

MELATONINA NANOENCAPSULADA INFLUENCIA AS TAXAS DE APOPTOSE NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS?

JÚLIA DAMÉ PASCHOAL¹; NATHANIELE NEBEL BARTHER¹; MARIANA HÄRTER
REMIÃO¹; TONY SILVEIRA¹, ELIZA ROSSI KOMNINOU¹; TIAGO COLLARES¹

¹*Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular – GPO/Embryo, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas – juliadfp@outlook.com; collares.t@gmail.com;*

1. INTRODUÇÃO

A melatonina é o principal neuro-hormônio pineal e, possui diversas funções fisiopatológicas importantes, dentre elas destacando-se principalmente as atividades antioxidantes e de regulação do processo apoptótico (ZHANG et al., 2014).

O processo de produção *in vitro* (PIV) de embriões vem sendo aprimorado ao longo dos anos, a fim de se elevar a quantidade e a qualidade dos blastocistos obtidos (CHEUQUEMAN et al., 2014).

A melatonina tem se mostrado vantajosa, atuando como um agente citoprotetor em estágios distintos de desenvolvimento de embriões em diferentes espécies (WANG et al., 2013; EL-RAEY et al., 2011). No entanto, o uso da melatonina é prejudicado devido a sua meia-vida biológica curta (GANIE et al., 2015). Buscando superar este obstáculo, ferramentas biotecnológicas têm sido desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa a fim de aumentar sua biodisponibilidade, tais como, formulações de melatonina em nanocápsulas.

O nanoencapsulamento de substâncias permite um sistema de liberação controlada, melhora o índice terapêutico de medicamentos, aumenta a biodisponibilidade e diminui a toxicidade de fármacos (SCHAFFAZICK et al., 2005).

O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos da adição de melatonina livre ou nanoencapsulada durante a etapa de maturação *in vitro* de oócitos, sobre a qualidade de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, utilizando como parâmetros o número total de células e a frequência de células apoptóticas por embrião.

2. METODOLOGIA

Os ovários bovinos foram obtidos de abatedouro local. Os folículos com tamanho entre 2 a 8 milímetros de diâmetro foram aspirados com auxílio de seringa acoplada a agulha. Os CCOs considerados viáveis foram selecionados de acordo com o número de camadas e grau de compactação das células do cumulus e homogeneidade do citoplasma. Grupos de 15 a 20 CCOs foram transferidos para gotas de 100µL meio de maturação *in vitro* (In Vitro Brasil, Campinas, Brasil) e mantidos em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO₂, por 24 horas. A melatonina foi suplementada no meio de maturação (MIV), tanto para sua forma livre, quanto

nanoencapsulada. Os CCOs foram distribuídos igualmente entre os grupos: Mel (melatonina livre), Mel-NC (melatonina nanoencapsulada), NC (nanocápsulas sem o fármaco), e Controle (não suplementado).

Para realização da fertilização *in vitro* (FIV), palhetas de sêmen foram colocadas em banho-maria por 30 seg a 35°C. Logo após, as células espermáticas foram submetidas a duas centrifugações em meio TL Sêmen e FIV gotas (In Vitro Brasil, Campinas, Brasil), respectivamente. A partir do *pellet*, foi avaliada a motilidade espermática e ajustou-se a concentração de espermatozoides. Cada gota contendo os CCOs recebeu 4 µL de sêmen (concentração final 5×10^3 espermatozoides por ócito). Após cerca de 18 horas os presumíveis zigotos foram transferidos em grupos de 25, para gotas de 100 µL de meio SOF (*Synthetic Oviduct Fluid* – In Vitro Brasil, Campinas, Brasil) e mantidos em estufa a 38,5°C, com 5% de CO₂ por 7 dias até atingirem o estágio de desenvolvimento de blastocisto.

Transcorridos 7 dias de cultivo, os blastocistos foram fixados por uma hora à temperatura ambiente em paraformaldeído 4% e então submetidos ao ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end labeling assay* - Kit de fluoresceína para detecção de morte celular *in situ* Roche Diagnostics, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany), segundo as instruções do fabricante. Ao final da reação, para a técnica de coloração nuclear, os embriões foram incubados com 10mg/mL do corante genômico Hoechst 33342 por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente e montados em lâminas para avaliação simultânea do número de células com DNA fragmentado e número total de células embrionárias.

Os embriões foram avaliados em microscópio invertido de epifluorescência (IX 71, Olympus Co.) e a emissão de fluorescência foi registrada utilizando uma câmera digital DP72 (Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Japan) acoplada ao microscópio. As imagens obtidas foram analisadas em software Cell[^]F (Olympus SIS-Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) que permitiu a contagem do número de células embrionárias, com núcleos corados em azul, e do número de células com DNA fragmentado, com núcleos corados em verde de cada embrião. A frequência de apoptose foi calculada através da divisão do número de células apoptóticas pelo número total de células. O experimento foi realizado em triplicata, com 6-8 embriões por grupo em cada repetição.

Para análise estatística, os resultados foram comparados utilizando análise de variância de uma entrada (ANOVA), seguida de teste de comparação Newman-Keuls. Os resultados foram descritos com os valores médios para cada grupo de dados \pm SEM (erro padrão da média), onde o grau de significância estatística em todas as análises foi definida em nível de probabilidade de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios do número total de células nos blastocistos gerados a partir de ócitos suplementados com melatonina (MEL $102,27 \pm 10,71$ e MEL-NC $113,31 \pm 9,47$), foram significativamente maiores do que os grupos NC ($61,75 \pm 8,21$) e controle ($66,84 \pm 9,06$). Quanto a média da frequência de células apoptóticas por blastocisto, os resultados encontrados demonstram que o grupo MEL-NC ($4,90 \pm 0,77$) apresentou uma frequência menor quando comparado aos demais grupos. Mesmo assim, o grupo MEL ($13,33 \pm 2,13$) apresentou menor frequência de células

apoptóticas do que os grupos NC e controle ($22,18 \pm 2,33$ e $21,75 \pm 3,16$, respectivamente).

O presente trabalho demonstrou que a qualidade dos embriões foi superior quando os oócitos foram maturados na presença de melatonina, tanto na forma livre, quanto nanoencapsulada. Entretanto, esta melhora foi mais expressiva no grupo MEL-NC do que no grupo MEL, em relação à redução da frequência de células apoptóticas.

Um elevado número de células por embrião está relacionado a altas taxas de implantação no trato uterino e na posterior geração de prenhez (HAVLICEKI et al., 2005). Estudos prévios com embriões de diferentes espécies haviam demonstrado que a suplementação de melatonina nos meios MIV e CIV geraram um aumento significativo no número de células por blastocistos quando comparada a grupos controle (Tian et al. 2014; Wang et al. 2014; WANG et al., 2013).

4. CONCLUSÕES

Blastocistos cultivados em meio suplementado com melatonina nanoencapsulada apresentaram maior número de células e menor frequência de apoptose quando comparados aos demais grupos. Tais resultados indicam um aumento do efeito anti-apoptótico da melatonina, quando associada à nanocápsulas.

5. REFERÊNCIAS

ZHANG, H.; ZHANG, Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of pineal research**, v. 57, n. 2, p. 131-146, 2014.

CHEUQUEMÁN, C.; ARIAS, M.E.; RISOPATRON, J.; FELMER, R.; ALVAREZ, J.; MOGAS, T.; SANCHEZ, R. Supplementation of IVF medium with melatonin: effect on sperm functionality and in vitro produced bovine embryos. **Andrologia**, 2014.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L. TAN, D.; REITER, R.J.; LUI, 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, n. 3, p. 267-274, 2013.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; GHAFAR, A. E. A.; SOSA, G.A.; EL-ROSSI, M.E.A.A.; NEGAI, 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, n. 4, p. 250-262, 2011.

GANIE, S.A.; DARI, T.A.; BHAT, A.H.; DARI, K.B.; ANEES, S.; ZARGAR M.A.; MASOOD, A. Melatonin: A potential antioxidant therapeutic agent for mitochondrial dysfunctions and related disorders. **Rejuvenation research**, n. ja, 2015.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A.R.; CORDOVA, C.A.S.; CRECZYNSKI, T.B.; GUTERRES, S.S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International journal of pharmaceuticals**, v. 289, n. 1, p. 209-213, 2005.

HAVLICEK, V. LOPATAROVA, M.; CECH, S.; DOLEZEL, R.; HUBER, T.; PAVLOK, A.; BREM, G.; BESENFELDER, U. In vivo culture of bovine embryos and quality assessment of in vivo vs. in vitro produced embryos. **Vet Med–Czech**, v. 50, n. 4, p. 149-157, 2005.

TIAN, X.; WANG, F.; HE, C.; ZHANG, L.; TAN, D. REITER R.J.; XU, J.; JI, P. Y.; LIU, G. S. 2014. "Beneficial Effects of Melatonin on Bovine Oocytes Maturation: A Mechanistic Approach." *Journal of Pineal Research* 57 (3): 239–47. doi:10.1111/jpi.12163.

WANG. F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; GAO, C.; HE, C.; FU Y.; JI, P.; LI, Y.; LI, N.; LIU, G. 2014. "Beneficial Effects of Melatonin on in Vitro Bovine Embryonic Development Are Mediated by Melatonin Receptor 1." *Journal of Pineal Research* 56 (3): 333–42. doi:10.1111/jpi.12126.