

EFEITO DA MELATONINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS SUÍNOS**Daniela C. Albring¹, Maria H. C. Cruz², Andressa P. de Souza³, Cláudia L. V. Leal⁴
e Mariana G. Marques⁵**¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, estagiária da Embrapa Suínos e Aves, bolsista CNPQ/PIBIC, dannyela_albring@hotmail.com²Doutoranda da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP³Doutoranda - UDESC⁴Professora da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP⁵Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves**Palavras-chave:** maturação oocitária, suínos, radicais livres, antioxidante.**INTRODUÇÃO**

A maturação oocitária é considerada uma das fases mais importantes do processo de produção *in vitro* de embriões, pois é neste período que o oócito além de sofrer modificações nucleares passa por mudanças bioquímicas, estruturais e citoesqueléticas que serão responsáveis e essenciais para o desenvolvimento inicial do embrião após a fecundação (1). Metodologias de maturação *in vitro* mais eficientes aumentariam a competência oocitária e por consequência o número e qualidade de blastocistos. Uma das alternativas é minimizar a exposição dos oócitos a espécies reativas de oxigênio nos sistemas *in vitro*. A melatonina apresenta propriedades antioxidantes e anti-apoptóticas e atua reduzindo a formação de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (2). Está envolvida em diversas vias de sinalização celular, sendo muitas dessas envolvidas na maturação oocitária. A melatonina foi detectada no fluido folicular (PFF) de suínos (3) e mais recentemente em bovinos (4). Ainda, seus receptores foram localizados em ovários de suínos (5) e humanos (6). Nesse contexto, o objetivo neste estudo foi avaliar o efeito da melatonina e do sinergismo com a suplementação com PFF na maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos. Como controle foi utilizado a suplementação com álcool polivinílico (PVA).

MATERIAL E MÉTODOS

A maturação *in vitro* foi realizada seguindo protocolo descrito por Marques et al., (7). Folículos ovarianos de 2 a 5 mm foram aspirados com agulha 18G acoplada em seringa de 5 ml, para obtenção dos oócitos. O líquido folicular obtido foi filtrado e transferido para placa de petri, para recuperação dos complexos cúmulus-oócito (CCOs), sob estereomicroscópio. Foram selecionados oócitos de grau I e II de acordo com a classificação da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Grupos de 20 a 25 oócitos foram distribuídos em 4 tratamentos: PVA (0,1% PVA em meio de maturação - MIV); PVA-MEL (0,1% PVA, 10⁻⁹ M Mel em MIV); PFF (10% PFF em MIV); PFF-MEL (10% PFF, 10⁻⁹ Mel em MIV), onde permaneceram por 22 horas. Decorrido esse período, os oócitos foram transferidos para os respectivos meios de maturação sem hormônios, onde permaneceram por mais 22 horas. A maturação oocitária foi realizada em placa de quatro poços contendo 400 µl de meio, em estufa a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Para avaliação da taxa de maturação nuclear, após as 44 horas de maturação, as células do *cumulus* foram retiradas por remoção mecânica e os oócitos expostos a 10µg/ml de HOECHST 33258 e em seguida colocados entre lâmina e lamínula. A avaliação foi realizada sob microscópio de epifluorescência (ZEISS Axiolab A1), em filtro WU, com excitações de 450-490 nm e emissão 520 nm em aumento de 400x. As variáveis foram submetidas ao PROC MIXED (SAS®, versão 9.1.3 para Windows). Foi utilizado o LSMEANS (média dos quadrados mínimos) para obtenção das médias ajustadas dos tratamentos, com comparações utilizando-se o teste Tukey com nível de significância de 5%. Foram consideradas variáveis classificatórias a presença de melatonina e a suplementação com PFF, bem como a interação entre elas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação entre a ação da melatonina e do PFF nos índices de oócitos em metáfase 2 (M2) ($p=0,69$), desta forma o efeito da melatonina e do PFF foram avaliados separadamente. Como demonstrado em estudos anteriores (1) não foi verificado efeito da suplementação do meio de maturação nos índices de M2 ($p=0,322$) (Figura 1A). A melatonina, na concentração avaliada neste estudo não alterou as taxas de M2 ($p=0,764$) (Figura 1B). A adição de melatonina durante a maturação *in vitro* de oócitos suínos resultou maiores índices de M2 (5), redução da ROS (3) e melhorias no desenvolvimento embrionário (8, 9). Em contraste, Shi et al., (2009) observaram que a adição de melatonina durante a MIV de oócitos suínos apresentou efeitos negativos (3). Além disso, estudos com embriões suínos relataram que a melatonina é capaz de interferir na expressão de genes relacionados a apoptose (10). Ainda, em bovinos a adição de melatonina durante a MIV não apresentou efeito evidente sobre a maturação nuclear (11, 12) e citoplasmática (12). A divergência desses resultados pode ser devido às diferentes concentrações de melatonina utilizadas, bem como, as diferentes condições de maturação, entre elas, as suplementações com diferentes macromoléculas. Outros estudos devem ser realizados como objetivo de esclarecer o efeito da melatonina na maturação citoplasmática e no decorrente desenvolvimento embrionário.

CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que não houve efeito da adição de melatonina nos índices de oócitos em Metáfase 2. Também não foi observado efeito sinérgico da melatonina e do PFF na maturação nuclear.

REFERÊNCIAS

- MARQUES, M.G.; DE BARROS, F.R.O.; GOISSIS, M.D.; CAVALCANTI, P.V.; VIANA, C.H.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A. **Effect of low oxygen tension atmosphere and maturation media supplementation on nuclear maturation, cortical granules migration and sperm penetration in swine in vitro fertilization.** *Reproduction Domestic Animal*, v. 47, p. 491–497, 2012.
- HARDELAND, R., CARDINALI, D.P., SRINIVASAN, V., SPENCE, D.W., BROWN, G.M., PANDIPERUMAL, S.R. **Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule.** *Progress in Neurobiology*, v. 93, p. 350–384, 2011.
- 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.
- COELHO, M.B.; RODRIGUES-CUNHA; M.C., FERREIRA, C. R.; CABRAL, E. C.; NOGUEIRA, G. P.; EBERLIN, M.N.; LEAL, C.L.V.; SIMAS, R.C. **Assessing melatonin and its oxidative metabolites amounts in biological fluid and culture medium by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).** *Anal Methods*, v. 5, p. 6911-6918, 2013.
- KANG, J.T., KOO, O.J., KWON, D.K., PARK, H.J., JANG, G., KONG, S.K., LEE, B.C. **Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells.** *J. Pineal Res.* v.46, p. 22–28, 2009.
- NILES, L.P.; WANG, J.; SHEN, L.; LOBB, D.K.; YOUNGLAI, E.V. **Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 156, p. 107–110, 1999.
- MARQUES, M.G; NASCIMENTO, A.B.; GERGER, R.P.C.da.; GONÇALVES, J.S.A. de.; COUTINHO, A.R.S. de.; SIMÕES, R.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.D.; VISINTIN, J.A.. **Effect of culture media on porcine embryos produced by in vitro fertilization or parthenogenetic activation after oocyte maturation with cycloheximide.** *Zygote*, v. 19, p. 331–337, 2011.
- TAKADA, L.; MARTINS JUN,R A.; MINGOT, G.Z.; BALIEIRO, J.C.B.; COELHO, L.A. **Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates and DNA damage of bovine embryos.** *Scientia Agricola*, v.67, p.393-398, 2010.
- FARAHAVAR, A.; SHAHNE, A.Z.; KOHRAM, H.' VAHEDI, V. **Effect of melatonin on in vitro maturation of bovine oocytes.** *African Journal of Biotechnology*, v.9, p. 2579-2583, 2010.
- EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A.E.; SOSA, G.A.; EL-ROOS, M.E.; NAGAI, T. **Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle.** *Mol. Reprod. Dev.* v.78, p. 250-62, 2011.
- CHOI, J.; PARK, S.M.; LEE, E.; KIM, J.H.; JEONG, Y.I.; LEE, J.Y.; PARK, S.W.; KIM, H.S.; HOSSEIN, M.S.; WOO, J.Y.W.; KIM, S.; HYUN, S.H.; HWANG, W.S. **Anti-apoptotic effect of melatonin on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos.** *Molecular Reproduction and Development*, v.75, p.1127-1135, 2008.
- PAPIS, K.; POLESZCZUK, O.; WENTA-MUCHAISKA, E.; MODINKKI, J.A. **Melatonin effect Of bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration.** *Journal of Pineal Research*, v.43, p.321-326, 2007.

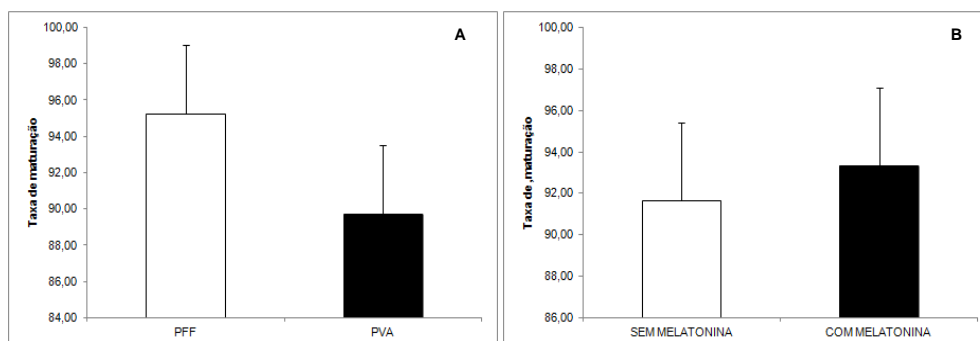


Figura 1. Índices de oócitos suínos em Metáfase 2 (taxa de maturação) após a maturação *in vitro*. Em A, observa-se o efeito da suplementação do meio de maturação com PFF ou PVA. Em B, observa-se o efeito da adição de 10^{-9} M de melatonina. Os dados apresentam as médias dos quadrados mínimos \pm EP.