



CURSO DE BACHARELADO DE ZOOTECNIA

VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* COM ADIÇÃO DE MELATONINA AO MEIO DE TRANSPORTE

NIVALDO RIBEIRO DE ALMEIDA NETO

Rio Verde, GO

2018

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE**

CURSO DE BACHARELADO DE ZOOTECNIA

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*
COM ADIÇÃO DE MELATONINA AO MEIO DE TRANSPORTE**

NIVALDO RIBEIRO DE ALMEIDA NETO

Trabalho de curso apresentado ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharel em Zootecnia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Karen Martins Leão

Rio Verde – GO

Novembro, 2018

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

A469v Almeida Neto, Nivaldo Ribeiro de
VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN
VITRO COM ADIÇÃO DE MELATONINA AO MEIO DE TRANSPORTE
/ Nivaldo Ribeiro de Almeida Neto; orientadora Karen
Martins Leão; co-orientadora Marco Antônio Pereira da
Silva. -- Rio Verde, 2018.
38 p.

Monografia (em Bacharelado em Zootecnia) --
Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2018.

1. Antioxidante. 2. Fertilização in vitro. 3.
Transporte embrionário. 4. Vacas. I. Leão, Karen
Martins, orient. II. Silva, Marco Antônio Pereira da,
co-orient. III. Título.



INSTITUTO FEDERAL

Goiano

Repositório Institucional do IF Goiano - RIIF Goiano
Sistema Integrado de Bibliotecas

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Nivaldo Ribeiro de Almeida Neto

Matrícula: 2014102201840078

Título do Trabalho: Viabilidade de embuções bovinas produzidos in vitro com adição de melatonina ao meio de transporte

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 10/03/20

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde 06/02/20
Local Data

Nivaldo Ribeiro de Almeida Neto
Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

KP
Assinatura do(a) orientador(a)

NIVALDO RIBEIRO DE ALMEIDA NETO

VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* COM ADIÇÃO DE MELATONINA AO MEIO DE TRANSPORTE

Trabalho de Curso DEFENDIDO e APROVADO em 29 de Novembro de 2018, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Dr^a. Thaisa Campos Marques
Médica Veterinária



Prof. Dr. Marco Antônio Pereira da Silva
Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde



Prof^a. Dr^a Karen Martins Leão
Instituto Federal Goiano
Campus Rio Verde – GO
Orientadora

DEDICATÓRIA

Agradeço a minha professora orientadora Dr^a. Karen Martins Leão que teve paciência e que me ajudou bastante dentro e fora do curso, agradeço também aos meus professores que durante muito tempo me ensinaram e que me mostraram o quanto estudar é importante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram nesta caminhada em especial a Professora Doutora Karen Martins Leão que me ajudou em coisas possíveis e impossíveis nesta caminhada me ensinando a nunca desistir.

A minha linda Ricliany Eliezarado Silva que esteve e estará presente nessa longa jornada e sei que sempre vai estar me apoiando ao meu lado.

Agradeço também ao pessoal do Laboratório de Reprodução Animal que sem eles não seria possível à conclusão deste estudo.

A Viler Carrijo Oliveira e Mariana da Mata Silveira que passamos muito tempo juntos no experimento e que considero pessoas muito importantes que vou levar para a vida toda.

Aos meus colegas de sala que mesmo passando por vários desafios estiveram presentes pra me auxiliar, em especial o Wayron Araujo de Castro, Hanyeny Raiely Leite Silva e Pâmella de Souza Couto.

A todos os professores que me acompanharam nesta graduação agradeço de coração.

Ao Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, que me possibilitou realizar esta graduação, e deu suporte para me manter durante ela.

A CAPES, CNPq e a FAPEG pela bolsa de iniciação científica e financiamento das pesquisas, sendo elas fundamentais para minha aprendizagem.

NETO, Nivaldo Ribeiro de Almeida. **Viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* com adição de melatonina ao meio de transporte.** 2018. 38p. Monografia (Curso de Bacharelado de Zootecnia). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Rio Verde – GO, 2018.

O uso do antioxidante melatonina ao meio de cultivo, pode proporcionar melhoria na qualidade dos embriões, favorecendo seu desenvolvimento. Neste contexto objetivou-se avaliar o efeito da adição de melatonina ao meio de transporte sobre o desenvolvimento de embriões bovinos, frescos, produzidos *in vitro*, mantidos a 36°C por 6, 9 ou 12 horas. Os embriões bovinos produzidos *in vitro* foram envasados em palhetas de 0,25mL, em meio de manutenção contendo ou não o antioxidante melatonina 10⁻⁹M ao meio de transporte SOFaa e mantidos em transportadora de embriões com temperatura de 36°C por 6, 9 ou 12 horas. Após desenvase os embriões foram avaliados, e posteriormente recultivados em meio de cultivo em estufa de CO₂ a 38°C. Repetiu-se as avaliações após 24, 48 e 72 horas após envase dos embriões em recultivo. Avaliou-se o percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MANT), que desenvolveram (DES), degeneraram (DEG) e eclodiram (ECLO). Para análise estatística foi utilizado o Teste de Q-Quadrado (p≤0,05) utilizando programa R versão 3.5.0. Na avaliação após 24 horas observou-se uma menor taxa de DEG no tratamento sem melatonina mantido por 12 horas em meio de manutenção (Controle 12). Com 72 horas não foi observado diferença entre os tratamentos em nenhum dos parâmetros avaliados. Conclui-se que o antioxidante melatonina 10⁻⁹M no meio de transporte não teve efeito benéfico sobre a viabilidade de embriões produzidos *in vitro* mantidos por até 12 horas em meio de transporte HSOfaa.

Palavras-chave: Antioxidante, Fertilização *in vitro*, Transporte embrionário, Vacas.

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AGRODEFESA	Agência Goiana de Defesa Agropecuária
Bi	Blastocisto Inicial
Be	Blastocistos Eclodidos
Bl	Blastocisto
Bx	Blastocisto Expandido
CAT	Catalase
CCO's	Células do Cumulus Oócitos
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
COOPERCARNE	Cooperativa dos Comerciantes de Carne do Estado de Goiás
DEG	Degeneraram
DES	Desenvolveram
D0	Dia zero
D3	Dia três
D7	Dia sete
ECLO	Eclodidos
EROS	Espécies Reativas de Oxignio
ERNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
FIV	Fecundao <i>in vitro</i>
GPX	Glutathione peroxidase
IA	Inseminao Artificial
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IFNT	Interferon-tau
M	Molar
MAN	Mantiveram
mL	Mililitro
MIV	Maturao <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mm	Milimetro
NaCl	Cloreto de sódio

PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
SFB	Soro Fetal Bovino
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
v/v	Volume por volume

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – (A) Ovários mantidos em banho maria a 36°C, (B) aspiração folicular e (C) CCO's depositados em tubo cônico de poliestireno a 36°C para decantação.	20
FIGURA 2. (A) Placa de petri onde é realizada a seleção dos oócitos de grau i e ii; (b), classificação dos oócitos quanto ao grau de maturação, i: oócito grau i; ii: oócito grau ii,(c) gotas de 200 µl de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placa de petri; (d) estufa a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO ₂ e umidade relativa saturada sem condensação. fonte: arquivo pessoa, (2018).....	21
FIGURA 3. (A) Descongelador a 35°C, (b) coluna de percoll.	22
FIGURA 4. Etapas da produção <i>in vitro</i> de embriões.....	23
FIGURA 5. Estágios de desenvolvimento dos embriões. (a) blastocisto inicial, (b) blastocisto; (c) blastocisto expandido, (d) blastocisto em eclosão, (e) blastocisto eclodido.....	23
FIGURA 6. Transportadora de embriões.	24
FIGURA 7. Definição dos tratamentos após a produção <i>in vitro</i> de embriões.	24
FIGURA 8. Período de transporte e recultivo dos embriões após o desenvase de cada tratamento. fonte: arquivo pessoal, (2018).	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de embriões bovinos produzidos *in vitro* mantidos a 36°C por seis, nove e doze horas em simulação de transporte em meio de manutenção suplementado ou não com o antioxidante melatonina, que eclodiram (ECLO), que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MAN), que desenvolveram de estágio (DES) e que degeneraram (DEG) após o desenvase e 24 horas de recultivo. 27

Tabela 2 – Percentual de embriões bovinos produzidos *in vitro* mantidos a 36°C por seis, nove e doze horas em simulação de transporte em meio de manutenção suplementado ou não com o antioxidante melatonina, que eclodiram (ECLO), que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MAN), que desenvolveram de estágio (DES) e que degeneraram (DEG) após 48 e 72 horas de recultivo..... 28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	14
2.2 TRANSPORTE DE EMBRIÕES	16
2.3 MELATONINA	17
2.4 MELATONINA NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	20
3.2 ENVASE MANUTENÇÃO E RECVTIVO DOS EMBRIÕES	23
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
5 CONCLUSÃO.....	29
6 REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos comerciais no mundo, com aproximadamente 214,9 milhões de bovinos (IBGE, 2017). A pecuária brasileira possui papel de destaque na economia, com diversas ferramentas que contemplam as biotecnologias da reprodução, como inseminação artificial (IA), produção *in vitro* de embriões (PIVE), e transferência de embriões (GONÇALVES et al., 2008). Segundo BOLS et al. (2012) o aperfeiçoamento das biotecnologias da reprodução no Brasil permitiu sua aplicação em grande escala e a exportação de material genético para diversos países latino-americanos e de outros continentes.

A PIVE é uma técnica de reprodução que permite o co-cultivo de gametas em ambiente laboratorial para geração do zigoto, e o cultivo até o estágio de desenvolvimento embrionário desejado. Também proporciona à formação de um novo indivíduo por meio da penetração do espermatozoide no oócito fora do trato reprodutivo da fêmea usando diversos procedimentos integrados, que vão desde o manejo reprodutivo das doadoras e receptoras, punção folicular guiada por ultrassom, procedimentos no laboratório envolvendo etapas de coleta e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias até a transferência dos embriões. Portanto, trata-se de um processo que demanda planejamento e equipe especializada (RIZOS et al., 2008).

Alguns problemas da PIVE envolvem o desenvolvimento inferior dos embriões até blastocisto, menor resistência dos embriões à criopreservação, perdas fetais e embrionárias após transferência, dificuldades no período periparto (distocias, mortalidade natal e pós-natal) ocorrência de mudanças congênitas (VAN et al., 2006). Os embriões produzidos *in vitro* também apresentam menor número de células e ultraestrutura diferente dos produzidos *in vivo*, pois apresentam mais lipídeos, menos microvilosidades e mais debris celulares, causando assim diminuição da qualidade embrionária com redução do tempo para transferência na receptora (DE LA FUENTE et al., 1997; RIZOS et al., 2002a; RIZOS et al., 2002b).

O Brasil possui grande extensão territorial e enorme distância entre as propriedades onde ficam situados os animais e os laboratórios de PIVE. E este fato tem limitado a expansão da produção *in vitro* comercial, principalmente pelas condições e tempo gasto com o transporte dos oócitos e dos embriões (ALVES et al., 2003; TESSMANN et al., 2004).

Embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis que os produzidos *in vivo* devido ao sistema de produção que ocorre em altas concentrações de oxigênio ambiente, e

consequentemente à ação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que provocam lesões celulares (AGARWAL et al., 2006).

Dessa forma, o transporte deve ocorrer em meio de manutenção que permita o desenvolvimento em menor período possível para evitar o estresse oxidativo. É conhecido que o tempo gasto nestes transportes pode interferir diretamente na viabilidade dos embriões e nas taxas de gestação (MARINHO et al., 2012).

Neste contexto, estudos têm relatado que a inclusão de antioxidantes melatonina (WANG et al., 2014) ao meio de maturação e meio de cultivo pode reduzir o estresse oxidativo e promover melhores condições de desenvolvimento embrionário (TIAN et al., 2014).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é derivada do aminoácido triptofano e sintetizada pela glândula pineal e outros locais extra-pineais como olho e ovário. Tem sido alvo de estudos para produção *in vitro* de embriões bovinos (ZHAO et al., 2016), pois atua diretamente sobre as EROS, estimula a ação de enzimas antioxidantes endógenas como a superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase e catalase, e inibe a ação de enzimas pró-oxidantes como a cicloxigenase (ANISIMOV et al., 2006).

Portanto, objetivou-se avaliar o efeito da adição de melatonina ao meio de transporte, sobre o desenvolvimento de embriões bovinos, frescos, produzidos *in vitro*, mantidos a 36°C por seis, nove ou doze horas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de embriões

Dentre as diversas biotecnologias presentes no mundo, uma com grande abrangência de uso genético é a produção *in vitro* de embriões (PIVE), que promove redução do espaço entre gerações, e apuramento do material genético de machos e fêmeas reconhecidos como geneticamente superiores (MELLO et al., 2016).

Esta biotécnica permite a utilização de fêmeas, a partir dos seis meses de idade, no primeiro terço de gestação e de alto valor genético que não estão aptas a produzirem descendentes pelos métodos convencionais, além de possibilitar o aumento do número de embriões produzidos em menor tempo e melhor viabilidade da utilização do sêmen sexado (BUENO e BELTRAN., 2008).

Entretanto, os embriões de PIVE possuem baixo índice de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, menor resistência às técnicas de criopreservação, maiores perdas embrionárias e fetais após transferência e problemas no parto, como prolongamento da gestação, distocia e mortalidade (VAN et al., 2006).

Embriões *in vitro* se diferem de embriões *in vivo* em características físicas e morfológicas, associadas a menor resistência à criopreservação dos embriões PIVE (ABE et al., 2002).

Observa-se entre as diferenças, que o embrião *in vitro* possui maior quantidade de vacúolos, reduzida expressão de comunicações celulares, menor número de células totais e tamanho de disco embrionário, compactação menos pronunciada e zona pelúcida mais frágil. Além de maior acúmulo intracelular de lipídeos (CROSIER et al., 2001) e diferente expressão de genes importantes para o desenvolvimento (MUNDIM et al., 2009).

Para a PIVE a colheita de oócitos pode ser realizada por método *post mortem*, a partir da punção de ovários de abatedouro ou vacas de alto valor genético que venham a óbito, e *in vivo* por meio de laparotomia via flanco, ou também laparoscopia vaginal (MELLO et al., 2016) e aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – *Ovum Pick Up* (OPU) (VARAGO et al., 2008). A OPU é o método de eleição para obtenção de oócitos *in vivo* em bovinos, devido ao processo menos invasivo e mais flexível (GONÇALVES et al., 2007). Na PIVE são necessárias diversas etapas, colheita e maturação *in vitro* (MIV) dos ovócitos, fecundação *in*

vitro (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias fora do útero animal (GONÇALVES et al., 2008).

Na MIV, diferentes meios e protocolos vêm sendo estudados, sendo o meio mais disseminado o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199[®]), geralmente suplementado com lactato, piruvato, bicarbonato de sódio, aminoácidos, vitaminas, antibióticos e hormônios (GANDHI et al., 2000), incubado em estufa com atmosfera gasosa controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada e temperatura de 39° C (GONÇALVES et al., 2007).

A produção embrionária é afetada principalmente pela do ovócito imaturo e composição do meio de maturação. A maturação ovocitária completa envolve a maturação nuclear, com extrusão do corpúsculo polar e reinício da meiose, maturação citoplasmática, onde ocorre rearranjo de organelas, e maturação molecular, com aumento na produção de RNA mensageiro e moléculas importantes para o futuro embrião. Dessa forma, para que essas etapas ocorram fisiológica e cronologicamente corretas, o meio de maturação é vital para a maturação nuclear, clivagem e formação de blastocistos (BLANCO et al., 2011; SIRARD et al., 2001).

Na etapa da FIV o ovócito chega ao fim da maturação, e assim está preparado para ser fecundado fundindo-se com o espermatozoide capacitado, iniciando assim excitose dos grânulos corticais e retomada da meiose, onde o núcleo espermático é desenovelado gerando o pró-núcleo masculino, que se movimenta para o centro do ovócito, desenovela-se ocorrendo à associação dos cromossomos para ocorrer à primeira divisão mitótica (YANAGIMACHI., 1994). As condições desta etapa expõem os espermatozoides, embriões e ovócitos a ficarem sem o abrigo da tuba uterina causando o desequilíbrio da redox, levando à ação das EROS, causando efeitos deterioradores no reparo do DNA, organização do fuso mitótico e maturação do ovócito (KITAGAWA et al., 2004; AGARWAL et al., 2006; GUÉRIN et al., 2001).

Para a fecundação *in vitro* utiliza-se sêmen de uso comercial convencional, congelado de touros com fertilidade testada. Após descongelamento do sêmen em banho-maria a 35°C por 30 segundos, são avaliados os teores de motilidade e vigor, depois de avaliados são depositados sobre a coluna de gradiente Percoll, que é constituído por partículas de sílica coloidal de 15nm-30 nm de diâmetro, envolto com polivinilpirrolidona (PVP). Com este procedimento, diferentes concentrações são preparadas para que seja criado o gradiente necessário, assim o sêmen é colocado acima desses diferentes gradientes e centrifugado para haver a separação dos espermatozoides vivos dos demais integrantes (PARRISH et al., 1995).

Entre essas etapas existe o período de pré-implantação, que assimila o intervalo entre a fecundação do oócito e implantação do conceito, é representado por clivagens sucessivas do

zigoto e estádios embrionários iniciais, tendo também ativação da transcrição embrionária e eventos morfogênicos de compactação e cavitação, que culminam com a formação do blastocisto (WATSON et al., 2004).

Entretanto, existem as perdas na fase pré-implantacional em ruminantes, tendo inúmeros fatores que podem ocorrer devido a problemas específicos ao próprio embrião ou ao ambiente uterino. Porém, considera-se que a principal causa de mortalidade embrionária esteja relacionada à ocorrência de problemas de sinalização concepto-maternal da gestação. Esta condição poderia propiciar o desenvolvimento assincrônico do embrião, ou mesmo o retardamento no seu crescimento, contudo falha na produção de concentrações fisiológicas de interferon-tau (IFNT) (SPENCER et al., 2004).

O CIV é considerado a principal etapa para determinação da eficiência do sistema (GALLI et al., 2003), visto que, geralmente de todos os oócitos submetidos a incubação, 90% atingem a maturação, desses, 80% são fecundados, mas apenas 25% a 40% alcançam o estágio de blastocisto (LONERGAN et al., 2001).

2.2 Transporte de embriões

Alguns fatores podem causar limitações na produção *in vitro* de embriões, como a distância entre os principais laboratórios de produção *in vitro* que estão e as fazendas produtoras de gado. O tempo gasto nestes transportes pode interferir diretamente na viabilidade dos embriões e nas taxas de prenhes (MARINHO et al., 2012; ALVES et al., 2003).

Uma escolha para longas distâncias é o transporte de embriões no próprio meio de cultivo, com controle da atmosfera gasosa, em incubadora portátil. Os embriões são transportados em diferentes estádios de desenvolvimento de maneira que o fim do transporte coincida com o fim do cultivo (PONTES et al., 2010). O uso de incubadoras portáteis ligadas a uma bateria para transporte dos ovócitos e embriões tem como objetivo, simular as etapas de MIV e CIV em laboratório, fazendo com que permita-se tanto a maturação dos ovócitos, quanto o cultivo dos embriões, enquanto estes são transportados, o que viabiliza a execução de todo o processo de produção *in vitro* sem nenhuma interrupção até o período de transferências as receptoras (MAX et al., 2012).

Os estudos relacionados ao transporte de embriões ainda são escassos e os que existem na literatura obtiveram diferentes resultados (ALVES et al., 2003; ARRUDA et al. 2012). Simulando o transporte de palhetas de 0,25 mL RAMOS et al., (2006) observaram que por até

12 horas não houve interferência na viabilidade embrionária quando avaliada a taxa de eclosão dos embriões.

Contudo, realizando experimento com o transporte em palhetas de 0,25mL com 50mL de meio SOF acrescido de 5% soro de vaca em estro, BRUM et al, (2002) não encontraram diferença em relação a taxa de eclosão e números de células quando comparado com o cultivo em placas, demonstrando ser uma forma prática, em que os blastocistos bovinos podem continuar o desenvolvimento enquanto são transportados por longas distâncias para serem transferidos.

Sendo assim, também é uma alternativa viável o transporte de embriões durante estádios iniciais de desenvolvimento, no próprio meio de cultivo, levando em consideração o tempo e a distância, e os estádios de desenvolvimento que se encontram de forma que o fim do transporte coincida com o fim do cultivo, ou seja, o dia sete da CIV, sendo o dia zero o dia da FIV. Sendo assim uma das últimas atividade do desenvolvimento ocorre durante o transporte, efetuado em incubadoras portáteis simulando condições intrauterinas (PONTES et al., 2010).

2.3 Melatonina

Segundo HALLIWELL & GUTTERIDGE, (1999), os antioxidantes podem ser estabelecidos como alguma substância que em pequenas dosagens se associada àquela do substrato oxidável, adia ou previne consideravelmente a oxidação daquele substrato.

O metabolismo celular, produz espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS), que regulam diversas funções celulares. As espécies reativas, no entanto, são altamente reativas com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em perda de integridade da membrana, alterações estruturais ou funcionais nas proteínas e danos nos ácidos nucleicos, chamados de estresse oxidativo (DEVINE et al., 2012).

Para evitar os danos causados pelas espécies reativas, as células possuem uma série de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) catalase (CAT). O equilíbrio entre as EROS e antioxidantes dentro do folículo parece ser crítico para o funcionamento das células do oócito e granulosa (GARCÍA et al., 2011; COCCHIA et al., 2015; ADRIAENS et al., 2006).

A melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio natural sintetizado pela glândula pineal de mamíferos (STEHLE et al., 2011) e alguns órgãos reprodutivos periféricos (REITER et al., 2014), incluindo as células da granulosa, células do cumulus, e

oócitos, exerce várias atividades biológicas, incluindo antioxidação, (REITER et al., 2016) defesa imune, (CALVO et al., 2013) e efeitos anticancerígenos (CUCINA et al., 2009).

Esse hormônio pode ter papel importante na reprodução, pois geralmente é aceito que a melatonina atua diretamente a função ovariana, há também expressão do receptor de melatonina nas células do ovário e presença de melatonina no fluido folicular ovariano que excede até os níveis sanguíneos sustentam um papel da melatonina nos processos reprodutivos (TAMURA et al., 2009; LEE et al., 2001; SOARES et al., 2003; REITER et al., 2014).

Há múltiplas ações da melatonina em vários processos fisiológicos diferentes que são mediadas por receptores de membrana da melatonina (CUTANDO et al., 2011; REZZANI et al., 2006) ou por um mecanismo antioxidante indireto que elimina os radicais livres (GALANO et al., 2013; MANCHESTER et al., 2015).

Tem se observado que a melatonina atua livrando as células dos radicais livres e tem aumentado o entendimento de mecanismos e benefícios sobre a fisiologia reprodutiva. Sendo que quando a melatonina está presente na quantidade adequada pode atuar nas EROS, as quais são produzidas localmente durante o processo e parecem ter um papel essencial na ruptura do folículo. Entretanto, o excesso de EROS neste período da ovulação, também pode ser responsável por estresse oxidativo, sendo este um agente que pode danificar as células da granulosa e ovócitos dentro do folículo (GALANO et al., 2013).

2.4 Melatonina na produção *in vitro* de embriões

A ação do antioxidante melatonina na técnica de produção *in vitro* de embriões tem sido objetivo de diversos estudos (GALANO et al., 2013; JOHNS et al., 2014).

Dependendo das concentrações utilizadas a melatonina consegue melhorar o desenvolvimento pré-implantação e criotolerância de embriões humanos (ERYILMAZ et al., 2011), camundongos (WANG et al., 2013; GAO et al., 2012), ovinos (VÁZQUEZ et al., 2010; SUCCU et al., 2014), suínos (SHI et al., 2009), búfalos (MANJUNATHA et al., 2009), coelhos (MEHAISEN et al., 2015) e bovinos (WANG et al., 2014; ZHAO et al., 2015).

Segundo TIAN et al. (2014) as vantagens da melatonina sobre a maturação do ovócito bovino são permeados por receptores de membrana como o agonista do receptor de melatonina, enquanto o opositor do receptor de melatonina (luzindol) inibe os efeitos, também foi demonstrado que o uso da melatonina na maturação do ovócito bovino aumenta

consideravelmente as expressões de genes associados à maturação ovocitária e de genes relacionados com a expansão das células do cumulus.

Há melatonina também é relatada como fator chave nas condições de cultivo *in vitro* de embriões pré-implantação devido a capacidade de eliminar radicais livres além de atuar como antioxidante e como agente anti-apoptótico (WANG et al ., 2012; WANG et al ., 2013).

Segundo MANJUNATHA et al. (2009) a suplementação de melatonina no meio de CIV nas concentrações de 10 a 50 μM resultou em maior taxa de clivagem de embriões bubalinos transferíveis, quando comparado com 5 μM e o tratamento controle. Sendo que com o uso embriões de coelhos, a adição na concentração de 10^{-3} M aumentou a taxa de blastocistos, mas em menor concentração (10^{-6} M) as taxas de blastocisto e eclodibilidade 48 horas pós-inseminação foram mais altas (MEHAISEN et al., 2013).

Neste contexto MARQUES et al. (2016) também constataram que a adição de melatonina no meio de cultivo na concentração 10^{-9} M, melhorou significativamente a qualidade de embriões, propiciando a manutenção do equilíbrio redox do ambiente intracelular permitindo que a expressão metabólica e gênica favorecesse o desenvolvimento embrionário. No entanto, também foi notado que o efeito contrário ocorre em decorrência do excesso ou insuficiência da melatonina, seja concentração impropria ou pelo momento da PIVE em que foi adicionada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, com aprovação da comissão de ética pelo uso de animais do Instituto Federal Goiano, protocolo número 5391020718.

3.1 Produção *in vitro* de embriões

Para execução do experimento, foram utilizados ovários bovinos colhidos do abatedouro municipal (COOPERCARNE – Cooperativa dos Comerciantes de Carne do Estado de Goiás), com serviço de inspeção estadual (SIE) pela Agência Goiana de Defesa Agropecuária (AGRODEFESA). Logo após o abate e evisceração dos animais os ovários eram removidos e mantidos em solução salina 0,9% NaCl a 35°C, dentro de uma garrafa térmica e transportados ao laboratório e processados em até 4 horas. Folículos com 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados com o auxílio de seringa descartável de 10 mL e agulha hipodérmica descartável calibre 18G (40x12 mm) para a retirada dos complexos cumulus-oócitos (CCO's). Estes foram armazenados em tubos cônicos de poliestireno e mantidos em banho-maria a 36°C por 10 minutos até a decantação como apresentados na Figura 1.

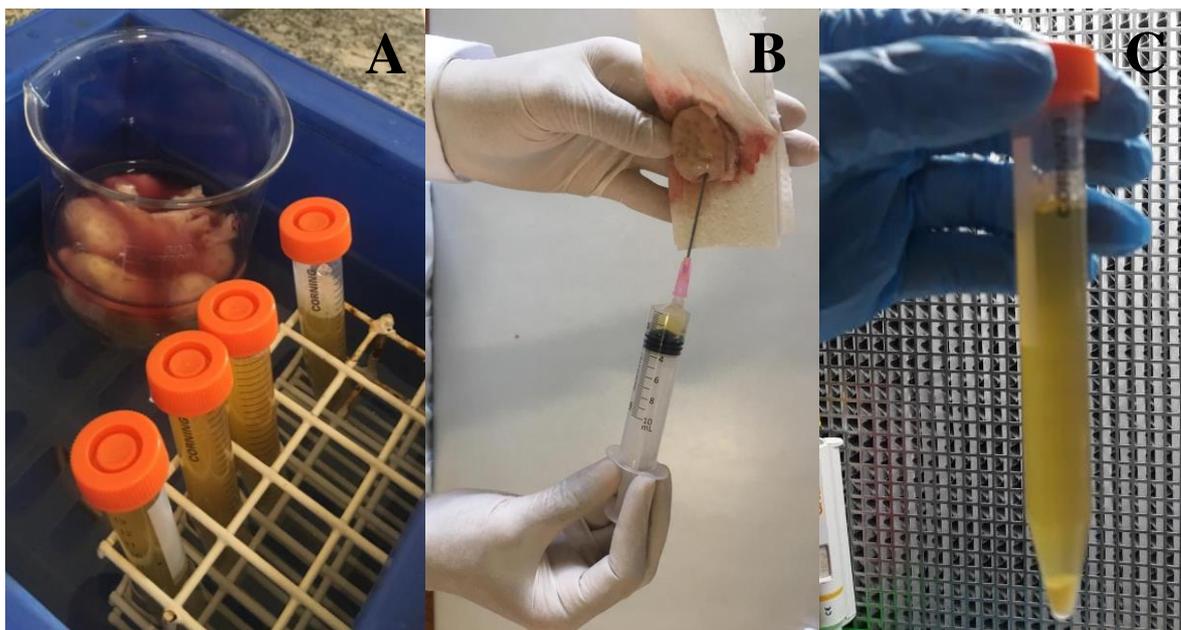


Figura 1 – (A) Ovários mantidos em banho maria a 36°C, (B) aspiração folicular e (C) CCO's depositados em tubo cônico de poliestireno a 36°C para decantação.

Fonte: Arquivo pessoal, (2018).

Maturação in vitro (MIV)

Grupos de 30 a 35 CCO's com qualidade grau I e II, segundo STOJKOVIC et al. (2001) foram selecionados, lavados e incubados em gotas de 200 μ L de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placa de petri, por 24 horas em incubadora a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação como demonstrado na figura 2.

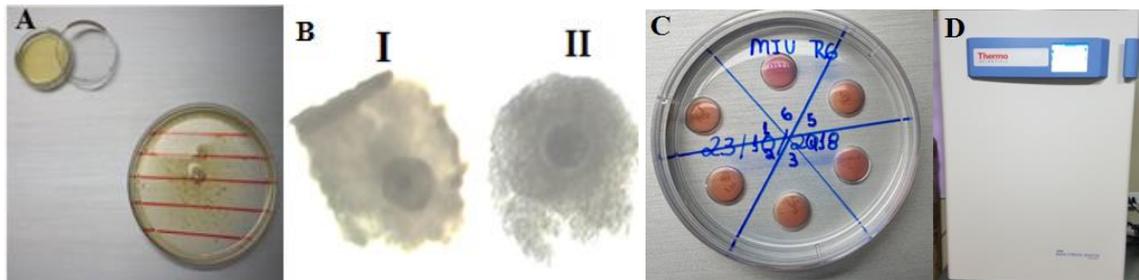


Figura 2. (A) Placa de petri onde é realizada a seleção dos oócitos de grau I e II; (B), Classificação dos oócitos quanto ao grau de maturação, I: oócito grau I; II: oócito grau II, (C) Gotas de 200 μ L de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placa de petri; (D) estufa a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação. Fonte: Arquivo pessoa, (2018).

Fertilização in vitro (FIV)

Após o período de maturação, os CCO's foram lavados em meio de fecundação (FEC) e transferidos para gotas de 200 μ L do mesmo meio e cobertas com óleo mineral. Para a fertilização *in vitro*, o sêmen de um touro com fertilidade conhecida foi descongelado a 35°C por 30 segundos, depositado sobre coluna de gradiente Percoll 45-90% segundo metodologia adaptada (PARRISH et al., 1995) e centrifugado a 6000 rpm (1613g) por 6 minutos como pode ser observado na Figura 3. O sedimento de espermatozoides foi ressuspensionado em 1,0 mL de meio CAP e centrifugado a 6000 rpm (1613g) por 2 minutos.

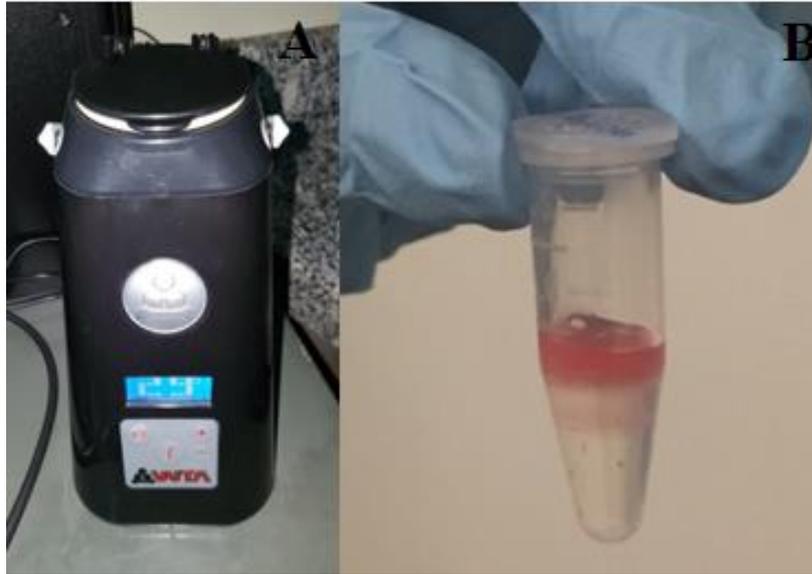


Figura 3. (A) Descongelador a 35°C, (B) Coluna de Percoll.
 Fonte: Arquivo pessoal, (2018).

O pellet formado foi diluído em 100 μL de meio de fecundação. Após observação da motilidade do vigor, cada gota foi fertilizada com uma concentração final de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides vivos/mL. O volume da dose inseminante é calculado considerando o volume da gota (μL) dividido pela concentração média encontrada na câmara de Neubauer, dividido pela motilidade final. As placas eram mantidas em incubadora a 38,5°C em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO_2) e umidade relativa saturada sem condensação por 24 horas.

Cultivo in vitro (CIV)

Após retirada parcial das células do cumulus por sucessivas pipetagens, os possíveis zigotos passaram por lavagem e foram transferidos para gotas de 200 μL de meio de cultivo sob óleo mineral por sete dias (D7) a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO_2 e umidade relativa saturada sem condensação. No terceiro dia (D3), metade do meio de cultivo de cada gota foi substituído, como maneira de realimentar os prováveis zigotos.

Para produção *in vitro* de embriões as etapas foram realizadas sequencialmente, portanto, foi realizado primeiramente a MIV no dia -1, no dia zero (D0) foi realizada a FIV e após 24 horas foi realizada a CIV, no dia três (D3) realizou-se a avaliação da taxa de clivagem, já no dia 7 (D7) foi avaliada a taxa de blastocistos, estágio de desenvolvimento, qualidade morfológica e envase dos embriões. As etapas da PIVE estão esquematizadas na Figura 4.

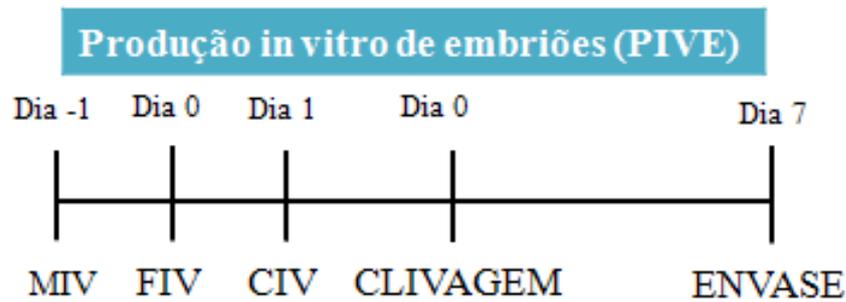


Figura 4. Etapas da produção in vitro de embriões.

Fonte: Arquivo pessoal, (2018).

3.2 Envase, manutenção e recultivo dos embriões

Os embriões foram avaliados morfológicamente quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade de acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) no dia (D7), sendo o dia zero (D0) o dia da FIV.

No sétimo dia do cultivo *in vitro*, os embriões grau I e II em estágio de blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx) (Figura 5), foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em duas condições de manutenção, meio de manutenção (C: controle) e meio de manutenção com Melatonina (M: meio Holding + melatonina 10^{-9} M).

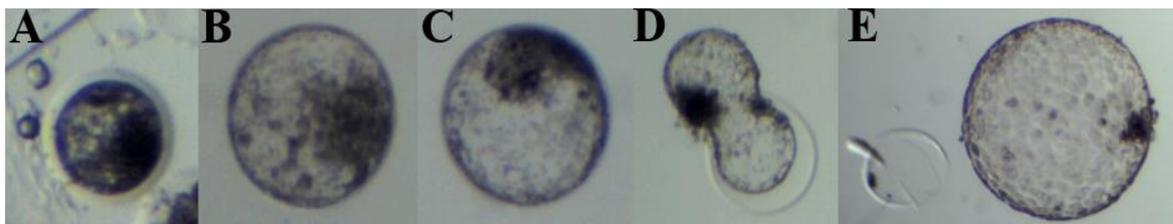


Figura 5. Estágios de desenvolvimento dos embriões. (A) blastocisto inicial, (B) blastocisto; (C) blastocisto expandido, (D) blastocisto em eclosão, (E) blastocisto eclodido.

Fonte: Arquivo pessoal, (2018).

Para o preparo do meio de manutenção com a adição do antioxidante, utilizou-se Melatonina (Envase/Lote:SLBN2691V, Empresa: Sigma-Aldrich, Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Para a diluição da melatonina inicialmente preparou-se uma solução mãe1 (10^{-5} M) que foi pesado 0,0023g e diluído em 200 μ L de água milliQ., homogeneizado e em seguida adicionado 9800 μ L de água MilliQ. Para a solução Mãe 2 (10^{-5} M), foi utilizado 20 μ L da solução Mãe 1 diluído em 1980 μ L de água milliQ. Para a solução Stock (10^{-6} M) foi usado 200

μL da solução Mãe 2 diluído em 1800 μL de água milliQ, sendo aliqotado (20 μL) e congelado protegido da luz. Para a solução trabalho (10^{-9} M) foi utilizado 2 μL da solução Stock, diluído em 1998 μL .

Logo em seguida os embriões foram envasados individualmente em palhetas de 0,25mL, vedadas com lacre e mantidas a 36°C em transportadora de embriões e oócitos (TREO, WTA – Watanabe Tecnologia Aplicada, Cravinhos, SP, BR) como demonstrado na Figura 6, e mantidas por seis, nove e doze horas.



Figura 6. Transportadora de embriões.
Fonte: Arquivo pessoal, (2018).

Dessa forma, foram definidos seis tratamentos: Controle (C6, C9, C12), e Melatonina (M6, M9, M12), de acordo com a Figura 7.

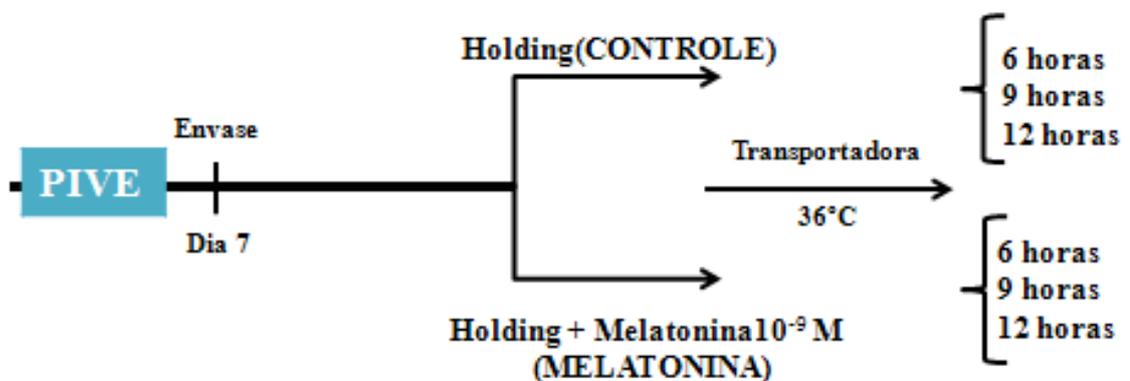


Figura 7. Definição dos tratamentos após a produção *in vitro* de embriões.

Transcorrido o tempo determinado conforme o tratamento, as palhetas foram retiradas da transportadora, com posterior desenvase e recultivo dos embriões em placas contendo meio

de cultivo cobertas por óleo mineral e incubadas em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂, durante período de até 72 horas após o envase conforme apresentado na Figura 8.

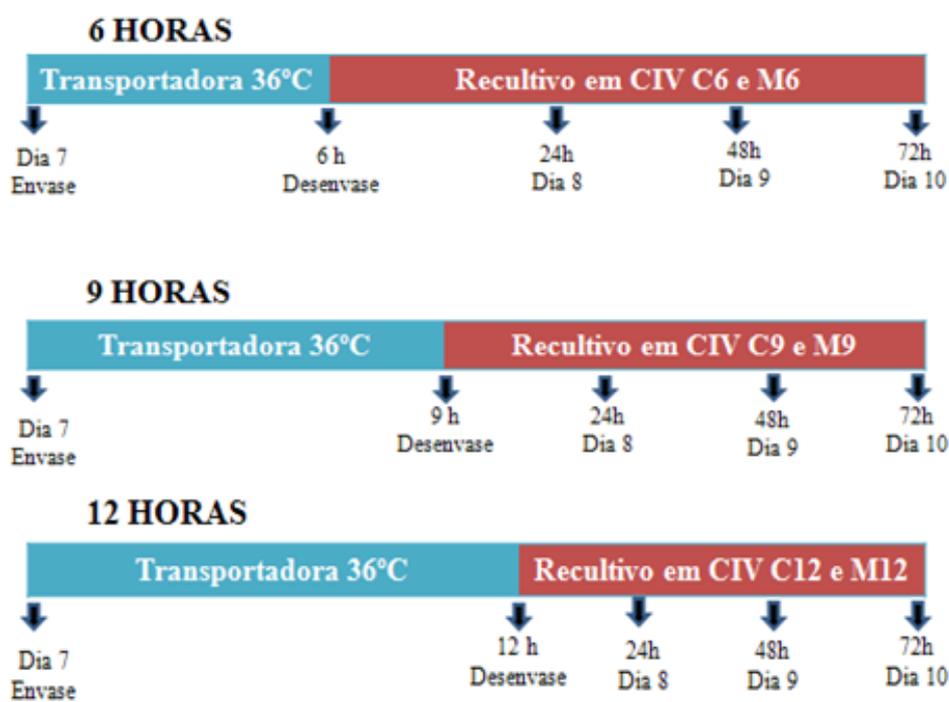


Figura 8. Período de transporte e recultivo dos embriões após o desenvase de cada tratamento. Fonte: Arquivo pessoal, (2018).

Após desenvase os embriões de cada tratamento foram novamente avaliados quanto ao desenvolvimento, e qualidade morfológica de acordo com a IETS no desenvase e no recultivo em meio CIV às 24 horas, 48 horas e 72 horas após o envase.

3.3 Análise Estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com arranjo fatorial 2x3, sendo duas condições de meio de manutenção, com ou sem melatonina e três tempos de manutenção, seis, nove e doze horas, os dados foram comparados pelo teste de Qui-Quadrado e o nível de significância a 5% utilizando o programa computacional R Project versão 3.2.2.

Composição dos meios utilizados para a produção in vitro de embriões

Todos os meios utilizados para a PIVE foram adquiridos de empresa terceirizada com lotes previamente testados.

Meio de lavagem – TCM 199 tamponado com Hepes, suplementado com 0,2 mM piruvato, 10% SFB (v/v), 5 mg/mL BSA, 75 ug/mL amicacina.

Meio de maturação - (Meio TCM 199 com sais de Earl's, suplementado com 75 ug/mL amicacina, 4 mg/mL BSA, 1 ug/mL de L-glutamina e 0,01UI/mL de FSHr.

Meio de fecundação (FIV) – TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL BSA (livre de ácidos graxos), 0,2 mM piruvato e 75 µg/mL amicacina.

Meio FEC - TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL BSA (livre de ácidos graxos), 0,2 mM piruvato, 30 µg/mL heparina, 20 µM penicilamina, 10 µM hipotaurina, 1 µM epinefrina e 75 µg/mL amicacina.

Meio CAP – Meio tamponado Tyrode's HEPES, suplementado com 0,2 mM piruvato e 75 µg/mL amicacina.

Meio de cultivo – SOFaa (Holm, et al. 1999) suplementado com 2,7 mM mio-inositol, 0,2 mM piruvato, 2,5% soro fetal bovino (v/v), 5 mg/mL BSA (livre de ácido graxo) e 75 ug/mL amicacina.

Meio de manutenção – SOFaa (Holm, et al. 1999) tamponado com Hepes (HSOFaa), suplementado com 2,7 mM mio-inositol, 0,2 mM piruvato, 2,5% SFB (v/v), 5 mg/mL BSA (livre de ácido graxo) e 75 ug/mL amicacina.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1 estão apresentados os percentuais de embriões bovinos produzidos *in vitro* mantidos a 36°C por seis, nove e doze horas em simulação de transporte em meio de manutenção suplementado ou não com o antioxidante melatonina, que eclodiram (ECLO), que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MAN), que desenvolveram de estágio (DES) e que degeneraram (DEG) após o desenvase e 24 horas de recultivo.

Tabela 1 – Percentual de embriões bovinos produzidos *in vitro* mantidos a 36°C por seis, nove e doze horas em simulação de transporte em meio de manutenção suplementado ou não com o antioxidante melatonina, que eclodiram (ECLO), que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MAN), que desenvolveram de estágio (DES) e que degeneraram (DEG) após o desenvase e 24 horas de recultivo.

	n	DESENVASE				24h			
		ECLO%	MAN%	DES%	DEG	ECLO%	MAN%	DES%	DEG%
C6	80	0,00 b	78,75 a	21,25 b	0,00	32,50	27,50	66,25	6,25 a
C9	77	5,19 ab	70,13 a	28,57 b	1,30	27,27	23,38	67,53	9,09 a
C12	78	3,84 ab	52,56 b	47,44 a	0,00	28,21	26,92	70,51	2,56 b
M6	84	1,19 b	66,67 a	32,14 a	1,19	38,10	17,86	69,05	13,10 a
M9	91	1,10 b	64,84 a	32,97 a	2,20	26,37	26,37	69,23	4,40 a
M12	88	9,90 a	65,91 a	34,09 a	0,00	27,27	31,82	63,64	4,55 a

*Letras diferentes na coluna indica diferença estatística ($p < 0,05$). C6: Meio controle com 6 horas de envase, C9: meio controle com 9 horas de envase, C12: meio controle com 12 horas de envase, M6: meio com melatonina com 6 horas de envase, M9: meio com melatonina com 9 horas de envase, M12: meio com melatonina com 12 horas de envase.

Como demonstrado na Tabela 1, no momento do desenvase o percentual de embriões ECLO foi superior no tratamento M12 do que nos tratamentos C6, M6 e M9 e o percentual de MAN foi menor no C12. Já os tratamentos C6 e C9 apresentaram menor porcentagem de embriões DES. Quando os embriões foram envasados sem antioxidante, no tratamento C12 observou-se menor percentual de embriões que mantiveram o estágio de desenvolvimento, fato este que já era esperado, devido ao maior tempo de manutenção do embrião na transportadora, e o mesmo continua o seu desenvolvimento durante o transporte. Entretanto, quando os embriões foram envasados com o antioxidante, este fato não foi observado, podendo a melatonina ter atrasado o desenvolvimento dos embriões nesta fase do desenvolvimento.

Na avaliação 24h após o envase, não houve diferença entre os tratamentos para os percentuais de embriões que ECLO, MAN e DES. Entretanto, o percentual de DEG foi menor no tratamento C12 (Tabela 1).

Na Tabela 2 estão apresentados os percentuais de embriões bovinos produzidos *in vitro* mantidos a 36°C por seis, nove e doze horas em simulação de transporte em meio de manutenção suplementado ou não com o antioxidante melatonina, que eclodiram (ECLO), que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MAN), que desenvolveram de estágio (DES) e que degeneraram (DEG) após 48 e 72 horas de recultivo.

Na Tabela 2 pode-se observar que 48h pós envase, os embriões mantidos em recultivo não apresentaram diferença nos percentuais de ECLO, MAN e DES. Porém, o percentual de DEG foi menor nos tratamentos C12 e M12.

Após 72h do envase não houve nenhuma diferença entre os tratamentos para os parâmetros avaliados (Tabela 2). O que mostra que, com três dias após o envase a possibilidade de prenhez entre os tratamentos seria semelhante, caso os embriões tivessem sido transferidos para receptoras.

Tabela 2 – Percentual de embriões bovinos produzidos *in vitro* mantidos a 36°C por seis, nove e doze horas em simulação de transporte em meio de manutenção suplementado ou não com o antioxidante melatonina, que eclodiram (ECLO), que mantiveram o estágio de desenvolvimento (MAN), que desenvolveram de estágio (DES) e que degeneraram (DEG) após 48 e 72 horas de recultivo.

	n	48h				72h			
		ECLO%	MAN%	DES%	DEG%	ECLO%	MAN%	DES%	DEG%
C6	80	56,25	5,00	78,75	16,25 a	68,75	2,50	77,50	20,00
C9	77	59,74	6,49	74,03	19,48 a	64,94	0,00	71,43	28,57
C12	78	61,54	8,97	82,05	8,97 b	73,08	2,56	80,77	16,67
M6	84	58,33	4,76	73,81	21,43 a	64,29	2,38	67,86	29,76
M9	91	59,34	13,19	75,82	10,99 a	63,74	4,40	71,43	24,18
M12	88	60,23	11,36	79,55	9,09 b	69,32	2,27	79,55	18,18

*Letras diferentes na coluna indica diferença estatística ($p < 0,05$). C6: Meio controle com 6 horas de envase, C9: meio controle com 9 horas de envase, C12: meio controle com 12 horas de envase, M6: meio com melatonina com 6 horas de envase, M9: meio com melatonina com 9 horas de envase, M12: meio com melatonina com 12 horas de envase.

Os resultados da Tabela 2 mostram diferença entre os tratamentos até 48 horas de recultivo, notando-se que o índice de degenerados foi menor nos tratamentos com 12 horas após o envase tanto no tratamento controle quanto no tratamento com adição de melatonina.

A melatonina possui inúmeros efeitos fisiológicos ligados à ação hormonal e regulatória, mas o uso desta na produção *in vitro* de embriões é devido a capacidade de eliminar radicais livres, atuar como antioxidante e como agente anti-apoptótico. Estudos utilizando melatonina ao meio de cultivo têm sido relatados como fator chave para melhorar as condições de cultivo *in vitro* de embriões pré-implantação (WANG et al., 2012; WENG et al., 2013).

Com 24, 48 e 72 horas de recultivo não foi observado diferença no percentual de ECLO, resultados semelhantes foram encontrados por RAMOS et al. (2006) que simulando o transporte de palhetas de 0,25 mL observaram que embriões mantidos por 12 horas em transportadora não tem interferência na viabilidade embrionária quando avaliada a taxa de eclosão.

No presente trabalho não foi observado efeito positivo da melatonina na viabilidade dos embriões quando adicionada ao meio manutenção. Porém, MARQUES et al. (2016) observaram que a melatonina, quando adicionada ao meio de cultivo na concentração 10^{-9} M, melhorou significativamente a qualidade de embriões bovinos. Entretanto, CRUZ et al. (2016) testaram a melatonina no meio de cultivo em embriões suínos e não obtiveram efeito significativo nos tratamentos avaliados.

A utilização de antioxidantes também é estudada na MIV onde MANJUNATHA et al. (2009) trabalhando com búfalas observaram que a suplementação da melatonina ao meio de maturação melhora significativamente a taxa de maturação nuclear oocitária, provavelmente em consequência da redução do estresse oxidativo, da concentração de peróxido de lipídios e dos danos ao DNA, devido ao efeito protetor e antioxidante da melatonina.

De acordo com MARQUES et al. (2016) a melatonina na concentração ideal permitiu a manutenção do equilíbrio redox do ambiente intracelular propiciando que a expressão metabólica e gênica favorecesse o desenvolvimento embrionário, porém, o efeito reverso também foi notado com a decorrência do excesso ou falta da melatonina, seja pela concentração impropria ou pelo momento da PIVE em que foi adicionada.

O fato da melatonina não ter proporcionado efeito sobre a viabilidade embrionária neste estudo pode estar relacionado ao soro fetal bovino, que não foi usado no meio da MIV, diminuindo assim o acúmulo de lipídios nos embriões, o que o torna menos susceptível a EROS.

Embora o acúmulo de lipídios intracitoplasmático seja capaz de prejudicar a viabilidade embrionária, também apresentam papel fisiológico importante, uma vez que são potenciais reservatórios de energia para o desenvolvimento pré-implantação inicial, antes da ativação do genoma embrionário (STURMEY et al., 2009).

Contudo apesar de não estar explícito como e porque acontece o acúmulo de lipídios, há indícios de que pode ser influência da adição de soro fetal bovino ao meio de cultura ou pelo resultado de desequilíbrio no metabolismo de energia do embrião, o que também afeta as características de estabilidade da membrana celular (SUDANO et al., 2012; DINNYES et al., 2009).

O processo de maturação é essencial para o desempenho da PIVE, pois é quando o ovócito torna-se capaz de ser fecundado, suportar o desenvolvimento embrionário e induzir a gestação (MINGOTI et al., 2000). O fato de não ter utilizado o soro fetal bovino na MIV pode ter atrapalhado a maturação dos ovócitos, o que pode ter influenciado negativamente a taxa de clivagem obtida. Neste trabalho que foi de 51,68%, valor muito inferior ao relatado por PATROCINIO et al. (2017) que obteve taxa de clivagem de 80,8%.

Embora a taxa de clivagem tenha sido baixa, a taxa de blastocisto foi alta 62,21%. Obteve-se também taxa de eclosão boa e uma baixa taxa de embriões degenerados em todos os tratamentos, este fato pode ser devido a um baixo percentual de lipídios nos embriões produzidos o que pode explicar o motivo da melatonina não ter melhorado a viabilidade nos embriões.

Diversos estudos avaliam individualmente cada uma das etapas envolvidas no processo de produção *in vitro*, principalmente para ajustar a quantidade de antioxidante da melhor maneira possível, levando em consideração as variáveis envolvidas (MINGOTI., 2005).

5 CONCLUSÃO

O uso do antioxidante melatonina a 10^{-9} M no meio de manutenção HSOfaa não proporciona manter por maior tempo os embriões bovinos produzidos *in vitro*, mantidos a 36°C em caixa transportadora por seis, nove ou doze horas, e sendo estes mantidos por 12 horas a 36°C sem prejuízo na sua qualidade.

6 REFERÊNCIAS

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev**, v. 61, p.57-66, 2002.
- ADRIAENS, I.; JACQUET, P.; CORTVRINDT, R.; JANSSEN, K.; SMITZ, J. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**, v. 228, p. 333-343, 2006.
- AGARWAL, A.; SAID, T. M.; BEDAIWY, M. A.; BANERJEE, J.; ALVAREZ, J. G. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 503-512, 2006.
- ALVES, D. F.; RAUBER, L. P.; RUBIN, F. B.; BERNARDI, M. L.; DEZEN, D.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 279-286, 2003.
- ANISIMOV, V. N.; POPOVICH, I. G.; ZABEZHINSKI, M. A.; ANISIMOV, S. V.; VESNUSHKIN, G. M.; VINOGRADOVA, I. A. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1757, n. 5-6, p. 573-589, 2006.
- BLANCO, M. R. DEMYDA, S.; MORENO MILLÁN, M.; GENERO E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. **Biotechnol Mol Biol Rev.** p 155-65, 2011.
- BRUM, D. S.; LEIVAS, F. G.; BERNARDI, M. L.; RAUBER, L. P.; MEZZALIRA, A.; BRASS, K. E.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 87-92, 2002.
- BOLS, PE, JORSSSEN, E.P GOOVAERTS, I.G.; LANGBEEN A LEROY J.L. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. **Animal Reproduction**.p. 420-25. 2012.
- BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Ano VI**, 2008.
- CALVO, J. R.; GONZALEZ-YANES, C.; MALDONADO, M. D. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review. **Journal of pineal research**, v. 55, p. 103-120, 2013.
- COCCHIA, N.; CORTEGGIO, A.; ALTAMURA, G.; TAFURI, S.; REA, S.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; LANDOLFI, F.; CIANI, F. The effects of superoxide dismutase addition to the transport medium on cumulus-oocyte complex apoptosis and IVF outcome in cats (*Felis catus*). **Reproductive biology**, v. 15, p. 56-64, 2015.

- CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of reproduction**, v. 64, p. 1375-1385, 2001.
- CRUZ, M. H. C. Efeito da melatonina sobre a viabilidade e expressão gênica de oócitos suínos e células do cumulus maturados *in vitro*. 2016. 147 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.
- CUCINA, A.; PROIETTI, S.; D'ANSEMI, F.; COLUCCIA, P.; DINICOLA, S.; FRATI, L.; BIZZARRI, M. Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells. **Journal of pineal research**, v. 46, p. 172-180, 2009.
- CUTANDO A, ANEIROS-FERNANDEZ J, LOPEZ-VALVERDE A, et al. A new perspective in oral health: potential importance and actions of melatonin receptors MT1, MT2, MT3, and RZR/ROR in the oral cavity. **Arch Oral Biol**. 2011;56:944-950.
- CUTANDO, A.; ANEIROS-FERNÁNDEZ, J.; LÓPEZ-VALVERDE, A.; ARIAS-SANTIAGO, S.; ANEIROS-CACHAZA, J.; REITER, R. J. A new perspective in oral health: potential importance and actions of melatonin receptors MT1, MT2, MT3, and RZR/ROR in the oral cavity. **Archives of oral biology**, v. 56, p. 944-950, 2011.
- DE LA FUENTE, R.; KING, W. A. Use of chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. **Zygote**, v. 5, p. 309-320, 1997.
- DEVINE, P. J.; PERREAULT, S. D.; LUDERER, U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. **Biology of reproduction**, v. 86, p. 27, 1-10, 2012.
- DINNYES, A.; NEDAMBALE, T. L. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 45-59, 2008.
- ERYILMAZ, O. G.; DEVRAN, A.; SARIKAYA, E.; AKSAKAL, F. N.; MOLLAMAHMUTOĞLU, L.; CICEK, N. Melatonin improves the oocyte and the embryo in IVF patients with sleep disturbances, but does not improve the sleeping problems. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 28, p. 815, 2011.
- GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of pineal research**, v. 54, p. 245-257, 2013.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599-616, 2003.
- GANDHI, A. P.; LANE, M.; GARDNER, D. K.; KRISHER, R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction*, **Human Reproduction**, v. 15, p. 395-401, 2000.
- GAO, C.; HAN, H. B.; TIAN, X. Z.; TAN, D. X.; WANG, L.; ZHOU, G. B.; ZHU, S. E.; LIU, G. S. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. **Journal of pineal research**, v. 52, p. 305-311, 2012.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; BERLINGUER, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ESTESO, M. C.; MERMILLOD, P.; ORTIZ, J. A.; RAMON, M.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Effect of storage temperature during transport of ovaries on in vitro embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). **Theriogenology**, v. 75, p. 65-72, 2011.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. B.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 212-217, 2007.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISINTIN, J.A.; COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicada a Reprodução Animal**. 2º edição. São Paulo: Rocca, 2008, p. 261 – 292.

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human reproduction update**, v. 7, p. 175-189, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford University Press: New York, 1999, p. 936.

IBGE: Agência de Notícias. Sala de Imprensa: **PPM 2017: Rebanho bovino predomina no Centro-Oeste e Mato Grosso lidera entre os estados**. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22648-ppm-2017-rebanho-bovino-predomina-no-centro-oeste-e-mato-grosso-lidera-entre-os-estados> . Acesso em: 08 nov. 2018.

JOHNS, J. R.; PLATTS, J. A. Theoretical insight into the antioxidant properties of melatonin and derivatives. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 12, p. 7820-7827, 2014.

KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T. 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, p. 1186-1197, 2004.

LEE, C. J.; DO, B. R.; LEE, Y. H.; PARK, J. H.; KIM, S. J.; KIM, J. K.; ROH, S. I.; YOON, Y. D.; YOON, H. S. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 59, p. 126-132, 2001.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 427-437, 2001.

MANCHESTER, L. C.; COTO-MONTES, A.; BOGA, J. A.; ANDERSEN, L. P. H.; ZHOU, Z.; GALANO, A.; VRIEND, J.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. **Journal of pineal research**, v. 59, n. 4, p. 403-419, 2015.

- MANJUNATHA, B. M.; DEVARAJ, M.; GUPTA, P. S. P.; RAVINDRA, J. P.; NANDI, S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *in vitro* embryo development. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, p. 12-16, 2009.
- MARINHO, L. S. R.; UNTURA, R. M.; MOROTTI, F.; MOINO, L. L.; RIGO, A. G.; SANCHES, B. V.; PONTES, J. H. F.; SENEDA, M. M. Large-scale programs for recipients of *in vitro*-produced embryos. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 323-328, 2012.
- MARQUES, T. C. Alternativas para melhorar o desenvolvimento e a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. 2016. 113 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.
- MAX, M. C.; SANTOS, G. M. G.; MELO-STERZA, F. A.; SILVA-SANTOS, K. C.; MOROTTI, F.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; BALDASSARRE, H.; SENEDA, M. M. *In vitro* embryo production in sheep: Pregnancy after long periods of oocyte and embryo transport. **Small ruminant research**, v. 105, p. 286-289, 2012.
- MEHAISEN, G. M. K.; SAEED, A. M. *In vitro* development rate of preimplantation rabbit embryos cultured with different levels of melatonin. **Zygote**, v. 23, p. 111-115, 2015.
- MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; DE SOUSA, S. L. G.; DE MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 58-64, 2016.
- MINGOTI, G.V. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: I SIMPÓSIO TÓPICOS AVANÇADOS EM BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO, 1, 2005, Jaboticabal: Jaboticabal, SP: UNESP, 2005.
- MINGOTI, G. Z. Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides. 2000. 103 f. Tese (Doutorado e Fisiologia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.
- MUNDIM, T. C.; RAMOS, A. F.; SARTORI, R.; DODE, M. A. N.; MELO, E.O.; GOMES, L. F. S.; RUMPF, R. E FRANCO, M. M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced *in vitro*, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 1398-1407, 2009.
- PATROCÍNIO, T.A. Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos cultivados em meio análogo de resveratrol. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Sanidade e Bem-Estar animal) - Universidade de Alfenas – UNIFENAS, Alfenas, 2017.
- PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKOPARRISH, 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, p. 859-869, 1995.
- PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCINATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicustaurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1349-1355, 2010.

RAMOS, A.A.; et al. Efeito do transporte no desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* a fresco ou reaquecidos após vitrificação. **Revista Brasileira Zootecnia**, v..35, n.6, p. 2285-2289, 2006.

REITER, R. J.; TAMURA, H.; TAN, D. X.; XU, X. Y. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 102, p. 321-328, 2014.

REITER, R. J.; MAYO, J. C.; TAN, D. X.; SAINZ, R. M.; ALATORRE-JIMENEZ, M.; QIN, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of pineal research**, v. 61, p. 253-278, 2016.

REZZANI, R.; RODELLA, L. F.; BONOMINI, F.; TENGATTINI, S.; BIANCHI, R.; REITER, R. J. Beneficial effects of melatonin in protecting against cyclosporine A-induced cardiotoxicity are receptor mediated. **Journal of pineal research**, v. 41, p. 288-295, 2006.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS. S.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 62, p. 320-327, 2002.a.a

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. 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, p. 234-248, 2002.b.

SHI, J. M.; TIAN, X. Z.; ZHOU, G. B.; WANG, L.; GAO, C.; ZHU, S. E.; ZENG, S. M.; TIAN, J. H.; LIU, G. S. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves *in vitro* maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of pineal research**, v. 47, p. 318-323, 2009.

SOARES, J. M.; MASANA, M. I.; ERŞAHIN, Ç.; DUBOCOVICH, M. L. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 694-702, 2003.

SPENCER, T. E.; BURGHARDT RC, JOHNSON GA, BAZER FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.537-550, 2004.

STEHLE, J. H.; SAADE, A.; RAWASHDEH, O.; ACKERMANN, K.; JILG, A.; SEBESTÉNY, T.; MARONDE, E. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. **Journal of pineal research**, v. 51, p. 17-43, 2011.

SUCCU, S.; PASCIU, V.; MANCA, M. E.; CHELUCCI, S.; TORRES-ROVIRA, L.; LEONI, G. G.; ZINELLU, A.; CARRU, C.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F. Dosedependent effect of melatonin on postwarming development of vitrified ovine embryos. **Theriogenology**, v. 81, p. 1058-1066, 2014.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; DA SILVA RASCADO, T.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; JUNIOR, A. M.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. D.

C. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22,, p. 124-131, 2014.

STURMEY, R. G.; REIS, A.; LEESE, H. J.; MCEVOY, T. G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 50-58, 2009.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and sterility**, v. 92, p. 328-343, 2009.

TESSMANN, J. V.; MOZZAQUATRO, F. D.; RAUBER, L. P.; SANTOS, M. V. D.; CHEQUIM, R. M.; BERNARDI, M. L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Transporte-maturação de oócitos bovinos em palhetas. **Acta scientiae veterinariae**, v. 32, p. 177-184, 2004.

TIAN, X.; WANG, F.; HE, C.; ZHANG, L.; TAN, D.; REITER, R. J.; XU, J.; JI, P.; LIU, G. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of pineal research**, v. 57, p. 239-247, 2014.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, p. 914-925, 2006.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

VÁZQUEZ, M. I.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; CASAO, A. Effects of exogenous melatonin on *in vivo* embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. **Theriogenology**, v. 74, p. 618-626, 2010.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; TAN, D.; REITER, R. J.; LIU, G. Melatonin promotes the *in vitro* development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. **Journal of pineal research**, v. 55, p. 267-274, 2013.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; GAO, C.; HE, C.; FU, Y.; JI, P.; LI, Y.; LI, N.; LIU, G. Beneficial effects of melatonin on *in vitro* bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. **Journal of pineal research**, v. 56, p. 333-342, 2014.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P.; LI, Y.; TAN, D.; LIU, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. **Fertility and sterility**, v. 101, p. 577-586. e1, 2014.

WANG, S. J.; LIU, W. J.; WU, C. J.; MA, F. H.; AHMAD, S.; LIU, B. R.; HAN, L.; JIANG, X. P.; ZHANG, S. J.; YANG, L. G. Melatonin suppresses apoptosis and stimulates progesterone production by bovine granulosa cells via its receptors (MT1 and MT2). **Theriogenology**, v. 78, p. 1517-1526, 2012.

WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Animal reproduction science**, v. 82, p. 583-592, 2004.

YANAGIMACHI, R., Sperm capacitation and gamete interaction. **Journal Reproduction and Fertility, Suppl.** v. 38, p. 27-33, 1994.

ZHAO, X. M.; MIN, J. T.; DU, W. H.; HAO, H. S.; LIU, Y.; QIN, T.; WNAG, D.; ZHU, H. B. Melatonin enhances the in vitro maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. **Zygote**, v. 23, p. 525-536, 2015.