

TAYNAN STONOGA KAWAMOTO

**PRODUÇÃO DE PROTEÍNA ESPECÍFICA DO OVIDUTO (POSP)
RECOMBINANTE POR *ESCHERICHIA COLI* E SUA ASSOCIAÇÃO COM
MELATONINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015


TAYNAN STONOGA KAWAMOTO


**PRODUÇÃO DE PROTEÍNA ESPECÍFICA DO OVIDUTO (pOSP)
RECOMBINANTE POR *ESCHERICHIA COLI* E SUA ASSOCIAÇÃO COM
MELATONINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS DE SUÍNOS**

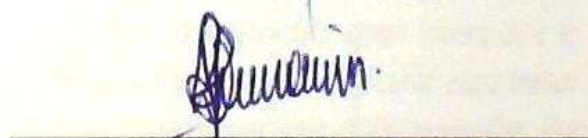
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

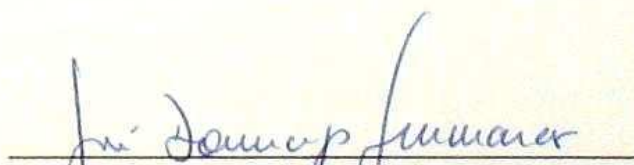
APROVADA: 03 de fevereiro de 2015.


Théa Mirian Medeiros Machado


Tarcízio Antônio Rego de Paula


Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)


Lincoln da Silva Amorim
(Coorientador)


José Domingos Guimarães
(Orientador)

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

K22p
2015

Kawamoto, Taynan Stonoga, 1990-
Produção de proteína específica do oviduto (pOSP)
recombinante por *Escherichia coli* e sua associação com
melatonina na maturação *in vitro* de ovócitos de suínos / Taynan
Stonoga Kawamoto. – Viçosa, MG, 2015.
xi, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Domingos Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Suínos. 2. Reprodução animal. 3. Produção *in vitro* de
embrião. 4. Melatonina. 5. Proteína recombinante.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.4

*“A felicidade aparece para
aqueles que choram. Para
aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e
tentam sempre. E para aqueles
que reconhecem a importância
das pessoas que passam
por suas vidas.”*

Clarice Lispector.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho inicialmente a Deus, por me abençoar durante esta jornada.

Aos meus pais, Zilda Stonoga Kawamoto e Lincoln Kawamoto (em memória), a minha irmã, Sheila Stonoga Kawamoto e ao meu namorado, Patrick Almeida Carvalho e por nunca deixarem de acreditar no meu sonho e me apoiarem durante toda a jornada em Viçosa.

Agradeço ao meu orientador José Domingos Guimarães e aos meus co-orientadores Lincoln da Silva Amorim e Leandro Licursi de Oliveira, pela ajuda, ensinamento e principalmente pelo incentivo.

Ao Alaor Monteiro e aos meus sogros, Zeolânia Soares Almeida Carvalho e Gilberto Carvalho de Novais, pelo apoio.

As amigas Zilda, Ana Paula, Natália, Vanessa, Eveline e Letícia e aos amigos Patrick, Rafael, Fabiano e Lincoln, que tanto me apoiaram nos momentos de maiores dificuldades.

Aos mestres que passaram seus conhecimentos e fizeram de nós pessoas melhores, tanto durante a graduação quanto durante a pós graduação, especialmente a professora Thea M. M. Machado e ao professor Eduardo Paulino da Costa.

Aos estagiários, amigos e companheiros da granja de melhoramento genético de suínos que ajudaram e apoiaram durante todo o experimento.

A todos do laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia que me acolheram com tanto carinho durante meu experimento.

A todos do laboratório de Biotecnologia do Departamento de Zootecnia que sempre estiveram de braços abertos para ajudar e auxiliar nos momentos de dificuldade, em especial ao Walmir.

Aos funcionários do Hospital Veterinário, especialmente à Rosi e Beth da pós-graduação e ao Luís do Setor de Preventiva que tanto me ajudaram em todos os momentos de necessidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, a todos que indiretamente contribuíram para a realização deste experimento. Muito obrigada, minha gratidão é eterna.

BIOGRAFIA

Taynan Stonoga Kawamoto, filha de Lincoln Kawamoto e Zilda Stonoga Kawamoto, nasceu em Santos, São Paulo, em 30 de maio de 1990.

Graduou-se Médica Veterinária em maio de 2013, pela Universidade Federal de Viçosa – MG, onde ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária no mesmo ano.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Maturação <i>in vitro</i>	3
2.2. Fertilização <i>in vitro</i>	4
2.3. Cultivo <i>in vitro</i>	5
2.4. Espécies reativas de oxigênio	6
2.5. Proteína específica do oviduto	8
2.6. Melatonina	11
3. HIPÓTESE	14
4. OBJETIVOS	14
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 1 – Transferência de DNA exógeno para <i>Escherichia coli</i> para produção de proteína específica do oviduto de porcas, e seu uso na maturação <i>in vitro</i>	25
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Local de execução	28
2.2 Reagentes	28
2.3 Produção de proteína específica do oviduto recombinante	28
2.4 Purificação da pOSP recombinante	29
2.5 Determinação da concentração de proteína	29
2.6 Análise eletroforética	29
2.7 Meios de cultivo	30
2.8 Obtenção, seleção e maturação dos ovócitos	30
2.9 Avaliação da Expansão das células do <i>cumulus ooforus</i>	31
2.10 Dosagem de Espécies Reativas de Oxigênio	31
2.11 Delineamento Experimental	32
2.12 Análise Estatística	32
3. RESULTADOS	33
3.1 Avaliação da produção de proteína recombinante	33
3.2 Avaliação da maturação ovocitária	34
3.3 Avaliação de espécies reativas de oxigênio produzidos pelos ovócitos	35
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÃO	37

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO 2 - Adição da proteína específica do oviduto de porcas (pOSP) e da melatonina em meios de maturação e o efeito na produção <i>in vitro</i> de embriões suínos	40
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Local de execução.....	43
2.2. Reagentes.....	44
2.3. Proteína específica do oviduto de porcas.....	44
2.4 Meios de cultivo.....	44
2.5. Obtenção, seleção e maturação dos ovócitos.....	44
2.6. Colheita de sêmen.....	45
2.7. Fertilização <i>in vitro</i>	45
2.8. Cultivo <i>in vitro</i>	46
2.9. Avaliação da Expansão das células do <i>cumulus ooforus</i>	46
2.10. Avaliação da taxa de clivagem	46
2.11. Dosagem de espécies reativas de oxigênio.....	46
2.12. Delineamento Experimental	47
2.13. Análise Estatística	48
3. RESULTADOS	48
3.1. Avaliação da maturação ovocitária.....	48
3.2. Avaliação de Espécies reativas de oxigênio produzidos pelos ovócitos	48
3.3. Avaliação da produção de embriões	50
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÕES	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	56

LISTA DE ABREVIACOES

%	Porcentagem
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ATP	adenosina trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCOs	Complexo Cumulus-Ovócito
CG	Células da Granulosa
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Gás Carbônico
Da	Dalton
DCFDA	Diacetato de Diclorofluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
gr	Gramma
GSH	Glutathione
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
kDa	kilo Dalton
Km	Kilômetro
LB	Meio Luria-Bertani
LH	Hormônio Luteinizante
M II	Metáfase II
M	Molar
mg	Miligrama
MIH	Hormônio inibidor dos ductos Mullerianos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro

MM Massa molecular
MPF Fator promotor da meiose
mTBM Tris tamponado modificado
mWM meio de Whitten modificado
NaCl Cloreto de sódio
NCSU North Caroline State University
Nm Nanômetro
O₂ Gás oxigênio
PBS solução tamponada de fosfato
PIV Produção *In vitro* de Embriões
PMSF phenylmethylsulfonyl fluoride
pOSP Proteína específica do oviduto
PVA Álcool polivinílico
RNA Ácido ribonucleico
ROS Espécies reativas de Oxigênio
SIF Serviço inspeção federal
SOD Superóxido Dismutase
TALP Tyrodes, Albumina, Lactato e Piruvato
TCM Meio de Cultivo de Tecidos
 χ^2 Quiquadrado

RESUMO

KAWAMOTO, Taynan Stonoga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Produção de proteína específica do oviduto (pOSP) recombinante por *Escherichia coli* e sua associação com melatonina na maturação *in vitro* de ovócitos de suínos.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira e Lincoln da Silva Amorim.

O presente estudo teve como objetivo a produção de proteína específica do oviduto de porcas para uso em meios de maturação *in vitro* (MIV). Avaliou-se o aumento da eficiência dos meios de MIV, para ovócitos de suíno, quando adicionados a melatonina ao meio, durante todo o processo de MIV, e a proteína específica do oviduto (pOSP), nas últimas quatro horas de maturação. Para aquisição da proteína, foram realizadas técnicas de transgenia, indução da expressão, purificação e dosagem da proteína. As características avaliadas foram: a expansão das células do *cumulus compacto ooforus* (CCOs), as concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) e desenvolvimento embrionário nos diferentes grupos experimentais (C = controle; T1 = somente com melatonina; T2 = com melatonina e proteína e T3 somente com proteína). As taxas de expansão do CCOs e de desenvolvimento embrionário foram analisadas pelo qui-quadrado (χ^2) e a dosagem de ROS foi analisada pela ANOVA e teste de Duncan pelo programa estatístico SAEG 9.1 (SAEG-UFV, 2007) com probabilidade de erro de 5 %. A avaliação da produção de proteína recombinante foi feito por eletroforese e a dosagem, pelo método de Bradford. Em relação à expansão do CCOs, houve diferença ($p < 0,05$) dos valores obtidos no grupo controle em relação aos valores médios dos grupos experimentais 1, 2 e 3, com os grupos experimentais mostrando resultados satisfatórios em relação ao controle, porém não houve diferença entre os valores dos grupos tratados ($p > 0,05$). Na dosagem de ROS não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores médios obtidos no grupo controle ($26,4 \pm 10,9$) e o valor médio verificado no grupo do tratamento 1 ($23,4 \pm 7,8$), porém no grupo do tratamento 2 ($21,3 \pm 9,7$) o valor médio mostrou-se satisfatório em relação ao valor médio do grupo controle. No entanto, o valor médio do tratamento 3 ($16,6 \pm 10,5$) foi o que mostrou o resultado mais satisfatório quando comparado aos demais tratamentos ($p < 0,05$). A produção de embriões foi avaliada por meio da taxa de clivagem, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores obtidos no grupo controle (48,9 %) e os valores verificados nos grupos de tratamento 1 (51,5 %), tratamento 2 (50 %), tratamento 3 (57,7 %), e nem destes entre si. Conclui-se que a proteína específica do

oviduto recombinante (pOSP) e a melatonina foram eficientes em melhorar a expansão das células do CCOs. Além disso, as células tratadas com pOSP mostraram-se com menor quantidade de ROS, podendo a pOSP ser considerada um antioxidante proteico.

ABSTRACT

KAWAMOTO, Taynan Stonoga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2015. **Production of recombinant oviduct specific protein (pOSP) by *Escherichia coli* and your association with melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocytes.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-advisers: Leandro Licursi de Oliveira and Lincoln da Silva Amorim.

The present study aimed the production of oviduct specific protein (pOSP) for its use on *in vitro* maturation (IVM). The increase on the efficiency of IVM was evaluated, for porcine oocytes, when melatonin is added to the environment, during the entire IVM process, and when the pOSP is added in the last four hours of maturation. In order to acquire the protein, transgenic techniques, induction of the expression, purification and determination of protein were used. The expansion of cumulus compact oophorus (CCOs), intracellular concentrations of reactive oxygen species (ROS) and embryonic development in the different experimental groups were evaluated (C = control; T1 = melatonin only; T2 = melatonin and pOSP and T3 = pOSP only). The CCOs growth rates and embryonic development were analyzed by the chi-squared test (χ^2) and the ROS dosage was analyzed by ANOVA and by the Duncan Test, using the statistical program SAEG 9.1 (SAEG-UFV, 2007) with a 5% probability of error. The evaluation of the production of recombinant protein was done through electrophoresis, and the dosage was done by using the Bradford Method. Regarding the expansion of CCOs, there was a difference ($p < 0.05$) on the values obtained in the control group in relation to the average values of the treatment group 1, 2 and 3, with the experimental groups showing satisfactory results compared with the control, however, there was no difference between treatments ($p > 0,05$). In the ROS dosage, there was no difference between the mean values obtained in the control group (26.4 ± 10.9) and the average value observed in the treatment group 1 (23.4 ± 7.8). However, in the treatment group 2 (21.3 ± 9.7), the average value was found to be satisfactory in relation the average of the control group. Despite that, the average value of treatment 3 (16.6 ± 10.5) was found that the most satisfactory result compared to the other treatments ($p < 0.05$). The production of embryos was evaluated by cleavage rate and there was no difference ($p > 0.05$) between the values obtained in the control group (48.9%) and the values that were verified in treatment groups of numbers 1 (51.5%), 2 (50%), 3 (57.7%), and neither of these with each other. This study showed that the pOSP and the melatonin

were effective in the improvement of the expansion of CCOs. In addition, the cells that were treated with pOSP presented less amount of ROS, allowing the pOSP to be considered a proteic antioxidant.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) de suínos apresenta muitas limitações, principalmente devido à baixa eficiência dos sistemas de produção *in vitro* o que acarreta em baixa quantidade e qualidade de blastocistos produzidos. As principais causas dessa baixa eficiência são a grande produção de ROS e as altas taxas de polispermia que promovem sérios danos a ovócitos e embriões. Dessa maneira, o uso de coadjuvantes que auxiliem na regulação de ROS e na diminuição dos índices de polispermia, seriam de grande benefício para a PIV.

Contudo, a PIV de suínos tem sido de muito interesse para os pesquisadores, pois a disponibilidade de um grande número de ovócitos e embriões obtidos por meio de maturação *in vitro* (MIV), técnicas de fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo de embriões *in vitro* (CIV) são essenciais para fins zootécnicos e biomédicos. Por ser uma técnica que permite a produção de embriões em larga escala, isso facilita a propagação de material genético por diferentes regiões do mundo permitindo um ganho genético superior ao alcançado pela inseminação artificial. Devido às suas semelhanças fisiológicas com os seres humanos, os suínos podem ser utilizados como biomodelos para pesquisa de doenças, além da criação de animais geneticamente modificados, os quais poder-se-iam tornar potenciais doadores de tecidos e órgãos para xenotransplantes, serem utilizados para a produção de biofármacos e para o aumento da produção. Estas biotecnologias exigem ovócitos maturados e zigotos de boa qualidade.

Apesar de todos os benefícios que as biotecnologias de PIV podem oferecer, ainda há limitações que afetam a eficiência da PIV em suínos como o estresse oxidativo que é causado principalmente pelo ROS como: peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, ânions superóxido e óxido nítrico que são moléculas altamente reativas formadas pelo metabolismo do oxigênio. Isso pode prejudicar a célula por fragmentação de DNA e RNA e/ou induzir a peroxidação lipídica. As células produzem antioxidantes como o superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutatona para reduzir a concentrações de ROS intracelulares e extracelulares.

Adicionalmente, há ocorrências de altas taxas de polispermia *in vitro*, sendo esta o fenômeno patológico mais comumente observado durante a fertilização de ovócitos suínos, alcançando índices superiores a 50 % do total dos ovócitos penetrados. A polispermia *in vitro* deve-se a inúmeros fatores, entre eles, a

fertilização de ovócitos imaturos e/ou velhos, a alta concentração de espermatozoides capacitados, a ocorrência de falhas no processo de reação da zona pelúcida após a penetração espermática e falhas na liberação dos grânulos corticais. Contudo, estudos *in vitro* têm avaliado o papel das células e secreções do oviduto em bloquear a polispermia em suínos. A rápida e eficiente aquisição de proteínas presentes no fluido do oviduto seria de grande interesse caso o uso dessas seja constante na formulação dos meios. Isso seria possível pela técnica de DNA recombinante, ao contrário da técnica de purificação da proteína a partir do tecido do oviduto.

Deste modo, muitas pesquisas tornam-se necessárias em relação a produção de melhores meios de MIV que possam diminuir a produção de ROS e que proporcionem condições necessárias para um processo de fertilização eficiente, de modo a propiciar o desenvolvimento embrionário inicial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Maturação *in vitro*

A MIV é a etapa mais importante durante a PIV (Fig. 1). No sistema de PIV, os ovócitos são geralmente obtidos de abatedouros ou por meio de animais descarte. Esses são selecionados utilizando critérios de morfologia, incluindo o número de camadas de células do CCOs e pela homogeneidade do citoplasma (SOMFAI et al., 2004).

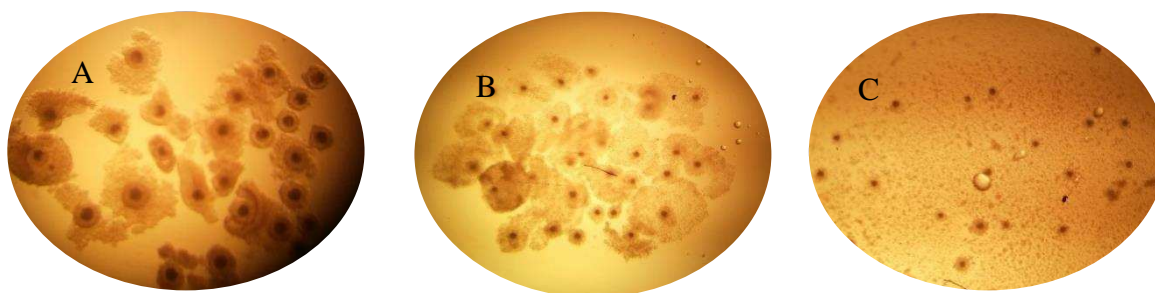


FIG 1. Ovócitos. A: Com *cumulus* compacto após seleção. B: Com *cumulus* compacto em processo de expansão, 22 horas de MIV. C: *Cumulus* compacto expandido após 44 horas de MIV

A maturação do ovócito é um componente crítico de PIV. Se não for realizada de forma correta sob condições ideais, a fertilização e o desenvolvimento embrionário estarão comprometidos (YUAN e KRISHER, 2012). Embora a maturação nuclear seja completada com sucesso durante a maturação *in vitro*, outros processos dentro do ovócito são necessários para que ocorra o completo desenvolvimento na competência do ovócito, para que este seja fertilizado. O completo sucesso desses eventos é dependente da maturação citoplasmática (EPPIG et al., 1996).

Vários meios de maturação são utilizados para suínos incluindo o North Caroline State University (NCSU) (PETER e WELLS, 1993), meio de cultura de tecido modificado 199 (TCM 199) e o meio Tyrode's contendo lactato e piruvato (YOSHIDA et al., 1993). Geralmente os meios são suplementados com fluido folicular que, apesar de ter vários fatores indefinidos que poderiam causar riscos em relação a contaminação por patógenos (GREG et al., 2011), fornecem um ambiente favorável ao desenvolvimento do ovócito por estimular a expansão *in vitro* das células do CCOs,

aumentar a taxa de maturação nuclear dos ovócitos e de blastocistos (ALGRIANY et al., 2004). Tatemoto et al. (2004) verificou que o fluido folicular possui ainda uma outra função sendo crítico na proteção dos ovócitos contra o estresse oxidativo, já que neste foi verificadas concentrações de superóxido dismutase. Uma das principais razões para a inconsistência nos resultados entre diferentes laboratórios, que utilizam dos diferentes meios, foi em relação à suplementação dos meios de MIV com fluido folicular, pois sua composição indefinida varia entre os lotes preparados.

É inegável a importância das células do *cumulus ooforus* para a maturação citoplasmática (NAGAI, 2001). Essas células são indispensáveis para os ovócitos adquirirem desenvolvimento da competência durante a MIV, pois elas sintetizam e transportam glutathione (GSH) para os ovócitos (MAEDOMARI et al., 2007). A GSH é um antioxidante com função de controlar as concentrações de ROS, protegendo o ovócito dos efeitos danosos do estresse oxidativo.

2.2. Fertilização *in vitro*

Os maiores problemas verificados na FIV em suínos são a baixa frequência de ovócitos penetrados e a alta incidência de polispermia. A polispermia pode ser devido a inadequada maturação e/ou inadequadas condições de fertilização (NIWA, 1993). A alta incidência de polispermia não tem sido atribuída ao atraso ou incompleta exocitose dos grânulos corticais, mas sim ao atraso na reação de zona pelúcida (WANG et al., 1998) de modo que a fertilização e as taxas de monospermia são dependentes da concentração de espermatozoides e do tempo de co-incubação de ovócitos e espermatozoides (NAGAI, 1996).

Nos sistemas tradicionais de FIV de suíno, embora a penetração do espermatozoide demore cerca de três horas após inseminação e é completada após seis horas, a incidência de polispermia aumenta quando a duração do co-cultivo é estendida (FUNAHASHI et al., 2000). Em alguns laboratórios, os gametas são incubados por seis horas (ABEYDEERA e DAY, 1997; FUNAHASHI et al., 1997; YOSHIOKA et al., 2003), entretanto, Kikuchi et al. (2002) verificaram que este período de incubação de ovócitos com espermatozoides por seis horas dobrou o número de espermatozoides por ovócito com maior taxa de polispermia em relação ao período de três horas.

Estudos recentes tem visado alterar o tempo de co-incubação de seis horas para dez minutos, mantendo os ovócitos com os espermatozoides, aderidos à zona pelúcida, no mesmo meio de FIV sem espermatozoides em suspensão no meio por mais duas horas. Isso tem sido proposto como uma possível estratégia a fim de melhorar a eficiência do sistema, porém deve-se considerar que há o efeito do macho sobre a capacidade de fertilização dos espermatozoides, além da proporção espermatozoides:ovócitos (GIL et al., 2007).

Além desse método, existem outros que visam mimetizar a seleção que ocorre *in vivo*, dessa maneira o espermatozoide deve superar algum obstáculo imposto artificialmente, apesar desta abordagem reduzir a incidência de polispermia, ele não elimina o problema completamente. São estes os métodos de: climbing-over-a-wall method (FUNAHASHI e NAGAI, 2000); biomimetic microchannel IVF system (WHEELER et al., 2004); straw IVF (LI et al., 2003), modified swim-up method (PARK et al., 2009) e microfluidic sperm sorter (SANO et al., 2010).

Contudo a eficiência da FIV é afetada pelo meio de cultivo e pelos componentes nele suplementados. Os meios de FIV mais comuns são o meio Tris tamponado modificado (mTBM), o meio de cultura de tecidos 199 (TCM199), o meio de Tyrode modificado (mTALP) e o meio de Whitten modificado (mWM). A maioria desses meios são suplementados com cafeína para aumentar a motilidade espermática e induzir a capacitação, entretanto, pode ocorrer reação acrossômica espontânea induzida pela cafeína e isto se relaciona com aumento na incidência de polispermia (FUNAHASHI e NAGAI, 2001). Funahashi et al. (2000) diminuíram a penetração polispérmica por meio da substituição da cafeína pela adenosina e pelo peptídeo promotor de fertilização (87 *versus* 21 e 25%, respectivamente). Similar a esses componentes, Suzuki et al. (2000) verificaram que o ácido hialurônico parece induzir a capacitação espermática sem que ocorra reação acrossômica espontânea e diminuir a polispermia sem efeito na taxa de penetração.

2.3. Cultivo *in vitro*

Como consequência dos problemas ocorridos durante a MIV e a FIV, os embriões durante a etapa de cultivo apresentam baixo desenvolvimento em termos de

taxa de formação de blastocistos e número de células por blastocisto (DANG-NGUYEN et al., 2011).

É amplamente difundido que a atmosfera de incubação ideal para CIV de embriões de suínos é de 5 % de CO₂ e 5 % de O₂ (BERTHELOT e TERQUI, 1996; KIKUCHI et al., 2002). De acordo com Kikuchi et al. (2002), quando ovócitos maturados e fertilizados *in vitro* foram cultivados em meio suplementado com piruvato e lactato pelos primeiros dois dias e, em seguida, com glicose durante quatro dias subsequentes, a proporção e a qualidade dos blastocistos foram maiores. Alguns estudos indicaram que a glicose no meio de CIV nos primeiros dois dias de cultura, é prejudicial para o desenvolvimento de embriões por resultar na formação de maiores quantidades de ROS, que induz a apoptose (KARJA et al., 2006).

O meio de cultivo mais utilizado é o NCSU (PETTERS e WELLS, 1993) e, normalmente este é suplementado com albumina sérica bovina (BSA) para suportar o desenvolvimento de embriões de uma célula (MENINO e WRIGHT, 1982) até o estágio de blastocisto (DOBRINSKY et al., 1996). A combinação do meio NCSU com BSA aumentou a porcentagem de blastocistos quando comparado a outros meios (LONG et al., 1999). Yoshioka et al. (2008) desenvolveram um meio quimicamente definido para o cultivo de embriões *in vitro* (Porcine Zygote Medium - PZM) baseado na composição do fluido do oviduto. Além desses meios, existem o meio de Whitten (MENINO e WRIGHT, 1982), meio de Krebs modificado (KRISHER et al., 1989) e o meio Beltsville de cultura de embriões-3 (DOBRINSKY et al., 1996).

Estudos que compararam a eficácia entre os diferentes meios mostraram que o meio NCSU-23 foi superior em termos de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (LONG et al., 1999). Diferenças na quantidade de glicose, piruvato e lactato foram considerados como sendo a causa primária para a variância observada entre os meios.

2.4. Espécies reativas de oxigênio

Na respiração aeróbia são produzidas as espécies reativas de oxigênio, como: superóxido de hidrogênio, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila.

Essas são moléculas altamente reativas e podem prejudicar a célula por remover elétrons de outras moléculas, podendo causar fragmentação de DNA e RNA e/ou induzir peroxidação lipídica (BING et al., 2002). Para neutralizar o ROS, as células produzem antioxidantes os quais podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Dentre os enzimáticos têm-se o superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutatona peroxidase e entre os não enzimáticos se encontram os antioxidantes protéicos como a melatonina, além das vitaminas, flavonoides, a GSH e quelantes de metais (Cu^{+2} e $\text{Fe}^{+2/+3}$) (TAKAHASHI, 2012) (Fig. 2).

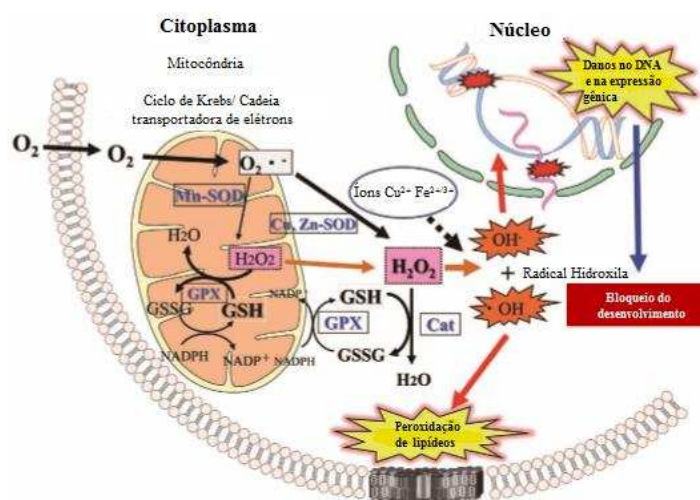


FIG. 2 Esquema da geração de ROS e seus efeitos sobre as funções celulares. Adaptado de Takahashi (2012).

Em particular, ovócitos em estágio inicial de desenvolvimento são mais susceptíveis ao estresse oxidativo, e a competência do desenvolvimento fica comprometida, por acelerar o processo de apoptose celular (KARJA et al., 2004), reduzindo o número de células do embrião. Ademais, estudos revelaram alterações no padrão de expressão gênica de ovócitos produzidos *in vitro* em relação aos produzidos *in vivo* em camundongos (LEE et al., 2001)

Como proteção, o ovócito sintetiza GSH por meio das células do CCOs (DE MATOS et al., 2002) que sugeriram que essas células, durante a MIV, desempenham papel importante na síntese de GSH para o ovócito, por meio da cisteína, presente nos meios, e utilizada como precursora. Além disso, Yoshida et al. (1992) comprovou que o fluido folicular contém substâncias que melhoram a expansão das células do CCOs, a maturação nuclear e a fecundação, quando é adicionado ao meio de maturação.

Corroborando, Tatemoto et al. (2004) sugeriram que o fluido folicular contribui na proteção dos ovócitos contra o estresse oxidativo, pois possui altas concentrações de SOD, o que melhora a maturação citoplasmática e a competência de desenvolvimento pós-fecundação.

2.5. Proteína específica do oviduto

O oviduto é um órgão secretório que fornece ambiente adequado para maturação ovocitária, capacitação espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (HUNTER, 2003). Isso ocorre devido a mudanças bioquímicas e fisiológicas devido a ação hormonal durante os diferentes períodos do ciclo estral. O oviduto de suínos expressa e libera, pelo menos 14 proteínas (BUHI et al., 1990) e apenas algumas foram identificadas e caracterizadas, como: glicoproteína específica do oviduto (BUHI et al., 1990; BUHI, 2002), inibidor tecidual de metaloproteinases (BUHI et al., 1997) e inibidor do ativador do plasminogênio (KOUBA et al., 2000). Expressão destas proteínas sugere interações fisiologicamente relevantes com gametas antes e durante a fertilização e na clivagem inicial embrionária.

Estudos identificaram a glicoproteína específica do oviduto em ratas (KAPUR e JOHNSON, 1985), hamster (LEVEILLE, 1987), coelhas (OLIPHANT e ROSS, 1982), ovelhas (MURRAY, 1993) vacas (BOICE, 1990), babuíno (FAZLEABAS e VERHAGE, 1986), mulheres (BUHI, 1989) e suínos (BUHI et al., 1992), e esta é dependente das elevadas concentrações de estrógeno durante o estro ou períodos pré e pós-ovulatórios. A glicoproteína específica do oviduto, que possui peso molecular de 56,3 kDa, foi observada em forte associação com a zona pelúcida e espaço perivitelino do ovócito (BUHI et al., 1993). Essa associação, possivelmente, reduziu os índices de polispermia *in vitro*, sem alterar os índices de penetração dos espermatozoides no ovócito e, conseqüentemente, melhorou o desenvolvimento embrionário (BUHI, 2002).

Nos estudos de Kouba et al. (2000) foram observados que concentrações de 100 µg/mL de pOSP diminuíram a ligação dos espermatozoides nos ovócitos de suínos comparado com o controle (41 versus 74 %). Concentrações de pOSP 10-100 µg/mL diminuiu a polispermia quando comparado com o controle (24-29 versus 61 %). Por isso, a concentração de 10 µg/mL de pOSP foi selecionado para a maioria dos experimentos subsequentes, pois esta concentração diminuiu significativamente a

polispermia, enquanto as taxas de penetração foram semelhantes aos do controle. Outro evento analisado neste estudo foram as taxas de clivagem e o desenvolvimento dos blastocistos, onde não se observou efeito dos tratamentos nas taxas de clivagem de ovócitos fertilizados e cultivados na presença de pOSP. No entanto, houve efeito do tratamento com pOSP no desenvolvimento de blastocistos. Aumento no número de blastocistos monospermicos foi observado quando pOSP foi adicionada durante a pré-incubação / FIV em comparação com o controle.

Semelhante a esses estudos, Mc Cauley et al. (2003) verificaram que ovócitos pré-incubados com a glicoproteína específica do oviduto por três horas, nas concentrações de 10 e 20 µg/mL, diminuiriam a incidência de polispermia e o número de espermatozoides ligados por ovócito, sem alterar a taxa de penetração. Também foi avaliada a pré-incubação da pOSP com o ovócito, com o espermatozoide e com ambos para avaliar se haveria sinergismo entre os tratamentos. Houve diminuição da polispermia, porém sem efeito sinérgico. No caso do espermatozoide, foi avaliado se a pOSP teria efeito na reação acrossômica, porém não houve diferença quando comparado ao controle. Logo, foi sugerido que a redução da polispermia deveu-se a diminuição do número de espermatozoides que interagiram com a zona pelúcida e, não devido à modulação da capacitação. Contudo, não houve aumento no número de blastocistos formados, porém aumentou o número de embriões monospermicos. Segundo os autores, a redução da polispermia dar-se-ia pelo fato da pOSP se ligar à zona pelúcida e formar uma barreira física para ligação de espermatozoides ou ocupar/modificar os sítios de ligação de espermatozoides já que o número de espermatozoides ligados a zona pelúcida foi reduzido por exposição dos ovócitos a pOSP. Entretanto, não se deve descartar os efeitos diretos da pOSP sobre a função espermática, porque o tratamento isolado de espermatozoides, também, reduziu a polispermia.

Nos estudos de Coy et al. (2008) foi analisado o efeito do fluido do oviduto no tempo de digestão da zona pelúcida e no efeito do mesmo na polispermia em suínos e bovinos. Em suínos houve maior tempo de digestão da zona pelúcida a pronase quando foi utilizado fluido do oviduto pré-ovulatório de porcas ou, quando fora utilizado fluido do oviduto de novilhas, mostrando que há reação cruzada entre essas espécies. Em bovinos também houve aumento no tempo de digestão a pronase com fluido de oviduto de novilhas em fase folicular. Em consequência destes resultados, foram

observados que houve aumento nas taxas de monospermia, sem alterar as porcentagens de penetração, em ovócitos de suínos fertilizados com o fluido do oviduto. Adicionalmente, houve diminuição no número de espermatozoides ligados a zona pelúcida.

Deste modo, *in vivo*, a fertilização polispérmica é controlada por pelo menos dois mecanismos principais: o sistema reprodutivo que restringe o número de espermatozoides capacitados que atingem o sítio da fertilização; e a penetração espermática que desencadeia a exocitose dos grânulos corticais e, conseqüentemente, a reação na superfície da zona pelúcida. O ambiente *in vitro*, aumenta drasticamente o número de espermatozoides que alcançam a superfície do ovócito e se ligam à zona pelúcida, no entanto, a razão pela qual isso é mais problemático para ovócitos de suíno do que para os ovócitos de outras espécies, ainda é desconhecida. O papel que a pOSP pode desempenhar na reação cortical ou na reação da zona, ainda é desconhecido.

Quando foram depositados mais que o suficiente de espermatozoides no local de fertilização do suíno, muitos ovócitos foram penetrados por mais do que um espermatozoide mesmo em condições *in vivo* (HUNTER, 1973). Parece, portanto, que os ovócitos suínos têm, por natureza, limitada competência para bloquear a polispermia, e as condições de fertilização podem muito bem afetar a penetração monospérmica (NAGAI, 1994). As células epiteliais do oviduto demonstraram serem eficazes na redução de polispermia de embriões suínos produzidos *in vitro* (NAGAI e MOOR, 1990, KANO et al., 1994). Nagai e Moor (1990) sugeriram que uma das razões para esta melhoria foi a presença de glicoproteínas. Porém as células do oviduto, também, secretam glicosaminoglicanos (como o ácido hialurônico) que tanto no fluido do oviduto (*in vivo*) como no meio (*in vitro*), podem muito bem ser a causa das melhorias nas taxas de monospermia.

Apesar disso, mecanismos moleculares das interações de gametas no ambiente do oviduto não são completamente compreendidos. Portanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a atuação da pOSP nos processos da fertilização *in vitro*, como a possibilidade de diferentes glicosilações da pOSP, em relação ao tempo de ovulação, poderem afetar a função da pOSP ou, ainda, analisar a função específica de diferentes isoformas da pOSP (E1, E2 e E3), determinando a função específica das mesmas e como seriam suas atuações.

Além disso a função da pOSP como substância antioxidante e outras potenciais funções protetoras durante o desenvolvimento *in vitro* de ovócitos suínos ainda são desconhecidas. Até o presente, nenhum mecanismo foi encontrado para a via a qual a pOSP poderia atuar protegendo contra a peroxidação lipídica em suínos e a geração de ROS.

2.6. Melatonina

A melatonina (N - acetil - 5 – metoxitriptamina) é sintetizada a partir do triptofano via serotonina e possui peso molecular de 232 kDa (SUGDEN, 1989). Além de ser produzida na glândula pineal, também o é em diversos órgãos, células e tecidos como: cérebro, células do sistema gastrointestinal, testículos, ovários, medula espinhal, linfócitos, retina, córnea e na pele (REITER et al., 2013)

A biossíntese da melatonina compreende a captação do triptofano, do sangue, pelos pinealócitos onde haverá a conversão de triptofano em 5-hidroxitriptofano por meio da ação da 5-triptofano hidroxilase. Este sofre descarboxilação e forma a serotonina (TAMURA et al., 2009). Em seguida a serotonina é convertida em N-acetilserotonina por meio de reação de acetilação (IUVONE et al., 2005) e, finalmente, a enzima acetilserotonina O-metiltransferase catalisa a reação de metilação formando a melatonina (STEHLE et al., 2011).

A melatonina tem papéis fisiológicos essenciais e é importante para o sono, regulação da temperatura, metabolismo, ritmicidade circadiana e sazonal, bem como a fisiologia reprodutiva em alguns mamíferos (ARENDRT et al., 1995). Além disso, ela está envolvida na proteção dos embriões contra os danos oxidativos, agindo como quelante de radicais livres, incluindo o radical peróxido e o radical hidroxila (REITER et al., 2000). Além disso, pode estimular a atividade da SOD e glutathione peroxidase (TAMURA et al., 2009). O efeito benéfico da suplementação de meios de cultivo com a melatonina, durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões, tem sido relatado em espécies, como ramsters e suínos (TIAN et al., 2010). No entanto, o mecanismo de ação da melatonina sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões continua sendo elucidado.

Todas as células vivas produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) que são pré-requisitos essenciais para as suas funções normais, no entanto, a formação excessiva de ROS pode influenciar a estrutura e função dos diferentes tipos de

moléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, o que resulta em dano mitocondrial, depleção de ATP e a apoptose (GUERIN et al., 2001). O aumento do estresse oxidativo parece ser um fator importante, prejudicando o desenvolvimento embrionário de mamíferos *in vitro*. Fisiologicamente, os embriões podem ser protegidos contra os radicais livres por antioxidantes presente no fluido do oviduto (LEGGE e SELLENS, 1991), mas os embriões *in vitro* são suscetíveis ao estresse oxidativo durante o cultivo (GUERIN et al., 2001). Em contraste com outros antioxidantes que são, lipófilicos ou hidrófilicos, a melatonina é ampifílica e, por isso, atravessa facilmente as barreiras morfofisiológicas (REITER et al., 2013) Em búfalas, a suplementação da melatonina nos meios de maturação melhorou a taxa de maturação nuclear de ovócitos, reduzindo o estresse oxidativo, a peroxidação de lipídeos e danos ao DNA (MANJUNATHA et al., 2009).

A melatonina, além de estimular a expressão de enzimas antioxidantes (KORKMAZ e REITER, 2008), também estimula o sistema imune e genes anti-inflamatórios (MAURIZ et al., 2013) que protegem as células contra infecções bacterianas e virais (BOGA et al., 2012). Além disso, estudos revelam um papel da melatonina nas modificações epigenéticas (KORKMAZ et al., 2012).

A melatonina, também, influencia a produção de esteróides sexuais durante os diferentes estádios de maturação do folículo, por inibição da expressão de genes específicos para a produção de progesterona, androstenediona e estrogênio (ADRIAENS et al., 2006). Nos seres humanos, Woo et al. (2001) observaram que a melatonina modula a resposta folicular ao LH por aumentar a expressão de mRNA de receptores de LH nas células da granulosa. Além disso, a melatonina promove o desenvolvimento folicular por elevação da produção do fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-1) que promove o crescimento de células da granulosa (PICINATO et al., 2008).

A melatonina, também, desempenha papel na regulação da maturação do ovócito. Um esteróide progestacional, 17α , 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, foi identificado como hormônio de indução de maturação (MIH) (SEN et al., 2002), o qual é regulado pela melatonina que acelera a formação de MPF (fator promotor da maturação) e promove a quebra da vesícula germinativa de ovócitos de carpas (CHATTORAJ et al., 2005). Além disso, a outra forma de promoção da síntese de MPF regulada pela melatonina é pelo aumento do receptor de hormônio folículo-estimulante. Os receptores da melatonina foram identificados, também, em células da

granulosa, o que sugere possibilidade de que a melatonina pode ter participação na maturação do ovócito (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). Essa função na promoção da maturação do ovócito foi observado em diversas espécies como bovinos, suínos, búfalos e ovinos (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007; MANJUNATHA et al., 2009; CASÃO et al., 2010; EL-RAEY et al., 2011).

Em ovinos, a melatonina melhorou a sobrevivência de embriões descongelados submetidos ao cultivo. Quando utilizada na concentração entre 10^{-6} M e 10^{-5} M, ela aumentou a taxa de embriões eclodidos após 24 horas em cultivo e diminuiu a porcentagem de degeneração em embriões no final do CIV (ABECIA et al., 2002). Em bovinos, a melatonina também melhorou o desenvolvimento *in vitro* de embriões e diminuindo o estresse oxidativo quando utilizada na concentração de 10^{-4} M, sob atmosfera com 20 % de O_2 (PAPIS et al., 2007). Em suínos, a melatonina tem sido usada para promover a MIV dos ovócitos e o desenvolvimento embrionário.

No estudo de Shi et al. (2009) os autores verificaram que a melatonina no fluido folicular de suínos apresentava concentração de 10^{-11} M, sugerindo que a melatonina tem importante papel na maturação *in vivo*. Neste mesmo trabalho, os autores adicionaram melatonina no meio de maturação *in vitro* e observaram que a melhor concentração, que poderia aumentar o número de ovócitos maturados e melhorar o desenvolvimento de embriões *in vitro*, seria de 10^{-9} M. Já em outro experimento, suplementações superiores de 4×10^{-8} M de melatonina durante a maturação *in vitro* de ovócitos resultou em maior percentual de ovócitos com extrusão do corpúsculo polar e porcentagem maior de ovócitos ativados partenogeneticamente desenvolvidos para blastocistos (KANG et al., 2009).

Os efeitos benéficos da melatonina observados durante o desenvolvimento embrionário são parcialmente atribuídos à sua capacidade para regular negativamente a expressão de genes pró-apoptóticos (BAX e caspase-3) e para regular a expressão de gene anti-apoptóticos (Bcl-2), acompanhados por aumento de glutathiona intracelular e redução da produção de ROS (MOHSENI et al., 2012). Essas mudanças levam a diminuição de apoptose nos blastocistos, a melhoria na qualidade do embrião e aumento da eficiência da implantação (WANG et al., 2013).

Durante o CIV, os embriões são expostos a condições de estresse oxidativo relativamente altos em comparação com o ambiente *in vivo*, em que a produção de ROS em embriões é muito menor (CHOI et al., 2008). A produção de ROS nas condições de cultivo é deletério para o embrião, porque a geração de excedentes de

ROS interagem com lipídios, causando danos as moléculas. Isto resulta em perda de integridade da membrana, alterações estruturais ou funcionais de proteínas, danos em ácidos nucleicos (TAMURA et al., 2012). Além disso, ovócitos e embriões de raças ou linhagens específicas de suínos poderiam se comportar de maneira diferente, apresentando maiores prejuízos em relação à peroxidação durante o cultivo, já que o conteúdo de lipídeos difere entre estas substancialmente (AMORIM et al., 2012).

Enriquecendo o meio de cultivo com a melatonina tem mostrado efeitos benéficos a longo prazo sobre o desenvolvimento de embriões em murinos (ISHIZUKA et al., 2000), suínos (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007), bovinos (SAMPAIO et al., 2012), ovinos (ABECIA et al., 2002) e caprinos (BERLINGUER et al., 2009). Por outro lado, o efeito da melatonina sobre a taxa de produção de blastocisto pode variar amplamente dependendo das concentrações (MANJUNATHA et al., 2009) e condições de cultivo (KIM et al., 2013), tal como a tensão de oxigênio empregada (PAPIS et al., 2007).

Embora existam trabalhos sobre os possíveis efeitos da melatonina no desenvolvimento *in vitro* de ovócitos e embriões suínos, a literatura ainda é deficitária. Há necessidade de maiores esclarecimentos sobre o mecanismo exato de atuação da melatonina nas diferentes fases da PIV de diferentes espécies, desde como ela pode ser usada na maturação mimetizando as condições *in vivo* já que ela está presente no fluido folicular, assim como maiores investigações sobre o benefício que ela pode trazer durante a fertilização e cultivo embrionário.

3. HIPÓTESE

A técnica de DNA recombinante facilita o uso da proteína específica do oviduto na suplementação dos meios de maturação *in vitro* de ovócitos de suínos e sua associação com a melatonina melhoram a qualidade dos ovócitos e embriões.

4. OBJETIVOS

-Produzir de maneira eficaz a pOSP recombinante.

-Avaliar os efeitos da pOSP e da melatonina nos meios de maturação *in vitro*, sendo para isso avaliados nos ovócitos a maturação ovocitária a partir da análise da expansão das células do cumulus;

-Realizar a dosagem de ROS presentes nos ovócitos e sua relação com a qualidade ovocitária;

-Avaliar a produção de embrião pelas taxas de clivagens.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABECIA, J. A.; FORCADA F.; ZUNIGA, O. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro*. **Veterinary Research Communications**, v.26, p.151–158, 2002
2. ABEYDEERA, L. R.; DAY, B. N. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.57, p.729–734, 1997
3. 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.
4. ALGRIANY, O.; BEVERS, M.; SCHOEVERS, E.; COLENBRANDER, B.; DIELEMAN, S. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on *in vitro* cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. **Theriogenology**, v.62, p.1483–1497, 2004.
5. AMORIM, L. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; EBERLIN, M. N.; GOZZO, F. C.; Guimarães, J. D. Comparação do Perfil Lipídico de Blastocistos Produzidos *in vivo* de Suínos de Linhagem Comercial e Nativos Piau. **In: 48º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2011.
6. ARENDT, J.; DEACON, S.; ENGLISH, J.; HAMPTON, S.; MORGAN, L. Melatonin and adjustment to phase shift. **Journal of Sleep Research**, v.4, p.74–79, 1995.
7. BERLINGUER, F.; LEONI, G. C.; SUCCU, S.; SPEZZIGU, A.; MADEDDU, M.; SATTÀ, V.; BEBBERE, D.; CONTRERAS-SOLIS, I.; GONZALEZ-BULNES, A.; NAITANA, S. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. **Journal Pineal Research**, v.46, p.383–391, 2009
8. BERTHELOT, F.; TERQUI, M. Effects of oxygen, CO₂/pH and medium on the *in vitro* development of individually cultured porcine one- and two-cell embryos. **Reproduction Nutrition and Development**, v.36, p.241–251, 1996.
9. BING, Y. Z.; HIRAO, Y.; CHE, M.; IGA, K.; TAKENOUCHE, N.; KUWAIAMA, M.; FUCHIMOTO, D.; MARTINEZ, H. R.; NAGAI, T. *In vitro* maturation and

- glutathione synthesis of porcine in the presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of cumulus cells. **Reproduction Fertility and Development**, v. 14, p 124-131, 2002.
10. BOGA, J. A.; COTO-MONTES, A.; ROSALES-CORRAL, S. A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Beneficial actions of melatonin in the management of viral infections: a new use for this molecular handyman. **Reviews in Medical Virology**, v.22, p.323–338, 2012.
 11. BOICE, M. L.; GEISERT, R. D.; BLAIR, R. M.; VERHAGE, H. G. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. **Biology of Reproduction**, v.43, p.457-465, 1990.
 12. BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; PICKARD, A. R.; MCINTUSH, E. W.; KOUBA, A. J.; ASHWORTH, C. J.; SMITH, M.F. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and messenger ribonucleic acid by the oviduct of cyclic, early pregnant and ovariectomized steroid treated gilts. **Biology of Reproduction**, v.57 p.7–15, 1997.
 13. BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; SUDHIPONG, V.; DONNES-SMITH, M. M. Identification of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. **Biology of Reproduction**, v.43, p.929–38, 1990.
 14. BUHI, W.C.; ASHWORTH, C. J.; BAZER, F. W.; ALVAREZ, I. M. *In vitro* synthesis of oviductal secretory proteins by estrogen-treated ovariectomized gilts. **Journal of Experimental Zoology**, v. 262, p.426-435, 1992.
 15. BUHI, W. C.; O'BRIEN, B.; ALVAREZ, I. M.; ERDOS, G.; DUBOIS, D. Immunogold localization of porcine oviductal secretory glycoproteins within the zona pellucida, perivitelline space and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. **Biology of reproduction**, v.48, p.1274–83, 1993.
 16. BUHI, W. C.; VAN WERT, J. W.; ALVAREZ, I. M.; DONNES-SMITH, M. M.; BERNHEISEL, M. A. Synthesis and secretion of proteins by postpartum human oviductal tissue in culture. **Fertility and Sterility**, v.51, p.75-80, 1989.
 17. BUHI, W. C. Characterization and biological roles of oviduct specific estrogen-dependent glycoprotein. **Reproduction**, v.123, p.355–62, 2002
 18. CASAO, A.; ABECIA, J. A.; CEBRIAN PEREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T.; VÁZQUEZ, M. I.; FORCADA, F. The effects of melatonin on *in vitro* oocyte competence and embryo development in sheep. Spanish **Journal of Agricultural Research**, v.8, p.35–41, 2010
 19. CHATTORAJ, A.; BHATTACHARYYA, S.; BASU, D.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, S.; MAITRA, S. K. Melatonin accelerates maturation inducing

- hormone (MIH): induced oocyte maturation in carps. **General and Comparative Endocrinology**, v.140, p.145–155, 2005
20. CHOI, J.; PARK, S. M.; LEE, M.; KIM, J. H.; JEONG, Y. I.; LEE, J. Y.; PARK, S. W.; KIM, H. S.; HOSSEIN, M. S.; JEONG, Y. W.; KIM, S.; HYUN, S.H.; WANG, W. S. Anti-apoptotic effect of melatonin on porcine parthenogenic embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.1127–1135, 2008.
 21. COY, P.; CÁNOVAS, S.; MONDEJAR, I.; SAAVEDRA, M. D.; ROMAR, R.; GRULLÓN, L.; MATÁS, C.; AVILÉS, M. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. **Proceedings** of the National Academy of Sciences, v. 105, 2008.
 22. DANG-NGUYEN, T. Q.; SOMFAI, T.; HARAGUCHI, S.; KIKUCHI, K.; TAJIMA, A.; KANAI, Y.; NAGAI, T. *In vitro* production of porcine embryos: current status, future perspectives and alternative applications. **Animal Science Journal**, v.82, p.374–382, 2011.
 23. DE MATOS, D. G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S. R.; THOMPSON, J. G. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v. 57, p. 1443-51, 2002.
 24. DOBRINSKY, J. R.; JOHNSON, L. A.; RATH, D. Development of a cultured medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1069–1074, 1996.
 25. EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; SOSA, G. A.; ABAU EL-ROOS, M. E. A.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.78, p.250–262, 2011.
 26. EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M.; WIGGLESWORTH, K. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.44, p.260–273, 1996.
 27. FAZLEABAS, A. T.; VERHAGE, H. G. The detection of oviduct-specific proteins in the baboon (*Papio anubis*). **Biology of Reproduction**, v.35, p.455–462, 1986.
 28. FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T. C.; DAY, B. N. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following *in vitro* fertilization. **Biology of Reproduction**, v.57, p.49–53, 1997.

29. FUNAHASHI, H.; FUJIWARA, T.; NAGAI, T. Modulation of function of boar spermatozoa via adenosine and fertilization-promoting peptide receptors reduce the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1157–1163, 2000.
30. FUNAHASHI, H.; FUJIWARA, T.; NAGAI, T. Modulation of the function of boar spermatozoa via adenosine and fertilization promoting peptide receptors reduce the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1157–1163, 2000.
31. FUNAHASHI, H.; NAGAI, T. Sperm selection by a climbing-over-a-wall IVF method reduces the incidence of polyspermic penetration of porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v.46, p.319– 324, 2000.
32. FUNAHASHI, H.; NAGAI, T. Regulation of *in vitro* penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.424–431, 2001.
33. GIL, M. A.; ALMINANA, C.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ E. A. Brief co-incubation of gametes in porcine *in vitro* fertilization: role of sperm:oocyte ratio and post-coincubation medium. **Theriogenology**, v.67, p.620–6, 2007
34. GIL, M. A.; ALMINANA, C.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A. Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. **Theriogenology**, v.70, p.1260–1268, 2008.
35. GREGG, K.; XIANG, T.; ARENIVAS, S. S.; HWANG, E.; ARENIVAS, F.; CHEN, S. H.; WALKER, S.; PICOU, A.; OLEJAEVA, I. Risk assessment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) transmission via somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryo production using oocytes from commercial abattoirs. **Animal Reproduction Science**, v.125, p.148–157, 2011.
36. GUERIN, P.; 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.175–89, 2001.
37. HUNTER, R. H. Reflections upon sperm-endosalpigeal and sperm-zona pellucid interactions *in vivo* and *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.147–154, 2003
38. HUNTER, R. H. F. Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition excessive numbers of spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v.183, p.183, 1973.
39. ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; MURAI, K.; AMEMIYA, A.; ITOH, M. T. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. **Journal Pineal Research**, v.28, p.48–51, 2000.

40. IUVONE, P. M.; TOSINI, G.; POZDEYEV, N.; HAGUE, R.; KLEIN, D. C.; CHAURASIA, S. S. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.24, p.433–436, 2005.
41. KANG, J. T.; KOO, O. J.; KWON, D. K.; PARK HJ, JANG G, LEE BC. Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulose cells. **Journal Pineal Research**, v.46, p.22–28, 2009.
42. KANO, K.; MIYANO, T.; KATO, S. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v.42, p. 1061-1068, 1994.
43. KAPUR R. P.; JOHNSON, L. V. An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. **Development of Biology**, v.112, p.89- 93, 1985.
44. KARJA, N. W.; KIKUCHI, K.; FAHRUDIN, M.; OZAWA, M.; SOMFAI, T.; OHNUMA, K.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; NAGAI T. Development to the blastocyst stage, the oxidative state, and the quality of early developmental stage of porcine embryos cultured in alteration of glucose concentrations *in vitro* under different oxygen tensions. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.6, p.54, 2006
45. KARJA, N. W. N.; WONGSRIKEAO, P.; MURAKAMI, M.; AGUNG, B.; FAHRUDIN, M.; NAGAI, T.; OTOI, T. Effects of tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. **Theriogenology**, v. 62, p.1585-95, 2004.
46. KIKUCHI, K.; ONISHI, A.; KASHIWAZAKI, N.; IWAMOTO, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; AKITA, T.; NAGAI T. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1033–1041, 2002.
47. KIM, M. K.; PARK, E. A.; KIM, H. J.; CHOI, W. Y.; CHO, J. H.; LEE, W. S.; CHA, K. Y.; KIM, Y. S.; LEE, D. R.; YOON, T. K. Does supplementation of *in vitro* culture medium with melatonin improve IVF outcome in PCOS. **Reproductive BioMedicine Online**, v.26, p.22–29, 2013.
48. KORKMAZ, A.; REITER, R. J. Epigenetic regulation: a new research area for melatonin. **Journal Pineal Research**, v.44, p.41–44, 2008.
49. KORKMAZ, A.; ROSALES-CORRAL, S.; REITER, R. J. Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. **Gene**, v.503, p.1–11, 2012.
50. KOUBA, A. J.; BURKHARDT, B. R.; ALVAREZ, I. M.; GOODENOW, M. M.; BUHI, W. C. Oviductal plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): mRNA, protein,

- and hormonal regulation during the estrus cycle and early pregnancy in the pig. **Molecular Reproduction and Development**, v.56, p.378–86, 2000.
51. KOUBA, A. J.; ABEYDEERA, L. R.; ALVAREZ, I. M.; DAY, B. N.; BUHI, W. C. Effects of the Porcine Oviduct-Specific Glycoprotein on Fertilization, Polyspermy, and Embryonic Development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 242–250, 2000.
 52. KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, p.463–471, 1999.
 53. KRISHER, R. L.; PETTERS, R. M.; JOHNSON, B. H.; BAVISTER, B. D.; ARCHIBONG, A. E. Development of porcine embryos from the one-cell stage to blastocyst in mouse oviducts maintained in organ-culture. **Journal of Experimental Zoology**, v.249, p.235–9, 1989.
 54. LEE, K. F.; CHOW, J. F.; XU, J. S.; CHAN, S. T.; IP, S. M.; YEUNG, W. S. A comparative study of gene expression in murine embryos developed *in vivo*, cultured *in vitro*, and co-cultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. **Biology of Reproduction**, v.64, p.910–917, 2001.
 55. LEGGE, M.; SELLENS, M. H. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. **Human Reproduction**, v.6, p.867–71, 1991.
 56. LEVEILLE, M. C.; ROBERTS, K. D.; CHEVALIER, S.; CHAPDELAIN, A.; BLEAU G. Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v.36, p.227-238, 1987.
 57. LI, Y. H.; MA, W.; LI, M.; HOU, Y.; JIAO, L. H.; WANG, W. H. Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new *in vitro* fertilization (IVF) system: straw IVF. **Biology of Reproduction**, n.69, p.1580–1585, 2003
 58. LONG, C. R.; DOBRINSKY, J. R.; JOHNSON, L.A. *In vitro* production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. **Theriogenology**, v.51, p.1375–1390, 1999.
 59. MAEDOMARI, N.; KIKUCHI, K.; OZAWA, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; OHNUMA, K.; NAKAI, M.; SHINO, M.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N. Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development *in vitro*. **Theriogenology**, v.67, p.983–993, 2007.
 60. 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 Animal**, v.44, p.12–16, 2009.

61. MAURIZ, J. L.; COLLADO, P. S.; VENEROSO, C.; REITER, R. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal Pineal Research**, v.54, p.1–14, 2013.
62. MCCAULEY, T. C.; BUHL, W. C.; WU, G. M.; MAO, J.; CAAMANO, J. N.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.69, p. 828–834, 2003.
63. MENINO, A. R. JR.; WRIGHT, R. W. JR. Development of one-cell porcine embryos in two culture systems. **Journal of Animal Science**, v.54, p.583–588, 1982.
64. MOHSENI, M.; MIHANDOOST, E.; SHIRAZI, A.; SEPEHRIZADEH, Z.; BAZZAZ, J.T.; GHAZI-KHANSARI, M. Melatonin may play a role in modulation of bax and bcl-2 expression levels to protect rat peripheral blood lymphocytes from gamma irradiation-induced apoptosis. **Mutation Research**, v.739, p.19–27, 2012.
65. MURRAY, M. K. An estrogen-dependent glycoprotein is synthesized and released from the oviduct in a temporal- and region-specific manner during early pregnancy in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.48, p.446-453, 1993.
66. NAGAI T. *In vitro* maturation and fertilization of pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.153–163, 1996
67. NAGAI T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291–1301, 2001.
68. NAGAI, T. Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. **Theriogenology**, v.41, p.73-78, 1994.
69. NAGAI, T.; MOOR, R. M. Effect of oviduct cell on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.26, p.377-382, 1990.
70. NIWA, K. Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.48, p.49–59, 1993.
71. OLIPHANT, G.; ROSS, P. R. Demonstration of production and isolation of three sulfated glycoproteins from the rabbit oviduct. **Biology of Reproduction**, v.26, p.537-544, 1982.
72. PAPIS, K.; POLESZCZUK, O.; WENTA-MUCHALSKA, E.; MODLINSKI, J. A. Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. **Journal Pineal Research**, v.43, p.321–326, 2007.
73. PARK, C.; LEE, S.; CHOI, D.; LEE, C. A modified swim-up method reduces polyspermy during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.169–181, 2009.

74. PETTERS, R. M.; WELLS, K. D. Culture of pig embryos. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 48, p. 61-73, 1993.
75. PICINATO, M. C.; HIRATA, A. E.; CIPOLLA-NETO, J.; CURTI, R.; CARVALHO, C. R.; ANHÊ, G. F.; CARPINELLI, A. R. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. **Journal of Pineal Research**, v.44, p.88–94, 2008.
76. REITER, R. J.; TAN, D. X.; OSUNA, C.; GITTO, E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. **Journal of Biomedical Science**, v.7, p.444–58, 2000.
77. REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v.92, p.328–43, 2009.
78. REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S. A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. **International Journal of Molecular Science**, v.14, p.7231–7272, 2013.
79. RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KIM, I. J.; WANG, H. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos *in vitro*. **Journal Pineal Research**, v.43, p.283–288, 2007.
80. SAMPAIO, R. V.; CONCEIÇÃO, S.; MIRANDA, M. S.; SAMPAIO, L.; DE, F.; OHASHI, O. M. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.103, 2012.
81. SANO, H.; MATSUURA, K.; NARUSE, K.; FUNAHASHI, H. Application of a microfluidic sperm sorter to the in-vitro fertilization of porcine oocytes reduced the incidence of polyspermic penetration. **Theriogenology**, v.74, p.863–70, 2010.
82. SEN, U.; MUKHERJEE, D.; BHATTACHARYYA, S. P.; MUKHERJEE, D. Seasonal changes in plasma steroid levels in Indian major carp *Labeo rohita*: influence of homologous pituitary extract on steroid production and development of oocyte maturational competence. **General and Comparative Endocrinology**, v.128, p.123–134, 2002.
83. 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.
84. SOMFAI, T.; KIKUCHI, K.; ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; FUCHIMOTO, D.; PAPP, A. B.; SATO, E.; NAGAI, T. Relationship between the morphological changes of somatic compartment and the kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of

- oocytes during *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.68, p.484–491, 2004.
85. 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 Pineal Research**, v.51, p.17–43, 2011.
 86. SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, v.45, p.922–932, 1989.
 87. SUZUKI, K.; ERIKSSON, B.; SHIMIZU, H.; NAGAI, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized *in vitro*. **International Journal of Andrology**, v.23, p.13-21, 2000.
 88. TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, p.1-9, 2012.
 89. TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implication. **Fertility and Sterility**, v.92, p.328–343, 2009.
 90. TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; SUGINO, N.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal Ovarian Research**, v.25, p.5, 2012.
 91. TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA, T. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biology and Reproduction**, v.71, p.1150-57, 2004.
 92. TIAN, X. Z.; WEN, Q.; SHI, J. M.; LIANG, W.; ZENG, S. M.; TIAN, J. H.; ZHOU, G. B.; ZHU, S. E.; LIU, G.S. Effects of melatonin on *in vitro* development of mouse two-cell embryos cultured in HTF medium. **Endocrine Research**, v.35, p.17– 23, 2010.
 93. WANG, W. H.; ABEYDEERA, L. R.; PRATHER, R. S.; DAY, B. N. Morphologic comparison of ovulated and *in vitro* matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, p.308–316, 1998.
 94. 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.267-74, 2013.
95. WHEELER, M. B.; CLARK, S.; BEEBE, D. Developments in *in vitro* technologies for swine embryo production. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, p.15–25, 2004.
96. WOO, M. M.; TAI, C. J.; KANG, S. K.; NATHWANI, S. P.; PANG, S. F.; LEUNG, P. C. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.86, p.4789–4797, 2001.
97. YOSHIBA, M.; ISHIZAKI, Y.; KAWAGISHI, H.; KOJIMA, Y. Effects of pig fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and development capacity *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, n.2, 1992.
98. YOSHIDA, M.; ISHIGAKI, K.; NAGAI, T.; CHIKYU, M.; PURSEL, V. G. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. **Biology of Reproduction**, v.49, p.89–94, 1993.
99. YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; ITOH, S.; KIKUCHI, K.; IWAMURA, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Production of piglets derived from *in vitro*-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during *in vitro* fertilization. **Biology of Reproduction**, v.69, p.2092–2099, 2003.
100. YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; ONISHI, A. Defined system for *in vitro* production of porcine embryos using a single basic medium. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, p.208–213, 2008.
101. YUAN, Y.; KRISHER, R. L. *In vitro* maturation (IVM) of porcine oocytes. **Methods of Molecular Biology**, v.825, p.183–198, 2012.

CAPÍTULO 1 – Transferência de DNA exógeno para *Escherichia coli* para produção de proteína específica do oviduto de porcas, e seu uso na maturação *in vitro*

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a produção de proteína específica do oviduto de porcas recombinante (pOSP) para uso em meios de maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos de porcas. Avaliou-se o aumento da eficiência dos meios de MIV quando adicionado a pOSP durante as últimas quatro horas de maturação. Para aquisição da pOSP, foram realizadas técnicas de transgenia, indução da expressão e purificação e dosagem da proteína. Foram avaliadas a expansão das células do *cumulus compacto ooforus* (CCOs) e as concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos seguintes tratamentos (C = controle; T1 = proteína recombinante). A expansão de células do CCOs foram analisadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2) e a dosagem de ROS foi analisada pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Duncan com significância de 5 %. A avaliação da produção de pOSP foi feito por meio de eletroforese e a dosagem, pelo método de Bradford. Em relação a expansão das células do CCOs, houve diferença do controle em relação ao tratamento com a pOSP ($p=0,05$). Na dosagem de ROS houve diferença do grupo controle e o tratamento dos meios de maturação com adição da pOSP ($26,4\pm 10,9$ x $16,6\pm 10,5$ %; $p<0,05$). Conclui-se que a técnica para a produção de pOSP foi satisfatória e esta foi eficiente em melhorar a expansão das células do CCOs e resultam em menor quantidade de ROS, podendo a pOSP ser considerada um antioxidante proteico.

Palavras Chave: Maturação *in vitro*, proteína recombinante, suíno, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

The present study aimed the production of recombinant oviduct specific protein (pOSP) for the use in maturation medium of *in vitro* porcine oocytes. The increasing of the efficiency of the medium of maturation *in vitro*, when added to the pOSP in the last four hours of maturation, was evaluated. For the acquisition of protein, transgenic techniques, the induction of expression, purification and the dosage of glycoprotein were used. The expansion of the *cumulus oophorus* (CCOs) cells and the intracellular concentrations of reactive oxygen species (ROS) were evaluated in the following treatments (C = control; T1 = recombinant protein). The expansion of CCOs cells was analyzed by the chi-squared test (χ^2) and the dosage of ROS was analyzed by ANOVA. The means were compared by the Duncan Test, with a 5% probability of error. The evaluation of recombinant protein production was done by electrophoresis and the dosage was done by the Bradford method. Regarding the expansion of the CCOs cells, the group treated with the protein showed satisfactory results in relation to the control group ($p < 0.05$). On the dosage of ROS, there were differences on the control group and on the treatment of maturation media with the addition of the recombinant protein (26.4 ± 10.9 x 16.6 ± 10.5 %; $p < 0.05$), whereas the experimental group showed satisfactory results when compared to control. In conclusion, the technique for the production of recombinant pOSP was satisfactory and is effective in improving the expansion of the CCOs cells and that resulted in fewer ROS, allowing the pOSP to be considered a proteic antioxidant.

Keywords: *In vitro* maturation, recombinant protein, swine, reactive oxygen species.

1. INTRODUÇÃO

O oviduto é um órgão secretório que fornece ambiente adequado para maturação ovocitária, capacitação espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (HUNTER, 2003). Isso ocorre por meio de mudanças bioquímicas e fisiológicas devido a ação hormonal durante os diferentes períodos do ciclo estral. O oviduto de suínos expressa e libera, pelo menos 14 proteínas (BUHI et al., 1990) e apenas algumas foram identificadas e caracterizadas, como: glicoproteína específica do oviduto (BUHI et al., 1990; BUHI, 2002), inibidor tecidual de metaloproteínases (BUHI et al., 1997) e inibidor do ativador do plasminogênio (KOUBA et al., 2000). Expressão destas proteínas sugere interações fisiologicamente relevantes com gametas durante a fertilização e clivagem inicial embrionária.

Estudos identificaram a glicoproteína específica do oviduto em ratos (KAPUR e JOHNSON, 1985), hamster (LEVEILLE, 1987), coelhos (OLIPHANT e ROSS, 1982), ovinos (MURRAY, 1993) bovinos (BOICE, 1990), babuínos (FAZLEABAS e VERHAGE, 1986), humanos (BUHI, 1989) e suínos (BUHI et al., 1992), e esta é dependente das elevadas concentrações de estrógeno durante o estro ou períodos pré e pós-ovulatórios. A glicoproteína específica do oviduto, que possui peso molecular de 56,3 kDa, foi observada em forte associação com a zona pelúcida e espaço perivitelino do ovócito (BUHI et al., 1993). Essa associação, possivelmente, foi a causa da diminuição dos índices de polispermia *in vitro*, sem alterar os índices de penetração dos espermatozoides no ovócito e promoveu, conseqüentemente, a melhora no desenvolvimento embrionário (BUHI, 2002).

Os estudos sobre o complexo ambiente do lúmen do oviduto permite melhorar os conhecimentos sobre os eventos reprodutivos que ocorrem antes e após a fertilização o que pode levar a melhora dos meios para produção *in vitro* de embriões (PIV).

Em muitos estudos a glicoproteína específica do oviduto foi utilizada com a finalidade de diminuir os índices de polispermia propiciando aumento da eficiência da produção de blastocistos (KOUBA et al., 2000; MCCAULEY et al., 2003; COY et al., 2008). Nestes estudos ela foi obtida por meio da purificação do tecido do oviduto, porém obtendo-se baixas concentrações. Assim, a técnica de produção de proteína recombinante pode trazer benefícios tornando possível a produção de grandes quantidades de proteína de maneira rápida e eficiente. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo a transferência de DNA exógeno para células bacterianas para se

obter a proteína específica do oviduto recombinante (pOSP) e utilizá-la em meios de maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos suínos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de execução

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Granja de Melhoramento Genético de Suínos e no Laboratório de Biotecnologia, do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Viçosa.

Todos os procedimentos relativos a manipulação de animais e amostras biológicas foram realizados de acordo com as normas para Uso de Animais em Experimentação e aprovados pelo Comitê de Ética da UFV sob número 19/2014, no dia 25/03/2014.

2.2 Reagentes

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Quando não, estes foram citados.

2.3 Produção de proteína específica do oviduto recombinante

Para a produção da proteína específica do oviduto foi adquirido um plasmídeo, da empresa Gen Script®. A sequência foi recuperada a partir da base de dados de nucleotídeos e proteína do GenBank (U43490).

Este plasmídeo foi inserido em células *E. coli* competentes para, então se obter a proteína específica do oviduto.

A sequência gênica que codifica a pOSP foi clonada no plasmídeo pET21b Novagen®. O pET21b possui fusão C-terminal de uma cauda de hexahistidina, a fim de possibilitar a posterior purificação da proteína recombinante por meio de cromatografia de afinidade por metal. O plasmídeo recombinante foi purificado a partir das células Top10 (SAMBROOK et al., 1989) e células de *E. coli* C41 foram transformadas para a expressão da proteína. A transformação foi feita por choque térmico (30 seg. em gelo e posterior 1 min. em banho maria a 42 °C) e as células cresceram por 40 min. em meio Luria_Bertani (LB). O pré-inóculo foi cultivado *overnight* em 4 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina. A cultura foi transferida para 500 mL de meio LB (SAMBROOK et al., 1989) e as células cresceram

até atingir a DO_{600} de 0,4. Para a indução da expressão, 1mM de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) foi adicionado e a indução foi realizada por 4 horas, sob agitação de 200 rpm à temperatura ambiente. Ao final da indução os sedimentos foram armazenados à -80 °C até o uso.

2.4 Purificação da pOSP recombinante

As bactérias induzidas foram diluídas em tampão contendo 50 mM de Tris pH 8,0, 100 mM de NaCl e os inibidores de proteases aprotinina (1 μ g/mL), pepstatina (1 μ g/mL), leupeptina (1 μ g/mL) (tampão de equilíbrio) e lisadas por sonicação em 6 pulsos de 10 seg. intercalados com intervalos de 30 seg., e amplitude de 20 Hz. O sobrenadante obtido após a lise foi aplicado em resina de níquel (GE Healthcare) previamente equilibradas com tampão de equilíbrio. Em seguida as resinas foram lavadas com o tampão de lavagem de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem, a coluna foi submetida a aumento gradativo não contínuo da concentração de imidazol (0; 15; 30; 50; 80; 100; 150; 200; 250 e 400 mM), sendo as alíquotas recuperadas em volume de 2 mL e analisadas em SDS-PAGE 12 % corado por azul de Coomassie Brilliant Blue. As frações eluídas em coluna de níquel foram reunidas e dialisadas com solução salina tamponada com fosfato a 10 mM, pH 7,2 (PBS) contendo 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride).

2.5 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína utilizada para os demais ensaios foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) em microplaca, segundo instruções do fabricante (Biorad®). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Thermo Multiskan Go) com leitora de microplaca no comprimento de onda de 595 nm. Para a conversão de absorbância em concentração de proteína foi feita uma curva padrão com albumina sérica bovina (BSA; Sigma). A pOSP foi mantida em solução e estocada a -20 °C até o uso.

2.6 Análise eletroforética

As análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida 12 % (m/v) em condições dissociantes (SDS-PAGE), em sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). As amostras de pOSP foram ressuspensas em tampão de amostra [Tris-HCl a 0,5M, pH 6,5, contendo SDS a 2,5 % (m/v), 2-mercaptoetanol

a 2,5 % e glicerol a 10 % (v/v)], incubadas em banho maria a 100 °C, por três minutos e aplicadas no gel. As corridas eletroforéticas foram feitas em tampão contendo 24,8 mM de Tris, 192 mM de glicina e SDS a 0,1 % (m/v), e tiveram duração aproximada de 40 minutos (80-120 mA, 200 V). Marcadores protéicos de massa molecular (MM) conhecidas foram usados como padrão de migração. Os géis foram corados com azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Pierce Chemical Co., Rockford, EUA). Marcadores protéicos com MM conhecidas foram usados como padrão de migração (Bench Mark Protein).

2.7 Meios de cultivo

O meio de MIV utilizado foi o North Carolina State University 23 (NCSU 23) (PETTERS e WELLS, 1993) suplementado com 10 % de fluido folicular suíno, 10 mg/mL de EGF (Sigma cat nº E4127), 10 UI/mL de HCG (Vetecor 5000UI, part 003-11), 10 UI/mL de eCG (Sigma cat nº G4527) e 0,1 mg/mL de Cisteína, nas primeiras 22 horas. Nas 22 horas seguintes os ovócitos foram colocados em meio NCSU 23 sem suplementação hormonal.

O meio MIV foi coberto com óleo mineral e equilibrado em estufa à 39 °C com 5 % de CO₂, por pelo menos 12 h antes da utilização.

2.8 Obtenção, seleção e maturação dos ovócitos

Os ovários foram obtidos no frigorífico Saudali localizado no município de Ponte Nova – Minas Gerais (SIF 1629), latitude 20° 24' 57" S e longitude 42° 54' 32" W, distante 52 km do laboratório de biotecnologia, onde foram aspirados. Após a insensibilização e sangria dos animais destinados ao abate, os ovários foram colheitados e armazenados, para transporte, em garrafa térmica contendo solução salina 0,9 % autoclavada e 10 mg/mL de Gentamicina (GIBCO) mantidos a temperatura de 32 °C. No limite máximo de duas horas após o abate, no Laboratório, os ovários foram lavados com nova solução salina 0,9 % e mantidos em um becker o qual foi acondicionado em banho-maria a 32 °C. Com seringas de 10 mL e agulhas de 18 Gauge, os folículos de três a seis mm foram aspirados e o líquido resultante da aspiração foi colocado em tubos tipo Falcon® onde os ovócitos decantaram por aproximadamente cinco minutos.

Após a sedimentação, os ovócitos foram recuperados com pipeta sorológica de 10 mL e colocados em placas de petri (100 x 15 mm) junto com solução de PBS

adicionado de Fenol red (0,01 g/L) e PVA (0,01 %). Nessas placas, selecionou-se os ovócitos com citoplasma homogêneo e com o *cumulus ooforus* compacto (Grau I e Grau II) os quais foram lavados com a mesma solução e posteriormente foram colocados em criotubos de 2 mL com meio de maturação: North Carolina State University 23 (NCSU 23) (PETTERS e WELLS, 1993). Estes criotubos foram dispostos em uma das câmaras de uma transportadora de ovócitos (TOE 200 à 39 °C) e, então, encaminhados para o Laboratório de Reprodução Animal da Granja de Melhoramento Genético de Suínos da UFV, distante 2 km. Foram acondicionados 100 ovócitos por criotubo. Posteriormente, os ovócitos foram lavados três vezes em meio NCSU 23 novo e, em seguida, 30 ovócitos foram dispostos em gotas de maturação de 200 µL de meio NCSU 23.

2.9 Avaliação da Expansão das células do *cumulus ooforus*

A avaliação da expansão das células do *cumulus ooforus* (CCOs) foi realizada 44 horas após a MIV, conforme Gomez et al. (2012): zero = sem expansão das células do CCOs; 1 = mínimo de resposta observável; 2 = expansão das camadas mais externas do CCOs; 3 = expansão de todas as camadas, exceto a corona radiata e 4 = expansão de todas as camadas do CCOs. As células avaliadas como 3 e 4 foram consideradas como tendo a melhor expansão do CCOs. Estas foram fotografadas para posterior avaliação do grau de expansão. Foram realizadas 4 repetições, sendo observados aproximadamente 400 ovócitos, distribuídos nos dois grupos experimentais.

2.10 Dosagem de Espécies Reativas de Oxigênio

A concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos ovócitos foi examinada de acordo com o método de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) descrito por Hashimoto et al. (2000). Após a MIV, os ovócitos maturados foram transferidos para o meio de cultivo contendo 10 µM de DCFDA, e mantidos por 30 minutos em abrigo de luz a 37 °C. Em seguida, foram lavados em PBS com 0,1 % de PVA e colocados em gotas de 10µL para serem examinados sob microscópio confocal de fluorescência (Zeiss LSM 510 Meta). No equipamento foram utilizados lasers (íons argônio) com excitação de 480 nm e emissão de 510 nm. As imagens foram obtidas com objetiva de 10 x e cortes seriados de 1,9 µm para cada ovócito. A fluorescência foi mensurada por conversão do número de pixels para imagens em escala de cinza

para a análise usando o software Image J. A área utilizada para demarcação do ovócito foi de 0,81mm². Foram realizadas 4 repetições, sendo observados aproximadamente 80 ovócitos, distribuídos nos dois grupos experimentais.

2.11 Delineamento Experimental

A proteína específica do oviduto foi obtida por meio da transferência de DNA exógeno para *E. coli* competentes. Estas se desenvolveram, proliferaram e expressaram a proteína recombinante. Dessa maneira tornou-se possível a purificação da proteína e dosagem da mesma.

Durante a MIV, em meio NCSU 23 adicionou-se 10 µg/mL (KOUBA, et al., 2000) de pOSP nas 4 horas finais (DAY et al., 2000) (T1). Como controle foram utilizados ovócitos sem a adição desse coadjuvante. Foram realizadas as análises de expansão das células do CCOs e dosagem de ROS. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 7, 2 e osmolaridade de 273 a 280 mOsmol/L. Além disso, o cultivo foi realizado em atmosfera úmida com temperatura de 39 °C, 5 % de CO₂, 5 % de O₂ e 90 % de N₂ (Figura 1).

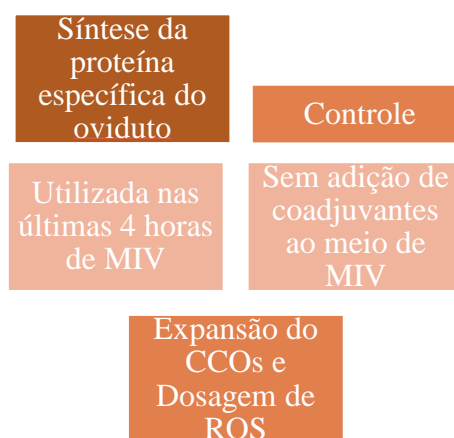


FIG.1: Esquema do delineamento experimental do presente experimento em que sintetizou-se e utilizou-se pOSP no processo de maturação *in vitro* de ovócitos de porcas.

2.12 Análise Estatística

A expansão das células do CCOs foram analisadas pelo qui-quadrado (χ^2) e a dosagem de ROS foi analisada pela ANOVA e teste de Duncan empregando o programa estatístico SAEG 9,1 (SAEG-UFV, 2007) com probabilidade de erro de 5%.

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação da produção de proteína recombinante

A avaliação da produção de proteína recombinante foi feita por meio de eletroforese (figura 2) em gel de poliacrilamida 12 % (m/v) em condições dissociantes (SDS-PAGE). Na primeira coluna encontram-se os marcadores protéicos com massa molecular conhecida. Na segunda coluna tem-se a faixa evidente da proteína recombinante, conhecida devido ao seu peso molecular (marcada em vermelho), porém esta amostra foi analisada antes de passar pelo processo de diálise. Na terceira coluna, tem-se a amostra após a diálise, restando apenas a proteína recombinante (marcada em preto).

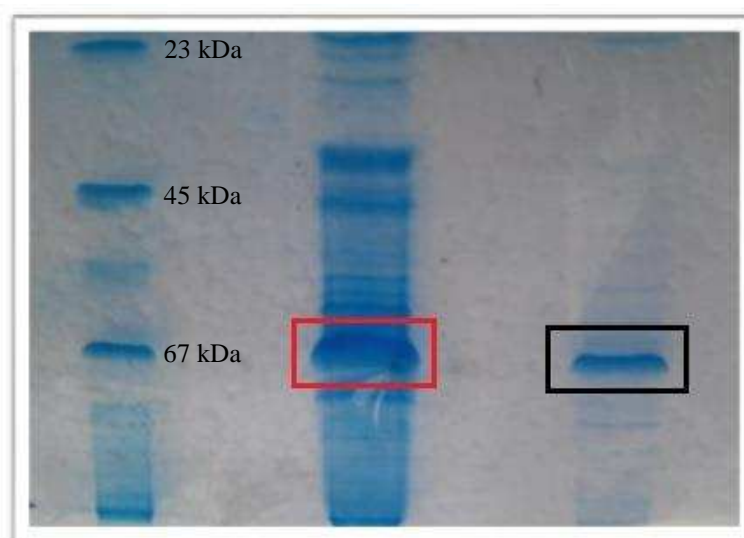


FIG. 2. Gel de poliacrilamida evidenciando na primeira coluna as bandas com pesos moleculares conhecidas; na segunda coluna, a produção de proteína recombinante de suíno (pOSP) demarcada de vermelho após purificação em HPLC e na terceira coluna a pOSP demarcada em preto, após da diálise.

Esta amostra dialisada seguiu para a determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford, em que a solução de Bradford foi adicionado as amostras com a proteína recombinante e as amostras padrão de BSA (figura 3). Na primeira coluna encontram-se as concentrações padrões de BSA, sendo comparadas, por meio da absorbância, com a única amostra da segunda coluna (amostra com proteína recombinante), obtendo-se dessa maneira o valor da absorbância da proteína recombinante da amostra.

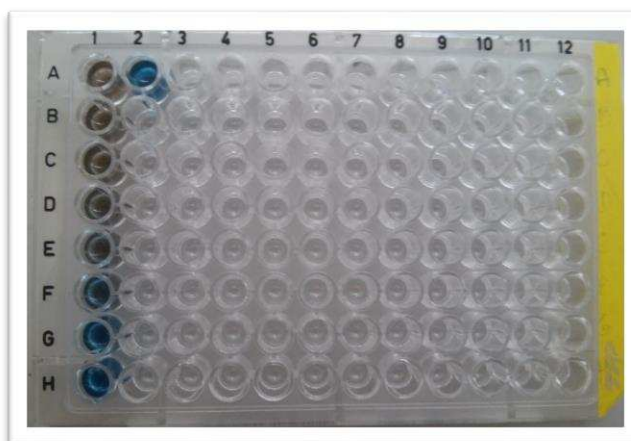


FIG. 3. Placa contendo amostras com concentração de proteína conhecida na primeira coluna (BSA) e na segunda coluna, a amostra com a pOSP. A placa seguiu para leitura em espectrofotômetro sendo obtido valores de absorvância referentes a cada poço.

De acordo com os valores de absorvância, construiu-se a equação da reta (figura 4) para dessa maneira obter-se a concentração da proteína recombinante, que no presente estudo foi de 610 $\mu\text{g/mL}$, para posterior utilização em meios de maturação de ovócitos *in vitro*.

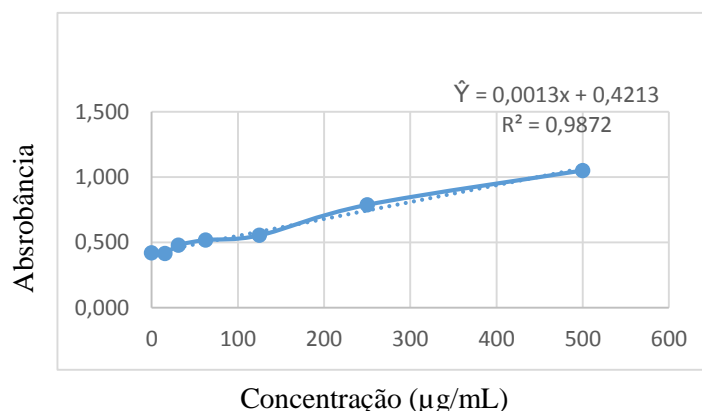


FIG. 4. Valores de absorvância utilizadas para elaboração da curva de calibração padrão da concentração de proteína (BSA) em $\mu\text{g/mL}$; absorvância medida à 595 nm.

3.2. Avaliação da maturação ovocitária

Na avaliação da maturação ovocitária houve diferença entre os valores obtidos no grupo controle em relação aos valores do grupo tratamento com a adição da proteína (Tabela 1), sendo que o grupo tratado apresentou melhor expansão do CCOs em relação ao controle.

Tab. 1. Adição da proteína recombinante de suíno (pOSP) durante as últimas quatro horas da maturação *in vitro* e seu efeito na expansão das células do *cumulus ooforus* de ovócitos suínos

Grupos	Nº de ovócitos	Grau de expansão do CCO n(%)					Total
		0	1	2	3	4	
Controle	192	0	0	77 (40)	72 (37,5)	43 (22,3)	192 ^a
pOSP	204	0	0	43 (21)	79 (38,7)	82 (40,1)	204 ^b

Zero = sem expansão das células do CCOs; 1 = mínimo de resposta observável; 2 = expansão das camadas mais externas do CCOs; 3 = expansão de todas as camadas, exceto a corona radiata e 4 = expansão de todas as camadas do CCOs. N(%) = número amostral e porcentagem.

3.3. Avaliação de espécies reativas de oxigênio produzidos pelos ovócitos

Na determinação da concentração de ROS houve diferença ($p < 0,05$) entre os valores obtidos entre os grupos controle ($26,4 \pm 10,9$) e do grupo tratado com a proteína recombinante ($16,6 \pm 10,5$), sendo que o grupo tratado apresentou menor quantidade de ROS em relação ao controle (tabela 2).

Tab. 2. Valores médios e desvios-padrão para a concentração de espécies reativas de oxigênio em ovócitos suínos maturados *in vitro* com ou sem adição de proteína específica do oviduto de suíno (pOSP)

Grupos	Nº de ovócitos	Concentração de ROS
Controle	35	$26,4 \pm 10,9^a$
pOSP	41	$16,6 \pm 10,5^b$

Na figura 5 ilustra-se a diferença da concentração de ROS, avaliado por meio da quantificação do número de pixels da imagem obtida dos ovócitos.

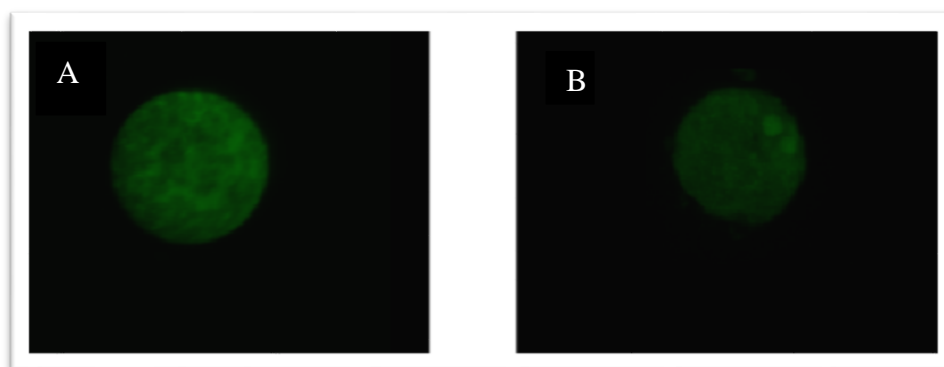


FIG. 5. Redução das espécies reativas de oxigênio (ROS) com o uso de pOSP durante a maturação *in vitro* de ovócitos de porcas (coloração por diacetato de diclorofluoresceína, após 44 horas de maturação). A: Controle e B: grupo com pOSP.

4. DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi a produção de proteína recombinante por meio de plasmídeo que continha a sequência codificadora da proteína. Isso fez-se necessário uma vez que existe a necessidade de sintetizar a proteína por não ser comercializada e por que a sua obtenção diretamente do oviduto torna-se demorada e pouco eficiente em relação a quantidade de proteína purificada. Buhi e Alvarez (2003) identificaram, caracterizaram e localizaram três proteínas do oviduto, dentre elas a pOSP. Neste trabalho, eles obtiveram a pOSP por meio do tecido do oviduto, porém existe a necessidade da manutenção e abate de animais. Além disso, tais pesquisas incluíram a clonagem molecular após extração e purificação da proteína do oviduto, provavelmente, para obterem maiores quantidades desta para a realização da pesquisa (BUHI et al., 1996; JANJANAM et al., 2012). No entanto, quando a proteína é obtida a partir do tecido, existe o risco de contaminação da amostra com outras proteínas e por isso análises com Imunoglobulina G anti pOSP foram feitas para melhorar a eficiência da purificação (KOUBA et al., 2000; McCAULEY et al., 2003). Portanto, trabalhar diretamente com o vetor de expressão torna-se vantajoso, pois não há necessidade em se manter animais para a extração do tecido, além de ser uma técnica de execução mais rápida e mais eficiente por utilizar gene específico desenhado incluso em vetor e por meio deste, obter-se grandes quantidades da proteína recombinante.

Estudos que utilizaram o fluido de oviduto bovino demonstraram que a co-incubação de ovócitos suínos por um curto período de 30 minutos, após a MIV, mas antes da FIV, produz efeitos benéficos sobre a fertilização (COY et al., 2008). Isso mostra a importância do fluido do oviduto sobre os ovócitos e como seria benéfico para a produção *in vitro* conseguir mimetizar essas condições.

A concentração de pOSP no presente estudo levou a melhor expansão das células do CCOs dos ovócitos tratados quando comparado ao controle. Essa melhora se pode ser devido a maior produção de ácido hialurônico que propicia melhora na maturação do ovócito, apresentando menores taxas de embriões degenerados quando

comparados aos embriões cultivados na ausência de ácido hialurônico. (MIYANO et al., 1994; YOKOO, 2008).

Além de melhorar a expansão do CCOs, a pOSP também melhorou a qualidade do ovócito por diminuir as concentrações de ROS. Isso revelou que a pOSP pode agir como um antioxidante proteico propiciando melhor ambiente para o desenvolvimento final dos ovócitos.

A pOSP poderia atuar então, como um antioxidante proteico promovendo a neutralização de ROS ou, então, poderia agir por meio do aumento da expressão de enzimas antioxidantes benéficas para o desenvolvimento do ovócito.

5. CONCLUSÃO

A técnica para a produção de proteína específica do oviduto (pOSP) recombinante empregada no presente estudo é eficiente e a adição de pOSP em meios de maturação *in vitro* melhora a expansão das células do *cumulus ooforus* de suínos. A adição de pOSP em meios de maturação reduz a quantidade de ROS, podendo ser considerada um antioxidante proteico para suínos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOICE, M. L.; GEISERT, R. D.; BLAIR, R. M.; VERHAGE, H. G. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. **Biology of Reproduction**, v.43, p.457-465, 1990.
2. BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; PICKARD, A. R.; MCINTUSH, E. W.; KOUBA, A. J.; ASHWORTH, C. J.; SMITH, M.F. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and messenger ribonucleic acid by the oviduct of cyclic, early pregnant and ovariectomized steroid treated gilts. **Biology of Reproduction**, v.57 p.7-15, 1997.
3. BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; SUDHIPONG, V.; DONNES-SMITH, M. M. Identification of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. **Biology of Reproduction**, v.43, p.929-38, 1990
4. BUHI, W. C.; ASHWORTH, C. J.; BAZER, F. W.; ALVAREZ, I. M. *In vitro* synthesis of oviductal secretory proteins by estrogen-treated ovariectomized gilts. **Journal of Experimental Zoology**, v.262, p.426-435, 1992.
5. BUHI, W. C.; O'BRIEN, B.; ALVAREZ, I. M.; ERDOS, G.; DUBOIS, D. Immunogold localization of porcine oviductal secretory glycoproteins within the zona pellucida,

- perivitelline space and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1274–83, 1993.
6. BUHI, W. C.; VAN WERT, J. W.; ALVAREZ, I. M.; DONES-SMITH, M. M.; BERNHEISEL, M. A. Synthesis and secretion of proteins by postpartum human oviductal tissue in culture. **Fertility and Sterility**, v.51, p.75-80, 1989.
 7. BUHI, W. C. Characterization and biological roles of oviduct-specific estrogen-dependent glycoprotein. **Reproduction**, v.123, p.355–62, 2002.
 8. BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M. Identification, characterization and localization of three proteins expressed by the porcine oviduct. **Theriogenology**, v.60, p.225-238, 2003.
 9. BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; CHOI, I.; CLEAVER, B. D.; SIMMEN, F. A. Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. **Biology of reproduction**, v.55, p.1305-1314, 1996.
 10. COY, P.; CANOVAS, S.; MONDEJAR, I.; ROMAR, R.; SAAVEDRA, M. D.; GRULLON, L.; MATAS, C.; AVILES, M. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and regulate polyspermy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, p.15809–15814, 2008.
 11. DAY B. N.; ABEYDEERA L. R.; CANTLEY T. C.; RIEKE A.; MURPHY C. N. Exposure of pig oocytes to estrus oviduct can influence the morphological, physical and *in vitro* fertilization parameters. **Theriogenology**, v.53, p.418, 2000.
 12. FAZLEABAS, A. T.; VERHAGE, H. G. The detection of oviduct-specific proteins in the baboon (*Papio anubis*). **Biology of Reproduction**, v.35, p.455-462, 1986
 13. GOMEZ, M. N.; KANG, J. T.; KOO, O. J.; KIM, S. J.; KWON, D. K.; PARK, S. J.; ATIKUZZAMAN, M.; HONG, S. G.; JANG, G.; LEE, B.C. Effect of oocyte-secreted factors on porcine *in vitro* maturation, cumulus expansion and developmental competence of parthenotes. **Zygote**, v.20, p.135–45, 2012.
 14. HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; IMAI, H. Excessive concentration of glucose during *in vitro* maturation impairs the developmental competence of bovine oocyte after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.520–526, 2000.
 15. HUNTER, R. H. Reflections upon sperm-endosalpingeal and sperm-zona pellucid interactions *in vivo* and *in vitro*. **Reproduction In Domestic Animals**, v.38, p.147–154, 2003.
 16. JANJANAM, J.; SINGH, S.; CHOUDHARY, S.; PRADEEP, M. A.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A.; MOHANTY, A. K. Molecular cloning, sequence characterization

- and heterologous expression of buffalo (*Bubalus bubalis*) oviduct-specific glycoprotein in *E. coli*. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.10031-10043, 2012.
17. KAPUR, R. P.; JOHNSON, L. V. An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. **Developmental Biology**, v.112, p.89-93, 1985.
 18. KOUBA, A. J.; BURKHARDT, B. R.; ALVAREZ, I. M.; GOODENOW, M. M.; BUHI, W. C. Oviductal plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): mRNA, protein, and hormonal regulation during the estrus cycle and early pregnancy in the pig. **Molecular Reproduction and Development**, v.56, p.378–86, 2000.
 19. KOUBA, A. J.; ABEYDEERA, L. R.; ALVAREZ, I. M.; DAY, B. N.; BUHI, W. C. Effects of the Porcine Oviduct-Specific Glycoprotein on Fertilization, Polyspermy, and Embryonic Development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 242–250, 2000.
 20. LEVEILLE, M. C.; ROBERTS, K. D.; CHEVALIER, S.; CHAPDELAIN, A.; BLEAU, G. Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v.36, p.227-238, 1987.
 21. MCCAULEY, T. C.; BUHI, W. C.; WU, G. M.; MAO, J.; CAAMANO, J. N.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Oviduct-Specific Glycoprotein Modulates Sperm-Zona Binding and Improves Efficiency of Porcine Fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.69, p. 828–834, 2003.
 22. MIYANO, T.; HIROOKA, E. R.; KANO, K.; MIYAKE, M.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Effects of hyaluronic acid on development of 1- and 2-cell porcine embryos to the blastocyst stage *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, p.1299-1305, 1994.
 23. MURRAY, M. K. An estrogen-dependent glycoprotein is synthesized and released from the oviduct in a temporal- and region-specific manner during early pregnancy in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.48, p.446-453, 1993.
 24. OLIPHANT, G.; ROSS, P. R. Demonstration of production and isolation of three sulfated glycoproteins from the rabbit oviduct. **Biology of Reproduction**, v.26, p.537-544, 1982.
 25. PETTERS, R. M.; WELLS, K. D. Culture of pig embryos. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.48, p.61-73, 1993.
 26. SAEG. SAEG: sistema para análises estatísticas, versão 9.1. Viçosa: UFV, 2007
 27. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 28. TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, p.1-9, 2012.
 29. YOKOO, M.; KIMURA, N.; ABE, H.; SATO, E. Influence of hyaluronan accumulation during cumulus expansion on *in vitro* porcine oocyte maturation. **Zygote**, v.4, p.309-314, 2008.

CAPÍTULO 2 - Adição da proteína específica do oviduto de porcas (pOSP) e da melatonina em meios de maturação e o efeito na produção *in vitro* de embriões suínos

RESUMO

No presente estudo teve-se como objetivo avaliação do aumento da eficiência dos meios de maturação *in vitro* (MIV), para ovócitos de suíno, quando adicionados a melatonina ao meio, durante todo o processo de MIV, e a proteína específica do oviduto recombinante (pOSP), nas últimas quatro horas de maturação. Foram avaliadas a expansão do *cumulus ooforus* (CCOs), as concentrações intracelulares de ROS e desenvolvimento embrionário nos diferentes grupos experimentais (C = controle; T1 = somente com melatonina; T2 = com melatonina e pOSP e T3 somente com pOSP). As taxas de expansão de CCOs e de desenvolvimento embrionário foram analisadas pelo qui-quadrado (χ^2) e a dosagem de espécies reativas foi analisada pela ANOVA e teste de Duncan com probabilidade de erro de 5 %. Em relação a expansão do CCOs, houve diferença ($p < 0,05$) do valores obtidos no grupo controle em relação aos valores médios dos grupos de tratamentos 1, 2 e 3, porém não houve diferença entre os valores obtidos nos tratamentos ($p > 0,05$). Na dosagem de ROS não houve diferença entre os valores médios obtidos no grupo controle ($26,4 \pm 10,9$) e o valor médio verificado no grupo do tratamento 1 ($23,4 \pm 7,8$), porém no grupo do tratamento 2 ($21,3 \pm 9,7$) o valor médio mostrou-se satisfatório em relação ao valor médio do grupo controle. No entanto, o valor médio do tratamento 3 ($16,6 \pm 10,5$) foi o que demonstrou resultado mais satisfatório quando comparado aos demais tratamentos ($p < 0,05$). A produção de embriões foi avaliada por meio da taxa de clivagem, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores obtidos no grupo controle (48,9 %) e os valores verificados nos grupos de tratamento 1 (51,5 %), tratamento 2 (50 %), tratamento 3 (57,7 %), e nem destes entre si. Este estudo permitiu concluir que a proteína específica do oviduto recombinante e a melatonina foram eficientes em melhorar a expansão das células do CCOs. Além disso, as células tratadas com pOSP mostraram-se com menor quantidade de ROS, podendo a pOSP ser considerada um antioxidante proteico.

Palavras chave: Produção *in vitro* de embriões, proteína específica do oviduto, oviduto, melatonina, antioxidante, suíno.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the efficiency of *in vitro* maturation medium (IVM) for porcine oocytes, when melatonin is added to the medium, during the entire IVM process, and when the pOSP is added in the last four hours of maturation. The expansion of the *cumulus oophorus* (CCOs) cells, the intracellular concentrations of reactive oxygen species (ROS) and embryo development of the different experimental groups were evaluated (C = control; T1 = melatonin only; T2 = melatonin and pOSP and T3 = pOSP only). The CCOs expansion rates and embryonic development were analyzed by chi-squared test (χ^2) and the dosage of ROS was analyzed by ANOVA and by the Duncan Test with a 5 % probability of error. Regarding the CCOs expansion, there was a difference ($p < 0.05$) in the values obtained in the control group in relation to the average values of the treatment groups 1, 2 and 3, with the experimental groups showing satisfactory results compared with the control, but there was no difference between treatments ($p > 0.05$). In the ROS dosage, there was no difference between the mean values obtained in the control group (26.4 ± 10.9) and the average value observed in the treatment group 1 (23.4 ± 7.8). However, in the treatment group 2 (21.3 ± 9.7), the average value was found to be satisfactory in relation to the average of the control group. Despite that, the average value of treatment 3 (16.6 ± 10.5) was found to be the most satisfactory result compared to the other treatments ($p < 0.05$). The production of embryos was evaluated by cleavage rate. There was no difference ($p > 0.05$) between the values obtained in the control group (48.9 %) and the values recorded in the treatment groups 1 (51.5 %), 2 (50 %), 3 (57.7 %), and neither of these with each other. This study showed that the pOSP and the melatonin were effective in the improvement of the expansion of CCOs cells. In addition, the cells that were treated with pOSP presented less amount of ROS, allowing the pOSP to be considered a proteic antioxidant.

Keywords: *In vitro* production of embryos, oviduct specific glycoprotein, oviduct, melatonin, antioxidant, porcine.

1. INTRODUÇÃO

No intuito de aumentar a produção *in vitro* de embriões (PIV) várias substâncias tem sido utilizadas ao longo de vários anos. Dentre essas encontram-se os antioxidantes, utilizados para neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Dentre os enzimáticos têm-se o superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutatona peroxidase e entre os não enzimáticos encontram-se os antioxidantes proteicos como a melatonina, além das vitaminas, flavonoides, a glutatona e quelantes de metais (Cu^{+2} e $\text{Fe}^{+2/+3}$) (TAKAHASHI, 2012). A melatonina, em contraste com outros antioxidantes que são, lipófilicos ou hidrófilicos, é anfifílica e, por isso, atravessa facilmente as barreiras morfofisiológicas (REITER et al., 2013) Em búfalas, a suplementação da melatonina nos meios de maturação melhorou a taxa de maturação nuclear de ovócitos, reduzindo o estresse oxidativo, a peroxidação de lipídeos e danos ao DNA (MANJUNATHA et al., 2009).

No estudo de Shi et al. (2009) os autores verificaram que a melatonina no fluido folicular de suínos apresentava concentração de 10^{-11} M, sugerindo que a melatonina tem importante papel na maturação *in vivo*. Neste mesmo trabalho, Shi et al. (2009) adicionaram melatonina no meio de maturação *in vitro* e observaram que a melhor concentração, que poderia aumentar o número de ovócitos maturados e melhorar o desenvolvimento de embriões *in vitro*, seria de 10^{-9} M. Já em outro experimento, suplementações superiores de 4×10^{-8} M de melatonina durante a maturação *in vitro* de ovócitos resultou em maior percentual de ovócitos com extrusão do corpúsculo polar e uma porcentagem maior de ovócitos ativados partenogeneticamente desenvolvidos para blastocistos (KANG et al., 2009).

Durante o cultivo *in vitro* (CIV), os embriões são expostos a condições de estresse oxidativo relativamente altos em comparação com o ambiente *in vivo*, em que a produção de ROS em embriões é muito menor (CHOI et al., 2008). A produção de ROS nas condições de cultivo é deletério para o embrião, porque a geração de excedentes de ROS interagem com lipídios, causando danos as moléculas. Isto resulta em uma perda de integridade da membrana, alterações estruturais ou funcionais de proteínas, danos em ácidos nucleicos (TAMURA et al., 2012).

Alguns estudos utilizaram a glicoproteína específica do oviduto *in vitro* para mimetizar as condições *in vivo* que ocorrem no lúmen do oviduto. O oviduto é um

órgão secretório que fornece ambiente adequado para maturação ovocitária, capacitação espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (HUNTER, 2003). Isso ocorre devido a mudanças bioquímicas e fisiológicas devido a ação hormonal durante os diferentes períodos do ciclo estral.

Nos estudos de Kouba (2000), as concentrações de pOSP 10-100 µg/mL diminuiu a polispermia quando comparado com o controle (24-29 versus 61 %). Com isso, a concentração de 10 µg/mL pOSP foi selecionado para a maioria dos experimentos subsequentes, pois esta concentração diminuiu a polispermia, enquanto as taxas de penetração foram semelhantes aos do controle.

Corroborando aos estudos anteriores, McCauley et al. (2003) verificaram que ovócitos pré-incubados com a glicoproteína específica do oviduto por três horas, nas concentrações de 10 e 20 µg/mL, diminuiram a incidência de polispermia e o número de espermatozoides ligados por ovócito, sem alterar a taxa de penetração. Uma explicação para a redução da polispermia observada por esses autores foi que a pOSP se ligaria a zona pelúcida e formaria uma barreira física para ligação de espermatozoides ou ocuparia/modificaria os sítios de ligação de espermatozoides já que o número de espermatozoides ligados a zona pelúcida foi reduzido por exposição dos ovócitos a pOSP.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi mimetizar as condições *in vivo* que não existem *in vitro*, como a adição de melatonina durante todo o período da maturação, já que esta existe fisiologicamente no fluido folicular, e a adição de pOSP nas últimas quatro horas de maturação o que promoveria a possível maturação final do ovócito. Essa está relacionada ao momento que o ovócito está presente no oviduto anteriormente a fertilização

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de execução.

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Granja de Melhoramento Genético de Suínos e no Laboratório de Biotecnologia, do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Viçosa.

Todos os procedimentos relativos a manipulação de animais e amostras biológicas foram realizados de acordo com as normas para Uso de Animais em Experimentação e aprovados pelo Comitê de Ética da UFV sob número 19/2014, no dia 25/03/2014.

2.2. Reagentes.

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA), quando não, estes foram citados.

2.3. Proteína específica do oviduto de porcas

A Proteína recombinante utilizada neste estudo foi obtida anteriormente no capítulo 1.

2.4 Meios de cultivo

O meio de MIV utilizado foi o North Carolina State University 23 (NCSU 23) (PETTERS e WELLS, 1993 suplementado com 10 % de fluido folicular suíno, 10 mg/mL de EGF (Sigma cat n° E4127), 10 UI/mL de HCG (Vetecor 5000UI, part 003-11), 10 UI/mL de eCG (Sigma cat n° G4527) e 0,1 mg/mL de Cisteína, nas primeiras 22 horas. Nas 22 horas seguintes os ovócitos foram colocados em meio NCSU 23 sem suplementação hormonal. O meio de FIV utilizado foi Tris Buffered Medium modificado -TBMm (ABEYDEERA e DAY, 1997). Os embriões foram cultivados em North Carolina State University (NCSU 23), que foi designado como meio de CIV suplementado com 4 mg/mL de BSA (albumina sérica bovina), 0,17 mM de piruvato de sódio, 2,73 mM de lactato de sódio e 50 µg/mL de gentamicina. Às 72 horas após a fertilização, todos os embriões clivados foram transferidos para novo meio de cultivo NCSU 23 suplementado com 4 mg/mL BSA, 50 µg/mL de gentamicina e 5,5 mM de glicose (WONGSRIKEAO et al., 2006).

Os meios (MIV, FIV, e CIV) foram cobertos com óleo mineral e equilibrados em estufa à 39 °C com 5 % de CO₂, por pelo menos 12 h antes da utilização.

2.5. Obtenção, seleção e maturação dos ovócitos

Os ovários foram obtidos no frigorífico Saudali localizado no município de Ponte Nova – Minas Gerais (SIF 1629), latitude 20° 24' 57" S e longitude 42° 54' 32"

W, distante 52 km do laboratório de biotecnologia, onde foram aspirados. Após a insensibilização e sangria dos animais destinados ao abate, os ovários foram colheitados e armazenados, para transporte, em garrafa térmica contendo solução salina 0,9 % autoclavada e 10 mg/mL de Gentamicina (GIBCO) mantidos a temperatura de 32 °C. No limite máximo de duas horas após o abate, no Laboratório, os ovários foram lavados com nova solução salina 0,9 % e mantidos em um becker o qual foi acondicionado em banho-maria a 32 °C. Com seringas de 10 mL e agulhas de 18 Gauge, os folículos de três a seis mm foram aspirados e o líquido resultante da aspiração foi colocado em tubos tipo Falcon® onde os ovócitos decantaram por aproximadamente cinco minutos.

Após a sedimentação, os ovócitos foram recuperados com pipeta sorológica de 10 mL e colocados em placas de petri (100 x 15 mm) junto com solução de PBS adicionado de Fenol red (0,01 g/L) e PVA (0,01 %). Nessas placas selecionou-se os ovócitos com citoplasma homogêneo e com o *cumulus ooforus* compacto (CCOs) (Grau I e Grau II) os quais foram lavados com a mesma solução e posteriormente foram colocados em criotubos de 2 mL com meio NCSU 23. Estes criotubos foram dispostos em uma das câmaras de uma transportadora de ovócitos (TOE 200 à 39°C) e, então, encaminhados para o Laboratório de Reprodução Animal da Granja de Melhoramento Genético de Suínos da UFV, distante 2 km. Foram acondicionados 100 ovócitos por criotubo. Posteriormente, os ovócitos foram lavados três vezes em meio NCSU 23 novo e, em seguida, 30 ovócitos foram dispostos em gotas de maturação de 200 µL de meio de MIV.

2.6. Colheita de sêmen

O sêmen foi obtido de um único macho, durante todo o experimento, pela técnica de mão enluvada e colhida somente a fração rica, sendo posteriormente diluído em BTS (Beltsville Thawing Solution) 1:1 e resfriado a 15 °C.

2.7. Fertilização *in vitro*

Após 44 horas de maturação os ovócitos tiveram as células do CCOs removidas com adição de 0,1 % de hialuronidase no meio de maturação e, posteriormente, lavados três vezes em meio TBMm e depois transferidos para o mesmo.

No dia da FIV, 10 mL de sêmen resfriado é aquecido a 37 °C por cinco minutos. Em seguida, 100 µL do sêmen foi colocado delicadamente em PBS contendo 1mg/mL de BSA, 75µg/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina (pH 7.2) e centrifugado três vezes por seis minutos, a 1000 G. Após a centrifugação, ressuspendeu-se o pelete em 1000 µL de TBMm. Utilizou-se a concentração de 300.000 espermatozoides/mL (McCAULEY, 2003) para fertilizar as gotas com no máximo 30 ovócitos/gota.

2.8. Cultivo *in vitro*

Transcorridas às seis horas de fertilização, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para o meio NCSU 23.

2.9. Avaliação da Expansão das células do *cumulus ooforus*

A avaliação da expansão das células do CCOs foi realizada 44 horas após a MIV, conforme Gomez et al. (2012): zero = sem expansão das células do CCOs; 1 = mínimo de resposta observável; 2 = expansão das camadas mais externas do CCOs; 3 = expansão de todas as camadas, exceto a corona radiata e 4 = expansão de todas as camadas do CCOs. As células avaliadas como 3 e 4 foram considerados como tendo a melhor expansão do CCOs. Estas foram fotografadas para posterior avaliação do grau de expansão.

Foram realizadas 4 repetições, sendo observados aproximadamente 830 ovócitos, distribuídos nos quatro grupos experimentais.

2.10. Avaliação da taxa de clivagem

O efeito da pOSP e da melatonina na taxa de clivagem foi avaliada 72 horas da fertilização, realizou-se a taxa de clivagem e foram retirados aqueles ovócitos que não fertilizaram e embriões em estágio de desenvolvimento não compatível com a data da fertilização e/ ou degenerados.

Foram realizadas três repetições, sendo observados aproximadamente 520 ovócitos, distribuídos nos quatro grupos experimentais.

2.11. Dosagem de espécies reativas de oxigênio

A concentração de ROS nos ovócitos foi examinado de acordo com o método de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) descrito por Hashimoto et al. (2000).

Após a MIV, os ovócitos maturados foram transferidos para o meio de cultura contendo 10 μM de DCFDA, e mantidos por 30 minutos em abrigo de luz a 37 °C. Em seguida, foram lavados em PBS com 0,1 % de PVA e colocados em gotas de 10 μL para serem examinados sob microscópio confocal de fluorescência (Zeiss LSM 510 Meta). No equipamento foram utilizados lasers (íons argônio) com excitação de 480 nm e emissão de 510 nm. As imagens foram obtidas com objetiva de 10 x e cortes seriados de 1,9 μm para cada ovócito. A fluorescência foi mensurada por conversão do número de pixels para imagens em escala de cinza para a análise usando o software Image J. A área utilizada para demarcação do ovócito foi de 0,81mm².

Foram realizadas 4 repetições, sendo observados aproximadamente 140 ovócitos, distribuídos nos quatro grupos experimentais.

2.12. Delineamento Experimental

Durante a MIV em meio NCSU 23 adicionou-se 10⁻⁹ M de melatonina (SHI, et al., 2009) em um grupo durante as 44 horas de maturação (T1), outro tratado com a melatonina durante as 44 horas de maturação e a pOSP durante as 4 horas finais da maturação (T2) e o último tratado com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (KOUBA et al., 2000) de pOSP nas 4 horas finais (DAY et al., 2000) (T3). Como controle foram utilizados ovócitos sem a adição desses coadjuvantes. Foram realizadas as análises de expansão das células do CCOs, dosagem de ROS e taxa de clivagem. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 7, 2 e osmolaridade de 273 a 280 mOsmol/L. Além disso, o cultivo foi realizado em atmosfera úmida com temperatura de 39 °C, 5 % de CO₂, 5 % de O₂ e 90 % de N₂ (Figura 1).

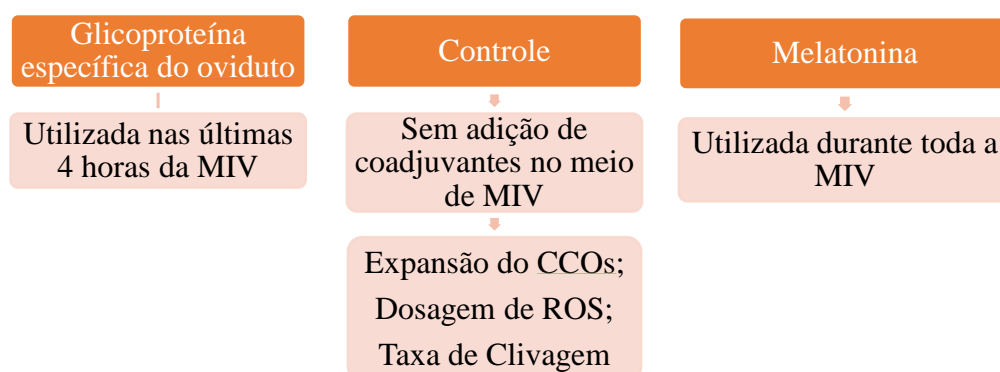


FIG. 1: Esquema do delineamento experimental do presente experimento em que utilizou-se pOSP e melatonina no processo de maturação *in vitro* de ovócitos de porcas.

2.13. Análise Estatística

As taxas de expansão de células do CCOs e de desenvolvimento embrionário foram analisadas pelo qui-quadrado (χ^2) e a dosagem de ROS foi analisada pela ANOVA e teste de Duncan empregando o programa estatístico SAEG 9,1 (SAEG-UFV, 2007) com probabilidade de erro de 5%.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da maturação ovocitária

A avaliação da maturação ovocitária foi realizada pela análise do grau de expansão das células do CCOs. Houve diferença entre os valores do grupo controle em relação aos valores dos grupos tratados 1, 2 e 3, porém não houve diferença entre os grupos tratados (Tabela 1).

Tab. 1. Adição da melatonina e proteína pOSP durante a maturação *in vitro* e seus efeitos na expansão das células do *cumulus ooforus* de ovócitos de porcas

Grupos	Nº de ovócitos	Grau de expansão do CCO n(%)					Total
		0	1	2	3	4	
Controle	192	0	0	77 (40,0)	72 (37,5)	43 (22,5)	192 ^a
Melatonina	215	0	0	48 (22,3)	83 (38,6)	84 (39,0)	215 ^b
Melatonina + pOSP	222	0	0	31 (13,9)	88 (39,6)	105 (47,3)	222 ^b
pOSP	204	0	0	43 (21,0)	79 (38,7)	82(40,1)	204 ^b

Zero = sem expansão das células do CCOs; 1 = mínimo de resposta observável; 2 = expansão das camadas mais externas do CCOs; 3 = expansão de todas as camadas, exceto a corona radiata e 4 = expansão de todas as camadas do CCOs. N(%) número amostral e porcentagem. χ^2 gl=1=3,84 (grau de expansão 2 vs 3+4).

3.2. Avaliação de Espécies reativas de oxigênio produzidos pelos ovócitos

A tabela 2 mostra que não houve diferença entre os valores de pixels obtidos nos grupos controle e tratamento 1 ($p>0,05$), porém, diferiu do valor obtido no grupo de tratamento 2, sendo este último melhor do que o controle ($p<0,05$). No entanto, os

valores médios do grupo de tratamento 3 foi o que teve o melhor resultado quando comparado aos outros tratamentos ($p < 0,05$).

Tab. 2. Valores médios e desvios-padrão para a concentração de espécies reativas de oxigênio em ovócitos de porcas maturados *in vitro* com adição de melatonina e proteína específica do oviduto (pOSP) nos meios

Grupos	Nº de ovócitos	Dosagem de ROS
Controle	35	26,4±10,9 ^a
Melatonina	34	23,4±7,8 ^{ab}
Melatonina + pOSP	33	21,3±9,7 ^b
pOSP	41	16,6±10,5 ^c

A figura 2 ilustra a diferença da concentração de ROS avaliado pela intensidade de fluorescência.

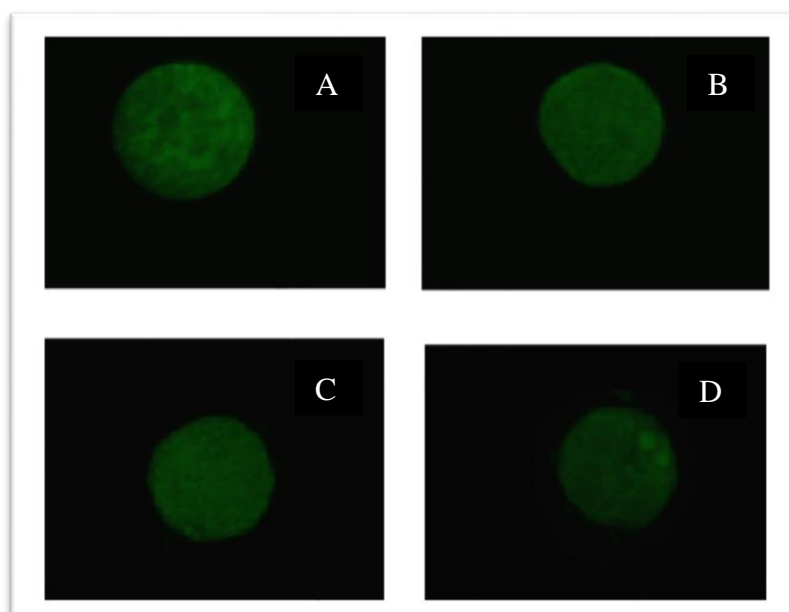


FIG. 2. Redução das Espécies reativas de oxigênio (ROS) com o uso de melatonina e pOSP durante a maturação de ovócitos de porcas *in vitro* (coloração por diacetato de diclorofluoresceína, após 44 horas de maturação). A: Controle; B: grupo com melatonina; C: grupo com melatonina associada a pOSP e D: grupo com pOSP.

3.3. Avaliação da produção de embriões

A produção de embriões foi avaliada por meio da taxa de clivagem. Não houve diferença entre os valores médios obtidos no grupo Controle (48,9 %) e o grupos de tratamentos 1 (51,5 %), 2 (50 %) e 3 (57,7 %), e nem destes entre si ($p>0,05$; tabela 3).

Tab. 3. Adição da melatonina e proteína específica do oviduto (pOSP) durante a maturação *in vitro* e seus efeitos na taxa de clivagem de embriões de porcas

Grupos	Nº de ovócitos	Taxa de clivagem (%)
Controle	137	48,9
Melatonina	128	51,5
Melatonina + pOSP	130	50,0
pOSP	123	57,7

4. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a melatonina *in vitro* utilizada na concentração de 10^{-9} M melhorou a expansão das células do CCOs. Diversos estudos demonstraram os efeitos benéficos da melatonina em gametas e embriões de mamíferos (NAKANO et al., 2011; KANG et al., 2008; SALEHI et al., 2013). No cultivo de ovócitos bovinos, a suplementação de melatonina em concentrações de 10 ou 50 ng/mL durante a maturação *in vitro* promoveu elevada taxa de maturação nuclear, aumento na taxa de ovócitos com mitocôndrias dispersas no citoplasma e melhora na expansão das células do CCOs (EL-RAEY et al., 2011). Nos estudos de Rodriguez-Osorio et al. (2007) observaram a melhora na maturação nuclear e citoplasmática do ovócitos de suíno quando a melatonina foi adicionada, já nos estudos de Abecia et al. (2002) observaram que a melatonina ocasionou a melhora no desenvolvimento embrionário *in vitro* em ovinos.

A melhora na expansão do CCOs se deve a maior produção de ácido hialurônico que propicia melhora na maturação do ovócito, apresentando menores taxas de embriões degenerados quando comparados aos embriões cultivados na ausência de ácido hialurônico (MIYANO et al., 1994; YOKOO et al., 2008). Além disso, a melatonina desempenha papel na regulação da maturação do ovócito. Um

esteróide progesterona, 17α , 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona foi identificado como hormônio de indução de maturação (MIH) (SEN et al., 2002), o qual é regulado pela melatonina que acelera a formação de MPF (fator promotor da maturação) e promove a quebra da vesícula germinativa de ovócitos de carpas (CHATTORAJ et al., 2005). Além disso, a outra forma de promoção da síntese de MPF regulada pela melatonina é pelo aumento dos receptores de hormônio folículo-estimulante. Os receptores da melatonina foram identificados, também, em células da granulosa, o que sugere outra possibilidade de que a melatonina pode ter participação na maturação do ovócito (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). Esta atividade de indução de maturação do ovócito foi observada em diversas espécies como bovinos, suínos, bubalinos e ovinos (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007; MANJUNATHA et al., 2009; CASÃO et al., 2010; EL-RAEY et al., 2011).

Entretanto, nos estudos de Nakano et al. (2012) observaram que a adição de melatonina nos meios de maturação de ovócitos de suíno por 40 h não aumentou as taxas de maturação do ovócito (53-60 *versus* 65 e 69 %) ou o potencial de ovócitos para desenvolver em blastocistos após ativação partenogenética em comparação com o controle. Isso pode ser devido ao meio de maturação e ou a tensão de oxigênio que foi empregado o trabalho.

No caso da pOSP, esta também melhorou a expansão das células do CCOs provavelmente por auxiliar na maturação final ovocitária que ocorreria no oviduto (MCCAULEY et al., 2003; BUHI e ALVAREZ 2003; JANJANAM et al., 2012). No entanto, a associação da melatonina com a pOSP não apresentou efeito sinérgico.

Durante a produção *in vitro* de embriões, as espécies reativas de oxigênio são produzidas e podem causar danos oxidativos graves, resultando em menor taxa de formação de blastocistos. A melatonina e seus metabólitos são antioxidantes eficazes, que neutralizam ROS e regulam várias enzimas antioxidantes (TAN et al., 2007). A suplementação com melatonina nos meios de maturação diminuiu o ROS (NAKANO et al., 2012) e melhorou o desenvolvimento dos ovócitos de suíno (KANG et al., 2009; SHI et al., 2009). Em Bubalinos houve redução do estresse oxidativo, da concentração de ROS e danos ao DNA quando a melatonina foi adicionada aos meios de maturação (MANJUNATHA et al., 2009).

Entretanto, em relação a menores quantidades de ROS produzidos pelos ovócitos no presente experimento, o tratamento com a melatonina mostrou-se ineficaz quando comparado ao controle e aos demais tratamentos. Isso poderia ser explicado,

pois o experimento ocorreu no período de verão, o que poderia ter piorado a qualidade dos ovócitos, e a melatonina, sob essas condições, não ter sido o antioxidante mais eficaz na diminuição de ROS. Além disso, a concentração de melatonina utilizada pode não ter sido a mais adequada, sendo necessário maiores concentrações devido as condições ambientais e de cultivo do presente experimento.

Quando a melatonina foi associada a pOSP houve redução da quantidade de ROS mostrando melhores resultados em relação ao controle e ao tratamento que utilizou-se somente de melatonina. Porém, este resultado foi inferior quando comparado ao tratamento com pOSP isolada. Isso revelou que as condições em que a melatonina foi utilizada não foram as melhores para ela atuar na redução de espécies reativas de oxigênio e que isto poderia ter levado a certos prejuízos, pois quando a pOSP foi utilizada isoladamente houve redução de ROS em relação aos grupos que utilizaram melatonina, tornando a pOSP um antioxidante proteico mais eficaz que a melatonina no presente estudo.

A pOSP poderia atuar então, como um antioxidante proteico ou então poderia agir pelo aumento da expressão de enzimas antioxidantes benéficas para o desenvolvimento do ovócito.

No presente estudo, por mais que a melatonina tenha levado a melhora na expansão das células do CCOs, ela não se mostrou eficaz em reduzir as espécies reativas de oxigênio e, por isso, pode não ter proporcionado os melhores índices de clivagem embrionária. Corroborando esse resultado, os estudos de Kang et al. (2009) utilizando a melatonina na concentração de 10 ng/mL durante a maturação *in vitro* do ovócito, apesar de resultar em maior percentual de extrusão do corpúsculo polar e aumento da porcentagem de ovócitos ativados partenogeneticamente desenvolvidos até blastocisto, porém a taxa de clivagem e o número de células por blastocisto não foi afetado. A taxa de clivagem também não se mostrou melhor quando a pOSP foi adicionada aos meios, como também verificado por Kouba et al. (2000) que não houve efeito dos tratamentos com pOSP sobre a taxa de clivagem de ovócitos fertilizados e cultivados *in vitro*. Possivelmente, devido as condições *in vitro* serem menos adequadas do que as *in vivo*, seriam necessárias maiores quantidades de pOSP no ambiente *in vitro* para ter efeito em relação a taxa de clivagem.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados do presente estudo, conclui-se que a melatonina e a proteína específica do oviduto (pOSP) são eficientes em melhorar a expansão das células do *cumulus ooforus* (CCOs) de suínos. Além disso, a pOSP induz a menor quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzida pelos ovócitos, podendo ser considerada um antioxidante proteico para suínos. Entretanto, a taxa de clivagem não apresentou diferença entre os tratamentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; ZÚNIGA, O. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro*. **Veterinary Research Communications**, v.26, p.151–158, 2002.
2. BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; CHOI, I.; CLEAVER, B. D.; SIMMEN, F. A. Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. **Biology of reproduction**, v.55, p.1305-1314, 1996.
3. BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M. Identification, characterization and localization of three proteins expressed by the porcine oviduct. **Theriogenology**, v.60, p.225-238, 2003.
4. CASAO, A.; ABECIA, J. A.; CEBRIAN PEREZ, J. A., MUINO-BLANCO, T.; VÁZQUEZ, M. I.; FORCADA, F. The effects of melatonin on *in vitro* oocyte competence and embryo development in sheep. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.8, p.35–41, 2010.
5. CHATTORAJ, A.; BHATTACHARYYA, S.; BASU, D.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, S.; MAITRA, S. K. Melatonin accelerates maturation inducing hormone (MIH): induced oocyte maturation in carps. **General and Comparative Endocrinology**, v.140, p.145–155, 2005.
6. CHOI, J.; PARK, S. M.; LEE, M.; KIM, J. H.; JEONG, Y. I.; LEE, J. Y.; PARK, S. W.; KIM, H. S.; HOSSEIN, M. S.; JEONG, Y. W.; KIM, S.; HYUN, S. H.; HWANG, W. S. Anti-apoptotic effect of melatonin on porcine parthenogenic embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.1127–1135, 2008.
7. DAY B. N.; ABEYDEERA L. R.; CANTLEY T. C.; RIEKE A.; MURPHY C. N. Exposure of pig oocytes to estrus oviduct can influence the morphological, physical and *in vitro* fertilization parameters. **Theriogenology**, v.53, p.418, 2000.
8. EL-RAEY, M.; GESHI, M., SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; SOSA, G. A.; ABAU EL-ROOS, M. E. A.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte

- maturation *in vitro* in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.78, p.250–262, 2011.
9. GOMEZ, M. N.; KANG, J. T.; KOO, O. J.; KIM, S. J.; KWON, D. K.; PARK, S. J.; ATIKUZZAMAN, M.; HONG, S. G.; JANG, G.; LEE, B. C. Effect of oocyte-secreted factors on porcine *in vitro* maturation, cumulus expansion and developmental competence of parthenotes. **Zygote**, v.20, p.135–45, 2012.
 10. HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; IMAI, H. Excessive concentration of glucose during *in vitro* maturation impairs the developmental competence of bovine oocyte after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.520–526, 2000.
 11. HUNTER, R. H. Reflections upon sperm-endosalpingeal and sperm-zona pellucid interactions *in vivo* and *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.147–154, 2003.
 12. JANJANAM, J.; SINGH, S.; CHOUDHARY, S.; PRADEEP, M. A., KUMAR, S.; KUMARESAN, A.; MOHANTY, A. K. Molecular cloning, sequence characterization and heterologous expression of buffalo (*Bubalus bubalis*) oviduct-specific glycoprotein in *E. coli*. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.10031-10043, 2012.
 13. KANG, J. T.; KOO, O. J.; KWON, D. K.; PARK, H. J.; JANG, G.; LEE, B. C. Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. **Journal Pineal Research**, v.46, p.22–28, 2009.
 14. KOUBA, A. J.; ABEYDEERA, L. R.; ALVAREZ, I. M.; DAY, B. N.; BUHI, W. C. Effects of the Porcine Oviduct-Specific Glycoprotein on Fertilization, Polyspermy, and Embryonic Development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 242–250, 2000.
 15. KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, p.463–471, 1999.
 16. 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.
 17. MCCAULEY, T. C.; BUHI, W. C.; WU, G. M.; MAO, J.; CAAMANO, J. N.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Oviduct-Specific Glycoprotein Modulates Sperm-Zona Binding and Improves Efficiency of Porcine Fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.69, p. 828–834, 2003.
 18. MIYANO, T.; HIROOKA, E. R.; KANO, K.; MIYAKE, M.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Effects of hyaluronic acid on development of 1- and 2-cell porcine embryos to the blastocyst stage *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, p.1299-1305, 1994.

19. NAKANO, M.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of melatonin treatment on the developmental potential of parthenogenetic and somatic cell nuclear-transferred porcine oocytes *in vitro*. **Zygote**, v.20, p.199–207, 2012.
20. PAPIS, K.; POLESZCZUK, O.; WENTA-MUCHALSKA, E.; MODLINSKI, J. A. Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. **Journal Pineal Research**, v.43, p.321–326, 2007.
21. PETTERS, R. M.; WELLS, K. D. Culture of pig embryos. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 48, p. 61-73, 1993.
22. REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S. A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. **International Journal of Molecular Science**, v.14, p.7231–7272, 2013.
23. RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KIM, I. J.; WANG, H.; KAYA, A.; MEMILI, E. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos *in vitro*. **Journal Pineal Research**, v.43, p.283–8, 2007.
24. SAEG. SAEG: sistema para análises estatísticas, versão 9.1. Viçosa: UFV, 2007
25. SALEHI, M.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of melatonin treatment on developmental potential of somatic cell nuclear-transferred mouse oocytes *in vitro*. **Zygote**, v.22, p.213-217, 2014.
26. SEN, U.; MUKHERJEE, D.; BHATTACHARYYA, S. P.; MUKHERJEE, D. Seasonal changes in plasma steroid levels in Indian major carp *Labeo rohita*: influence of homologous pituitary extract on steroid production and development of oocyte maturational competence. **General and Comparative Endocrinology**, v.128, p.123–134, 2002.
27. 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.
28. TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, p.1-9, 2012.
29. TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of Ovarian Research**, v.25, p.5, 2012.
30. TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; REITER, R. J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Pineal Research**, v.42, p.28–42, 2007.

31. WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; TANIGUCHI, M.; KARJA, N. W. K.; AGUNG, B.; NIL, M.; NAGAI, T. Effects of hexoses on *in vitro* oocyte maturation and embryo development in pigs. **Theriogenology**, v.65, p.332-343, 2006.
32. YOKOO, M.; KIMURA, N.; ABE, H.; SATO, E. Influence of hyaluronan accumulation during cumulus expansion on *in vitro* porcine oocyte maturation. **Zygote**, v.4, p.309-314, 2008.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Baseado nos resultados do presente estudo conclui-se que a técnica para a produção de proteína específica do oviduto (pOSP) recombinante é eficaz, e esta proteína associada a melatonina proporcionam melhores taxas de expansão das células do *cumulus ooforus* (CCOs) de suínos, entretanto, a taxa de clivagem não apresentou diferença entre os tratamentos. Além disso, a adição pOSP no meio de cultivo reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo a pOSP ser considerada um antioxidante proteico para suínos.