptional Activator to a Repressor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 11, p. 7185–7194, mar. 2015.
- AGARWAL, Ashok *et al.* The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 49, 2012.
- AHMADI, Zahra; ASHRAFIZADEH, Milad. Melatonin as a potential modulator of Nrf2. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 11–19, fev. 2020.
- BAHADORI, Mohammad Hadi *et al.* Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo development in mice. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 11, n. 1, p. 11–18, jan. 2013.
- BARRETT, Perry; BOLBOREA, Matei. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 4, p. 376–388, maio 2012.
- BLAKE, Judith A.; ZIMAN, Melanie R. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. **Development**, v. 141, n. 4, p. 737–751, 15 fev. 2014.
- BRZEZINSKI, Amnon. Melatonin in Humans. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 3, p. 186–195, 16 jan. 1997.
- CASTELLO, Pablo R.; DRECHSEL, Derek A.; PATEL, Manisha. Mitochondria Are a Major Source of Paraquat-induced Reactive Oxygen Species Production in the Brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 19, p. 14186–14193, maio 2007.
- CAVALLARI, Fernanda De Castro *et al.* Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock and oxidative stress during *in vitro* maturation. **Zygote**, v. 27, n. 3, p. 180–186, jun. 2019.
- DAHL, Edgar; KOSEKI, Haruhiko; BALLING, Rudi. Pax genes and organogenesis. **BioEssays**, v. 19, n. 9, p. 755–765, set. 1997.

DE OLIVEIRA LEME, Ligiane *et al.* Reduction of nutrients concentration in culture medium has no effect on bovine embryo production, pregnancy and birth rates. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 4839, 9 fev. 2025.

DO, L. T. K. *et al.* Melatonin Supplementation During In Vitro Maturation and Development Supports the Development of Porcine Embryos. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 50, n. 6, p. 1054–1058, dez. 2015.

FIDELIS, Andrei Antonioni Guedes *et al.* Ethanolic Extract of Dried Leaves from the Cerrado Biome Increases the Cryotolerance of Bovine Embryos Produced In Vitro. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–16, 22 nov. 2020.

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

HAO, Tong *et al.* Melatonin improves the maturation and developmental ability of bovine oocytes by up-regulating GJA4 to enhance gap junction intercellular communication. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 33, n. 14, p. 760–771, nov. 2021.

ITO, Shinsuke *et al.* Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. **Nature**, v. 466, n. 7310, p. 1129–1133, 26 ago. 2010.

IZYUMOV, D. S. *et al.* Mitochondria as source of reactive oxygen species under oxidative stress. Study with novel mitochondria-targeted antioxidants — the “Skulachev-ion” derivatives. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, n. 2, p. 123–129, fev. 2010.

JIN, Jun-Xue *et al.* Melatonin regulates lipid metabolism in porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 62, n. 2, p. e12388, mar. 2017.

JIN, Jun-Xue *et al.* Melatonin Regulates Lipid Metabolism in Porcine Cumulus–Oocyte Complexes via the Melatonin Receptor 2. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. 687, 31 mar. 2022.

KANEDA, Masahiro *et al.* Comparison of DNA methylation levels of repetitive loci during bovine development. **BMC Proceedings**, v. 5, n. S4, p. S3, dez. 2011.

KIM, Doyeob *et al.* The Role of PTIP in Maintaining Embryonic Stem Cell Pluripotency. **Stem Cells**, v. 27, n. 7, p. 1516–1523, 1 jul. 2009.

KORKMAZ, Ahmet; REITER, Russel J. Epigenetic regulation: a new research area for melatonin? **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 1, p. 41–44, jan. 2008.

KUMAKI, Y.; ODA, M.; OKANO, M. QUMA: quantification tool for methylation analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server, p. W170–W175, 19 maio 2008.

KUSSANO, Nayara Ribeiro; FRANCO, Mauricio Machaim; DODE, Margot Alves Nunes. Biochemical profiling of the follicular environment to predict oocyte competence in cattle. **PLOS ONE**, v. 19, n. 3, p. e0298316, 11 mar. 2024.

KUWAYAMA, Masashige *et al.* Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, n. 3, p. 300–308, jan. 2005.

- LEE, Sanghoon *et al.* Synergistic effects of resveratrol and melatonin on in vitro maturation of porcine oocytes and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 114, p. 191–198, jul. 2018.
- LI, Qi *et al.* Melatonin Regulates the Expression of VEGF and HOXA10 in Bovine Endometrial Epithelial Cells through the SIRT1/PI3K/AKT Pathway. **Animals**, v. 14, n. 19, p. 2771, 25 set. 2024.
- LIANG, Shuang *et al.* Melatonin enhances the developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos by preventing DNA damage induced by oxidative stress. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11114, 11 set. 2017.
- LINOWIECKA, Kinga *et al.* Melatonin: A Potential Regulator of DNA Methylation. **Antioxidants**, v. 12, n. 6, p. 1155, 25 maio 2023.
- LIRA, Alan Da Silva *et al.* Use of Melatonin in the In Vitro Production of Bovine Embryos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 21, p. e210322020, 2020.
- LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes. *In*: GARRIDO-RAMOS, M. A. (Org.). **Genome Dynamics**. [S.l.]: S. Karger AG, 2012. v. 7 p. 1–28.
- LUVONI, Gaia C.; KESKINTEPE, Levent; BRACKETT, Benjamin G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, n. 4, p. 437–443, abr. 1996.
- MACHADO, G. M. *et al.* Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289–1297, maio 2009.
- MARQUES, Tc *et al.* Melatonin reduces apoptotic cells, SOD 2 and HSPB 1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 226–236, fev. 2018.
- MARQUES, Thaisa Campos *et al.* Blastocoel fluid removal and melatonin supplementation in the culture medium improve the viability of vitrified bovine embryos. **Theriogenology**, v. 160, p. 134–141, jan. 2021.
- MAYRAN, Alexandre; PELLETIER, Audrey; DROUIN, Jacques. Pax factors in transcription and epigenetic remodelling. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 44, p. 135–144, ago. 2015.
- MENDONÇA, Anelise Dos Santos *et al.* Characterization of the IGF2 Imprinted Gene Methylation Status in Bovine Oocytes during Folliculogenesis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0142072, 30 out. 2015.
- MONTGOMERY, Ty; UH, Kyungjun; LEE, Kiho. TET enzyme driven epigenetic reprogramming in early embryos and its implication on long-term health. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 1358649, 1 ago. 2024.
- NOLL, Markus. Evolution and role of Pax genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 3, n. 4, p. 595–605, jan. 1993.

- OKANO, M. *et al.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247–257, 29 out. 1999.
- PAIXÃO-CÔRTEZ, Vanessa R.; SALZANO, Francisco M.; BORTOLINI, Maria Cátira. Origins and evolvability of the PAX family. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 44, p. 64–74, ago. 2015.
- PANG, S. F. *et al.* Neuroendocrinology of melatonin in reproduction: recent developments. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 14, n. 3–4, p. 157–166, jun. 1998.
- PAPIS, Krzysztof *et al.* Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 4, p. 321–326, nov. 2007.
- PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859–869, out. 1995.
- PATRÍCIO, Patrícia *et al.* Deregulation of PAX 2 expression in renal cell tumours: mechanisms and potential use in differential diagnosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 8, p. 1048–1058, ago. 2013.
- PEZER, Ž. *et al.* Satellite DNA-Mediated Effects on Genome Regulation. *In: GARRIDO-RAMOS, M. A. (Org.). Genome Dynamics. [S.l.]: S. Karger AG, 2012. v. 7 p. 153–169.*
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–445, 1 maio 2001.
- RODRIGUEZ, Carmen *et al.* Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, n. 1, p. 1–9, jan. 2004.
- RODRIGUEZ-OSORIO, N. *et al.* Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 3, p. 283–288, out. 2007.
- SHAW, Taryn; BARR, Frederic G.; ÜREN, Aykut. The PAX Genes: Roles in Development, Cancer, and Other Diseases. **Cancers**, v. 16, n. 5, p. 1022, 29 fev. 2024.
- SILVEIRA, Márcia Marques *et al.* DNA methylation profile at a satellite region is associated with aberrant placentation in cloned calves. **Placenta**, v. 70, p. 25–33, out. 2018.
- SOVERNIGO, Tc *et al.* Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 561–569, ago. 2017.
- SPADAFORA, Corrado. A LINE-1–encoded reverse transcriptase–dependent regulatory mechanism is active in embryogenesis and tumorigenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1341, n. 1, p. 164–171, abr. 2015.
- SU, Jianmin *et al.* Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 4, p. 455–468, nov. 2015a.

- SU, Jianmin *et al.* Melatonin significantly improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 4, p. 455–468, nov. 2015b.
- TIAN, XiuZhi *et al.* Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 3, p. 239–247, out. 2014.
- TUTT, Desmond A. R. *et al.* Developmental, cytogenetic and epigenetic consequences of removing complex proteins and adding melatonin during in vitro maturation of bovine oocytes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, p. 1280847, 23 out. 2023.
- VANDESOMPELE, Jo *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034.1, 18 jun. 2002.
- VASCONCELOS, Erlandia M. *et al.* Impact of reducing lipid content during in vitro embryo production: A systematic review and meta-analysis. **Theriogenology**, v. 222, p. 31–44, jul. 2024.
- WANG, Feng *et al.* Melatonin Improves the Quality of In Vitro Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93641, 2 abr. 2014.
- WANG, Qiuyu *et al.* Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2281–2294, dez. 2008.
- WANG, Shujuan *et al.* The effects of melatonin on bovine uniparental embryos development *in vitro* and the hormone secretion of COCs. **PeerJ**, v. 5, p. e3485, 7 jul. 2017.
- XU, Yao *et al.* Protective Effects of Melatonin Against Zearalenone Toxicity on Porcine Embryos in vitro. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 327, 5 abr. 2019.
- YANG, Jinyu *et al.* Melatonin promotes in vitro maturation of vitrified-warmed mouse GV oocytes potentially by modulating MAD2 protein expression of SAC component through MTRs. **Cryobiology**, v. 102, p. 82–91, out. 2021.
- YANG, Minghui *et al.* Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2059, 27 nov. 2017.
- ZHANG, Jian *et al.* TET3 overexpression facilitates DNA reprogramming and early development of bovine SCNT embryos. **Reproduction**, v. 160, n. 3, p. 379–391, set. 2020.
- ZHAO, Xue-Ming *et al.* Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 1, p. e12445, jan. 2018.