

IMPACTO DA MELATONINA NANOENCAPSULADA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

MARIANA HÄRTER REMIÃO¹; CAROLINE GOMES LUCAS¹; TONY SILVEIRA¹; ANDREA CRISTINA BASSO²; SÍLVIA STANISQUASKI GUTERRES³; TIAGO COLLARES¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPEL - marri.hr@hotmail.com; tiago.collares@pq.cnpq.br

² In Vitro Brasil S/A;

³ Faculdade de Farmácia, UFRGS.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) é uma área emergente em todo mundo, sendo o Brasil o principal produtor de embriões gerados por fertilização *in vitro*, com quase 50% da produção mundial. No entanto, apesar de muitos grupos de pesquisa se dedicarem a essa área, ainda são obtidas baixas porcentagens de produção de embriões, em torno de 30 a 40% (WANG et al. 2013). Sabe-se que uma etapa crucial da PIVE que garante o sucesso do desenvolvimento embrionário é a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos. Nessa etapa, uma das principais causas de depleção dos oócitos é o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo causar estresse oxidativo nas células (TAMURA et al. 2008). Com isso, a adição de moléculas antioxidantes durante a MIV têm sido uma alternativa para controlar a produção exacerbada de EROs. Dentre essas moléculas, a melatonina tem se destacado, demonstrando efeitos benéficos quando adicionada ao meio MIV. A diminuição na produção de EROs (EL-RAEY et al. 2011; KANG et al. 2009); a redução da taxa de apoptose em células do *cumulus* (TAKADA et al. 2012); a elevação nas taxas de maturação e de desenvolvimento embrionário, além do aumento do número de células por blastocisto (TIAN et al. 2014) são alguns dos resultados encontrados quando a melatonina foi adicionada na MIV.

Apesar dos efeitos benéficos, acredita-se que muito mais poderia ser aproveitado desta molécula já que ela tem demonstrado apresentar baixa disponibilidade, pouca solubilidade em água, meia-vida biológica curta, e metabolismo e absorção rápidos (HOFFMEISTER et al. 2012). A fim de contornar essas limitações, a nanotecnologia surge com uma nova forma de entrega de fármacos, em nanocápsulas. Já foi relatado que a melatonina quando associada à sistemas nanoparticulados apresenta um aumento da sua estabilidade física, da sua entrega controlada (HOFFMEISTER et al. 2012; SCHAFFAZICK et al. 2006) e da sua atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica (SCHAFFAZICK et al. 2008).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar uma nova forma de entrega da melatonina no meio MIV de oócitos bovinos através de sua associação à nanocápsulas.

2. METODOLOGIA

Grupos foram suplementados com a melatonina livre (MEL), melatonina nanoencapsulada (MEL-NC) ou nanocápsulas vazias (NC), além de um grupo controle (Controle). Parte dos oócitos foram avaliados quanto às taxas de maturação, e parte, fertilizados. Os embriões produzidos foram avaliados quanto às taxas de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocisto e quanto ao número de total de células e porcentagem de células apoptóticas por blastocisto.

Ovários provenientes de abatedouro local tiveram seus folículos com tamanhos entre 2-8 mm de diâmetro aspirados com auxílio de seringa de 20 ml e agulha 40 x 12. O líquido folicular foi filtrado em filtro coletor de embriões (Nutricell, Campinas-SP) e lavado com PBS (phosphate buffer saline) para a procura dos complexos *cumulus* oócitos (CCOs) em lupa estereomicroscópica. Grupos de 15 a 20 CCOs considerados viáveis foram distribuídos em placas com meio MIV contendo os seguintes tratamentos: MEL nas concentrações 10^{-6} M, 10^{-9} M e 10^{-12} M; MEL-NC nas concentrações 10^{-6} M, 10^{-9} M e 10^{-12} M da droga; NC nos volumes correspondentes da MEL-NC à 10^{-6} M, 10^{-9} M e 10^{-12} M; e Controle, sem tratamento. Os CCOs permaneceram em estufa a 38,5°C, com 5% de CO₂, de 22 a 26 h para a maturação. Passado esse tempo, parte dos CCOs foram avaliados quanto à taxa de maturação, enquanto os demais foram submetidos à fertilização *in vitro* (FIV). Para a avaliação da taxa de maturação, os CCOs foram desnudados com hialuronidase (160 UI/mL) e corados com Hoescht 33342 (10 µg/ml) por 30 min à temperatura ambiente, e analisados quanto à extrusão do corpúsculo polar em microscópio invertido de fluorescência (IX 71, Olympus Co.).

Na FIV, uma palheta de sêmen de touro foi descongelada e a amostra obtida foi centrifugada para a remoção dos crioprotetores e do plasma seminal. Em seguida a amostra foi avaliada quanto à motilidade e teve sua concentração ajustada para 1×10^6 espermatozoides por mL. Espermatozoides e CCOs foram mantidos em contato por 18h em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO₂. Os presumíveis zigotos foram cultivados por 7 dias após a FIV, em estufa nas mesmas condições, em meio SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*). No dia 3 (D3) após a FIV foi avaliada a clivagem dos embriões, e no dia 7 (D7), a taxa de embriões que atingiram o estágio de blastocisto. A partir destas análises foi escolhida a concentração de 10^{-9} M para realizar o teste de TUNEL.

O teste de TUNEL foi realizado utilizando o kit In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, USA) seguindo pequenas modificações de acordo com LEE (2010). Foram realizadas 3 repetições, com 6 a 8 embriões por grupo tratado. O número total de células e o número de células apoptóticas por embrião foi contado utilizando o software Cell[^]F.

Para a análise da taxa de maturação foi utilizado o teste de Qui-quadrado. A avaliação das taxas de clivagem e produção de blastocistos foram avaliados usando análise de variância (ANOVA) de duas entradas seguido de teste de Tukey para múltiplas comparações. O número médio de células por blastocistos, e o número médio de células apoptóticas por blastocistos foi analisado utilizando ANOVA de uma entrada, seguido de teste de múltipla variância Newman-Keuls. O grau de significância de todas as análises foi definida por nível de probabilidade $P < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em torno de 24 horas após a MIV, os CCOs foram desnudados, e corados genomicamente para visualização da extrusão do corpúsculo polar, indicando terem alcançado a maturação (estágio de metáfase II). Os grupos MEL, MEL-NC e NC apresentaram maiores taxas de maturação do que o grupo controle ($P < 0.05$; Tabela 1).

Em relação a taxa de clivagem e a taxa de produção de blastocistos, o grupo MEL-NC apresentou taxas de clivagem e produção de blastocistos superiores às dos demais grupos. Este grupo apresentou ainda, um aumento significativo da taxa de produção de blastocistos na concentração de 10^{-9} M ($P < 0.05$; Tabela 1). O grupo MEL também apresentou efeito positivo quando comparado ao grupo controle, tanto em relação à clivagem quanto à produção de blastocistos. No

grupo NC foi observada uma taxa de produção de blastocistos superior a do grupo controle, sendo equivalente ao grupo MEL ($P < 0.05$; Tabela 1).

TABELA 1. Taxas de oócitos que atingiram a fase de MII em 24 horas de MIV, embriões que clivaram no D3, e embriões que alcançaram o estágio de blastocisto no D7, nos grupos tratados com MEL, MEL-NC, e NC nas concentrações 10^{-6} M, 10^{-9} M e 10^{-12} M durante a MIV, e no grupo controle.

	MIi em 24 horas de MIV	Clivagem no D3	Blastocisto no D7
MEL	10^{-6} M: 92.53% \pm 4.58 ^a	10^{-6} M: 86.80% \pm 1.95 ^b	10^{-6} M: 42.09% \pm 2.33 ^c
	10^{-9} M: 81.64% \pm 6.69 ^a	10^{-9} M: 77.92% \pm 3.15 ^b	10^{-9} M: 39.56% \pm 2.16 ^c
	10^{-12} M: 86.42% \pm 9.43 ^a	10^{-12} M: 77.29% \pm 2.77 ^b	10^{-12} M: 43.75% \pm 1.83 ^c
MEL-NC	10^{-6} M: 86.94% \pm 2.43 ^a	10^{-6} M: 88.50% \pm 1.38 ^a	10^{-6} M: 44.50% \pm 0.29 ^{ab}
	10^{-9} M: 80.76% \pm 4.54 ^a	10^{-9} M: 89.50% \pm 1.52 ^a	10^{-9} M: 54.80% \pm 1.13 ^a
	10^{-12} M: 74.79% \pm 4.50 ^a	10^{-12} M: 81.10% \pm 2.00 ^a	10^{-12} M: 46.10% \pm 1.50 ^{ab}
NC	10^{-6} M: 80.25% \pm 2.85 ^a	10^{-6} M: 76.56% \pm 2.42 ^c	10^{-6} M: 43.38% \pm 0.68 ^c
	10^{-9} M: 87.50% \pm 1.70 ^a	10^{-9} M: 69.58% \pm 4.00 ^c	10^{-9} M: 39.64% \pm 2.76 ^c
	10^{-12} M: 86.47% \pm 5.59 ^a	10^{-12} M: 75.41% \pm 0.90 ^c	10^{-12} M: 42.15% \pm 0.95 ^c
Controle	63.51% \pm 4.59 ^b	71.92% \pm 3.75 ^c	35.26% \pm 2.42 ^d

A partir dos resultados de produção de blastocisto, foi escolhida a concentração de 10^{-9} M para o teste de TUNEL. Encontrou-se que os valores médios do número total de células por embrião nos grupos tratados com melatonina (MEL e MEL-NC) foram maiores do que os grupos NC e controle ($102,27 \pm 10,71$; $113,31 \pm 9,47$; $61,75 \pm 8,21$; e $66,84 \pm 9,06$, respectivamente). Em relação à média de células apoptóticas por blastocisto, o grupo MEL-NC apresentou menores taxas em relação aos demais grupos. O grupo MEL teve taxas intermediárias de frequência de apoptose, enquanto os grupos NC e controle tiveram as taxas mais altas ($4,90 \pm 0,77$; $13,33 \pm 2,13$; $22,18 \pm 2,33$ e $21,75 \pm 3,16$, respectivamente).

O presente estudo demonstrou que a suplementação do meio MIV com melatonina melhora as taxas de maturação, clivagem e produção de blastocisto em relação ao controle. Ainda, nossos resultados demonstram, além de um aumento na produção, um aumento da qualidade embrionária nos grupos tratados com melatonina. Nestes grupos, se observou um número superior de células por blastocisto em comparação aos grupos NC e controle. Um maior número de células por embrião indica que os embriões realizaram uma mitose eficiente e têm uma maior chance de gerarem uma prenhez (TIAN et al., 2014). Trabalhos anteriores já haviam reportado aumento de células por blastocisto em diversas espécies, quando a melatonina livre foi adicionada ao processo de MIV (DEGHANI-MOHAMMADABADI et al. 2014; RODRIGUEZ-OSORIO et al. 2007; TIAN et al. 2014).

4. CONCLUSÕES

Concluimos que os efeitos positivos da suplementação de melatonina durante a MIV sobre a produção e a qualidade embrionária podem ser melhorados pela associação do fármaco à nanocápsulas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEGHANI-MOHAMMADABADI, M., SALEHI, M., FARIFTEH, F., NEMATOLLAHI, S., AREFIAN, E., HAJJARIZADEH, A., PARIVAR, K., NOURMOHAMMADI Z. Melatonin Modulates the Expression of BCL-XI and Improve the Development of Vitrified Embryos

Obtained by IVF in Mice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.31, n.4, p.453–461.2014.

EL-RAEY, M., GESHI, M., SOMFAI, T., KANEDA, M., HIRAKO, M., ABDEL-GHAFFAR, A. E., SOSA, G. A., EL-ROOS, M. E. A. 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, n.4, p. 250–262. 2011.

HOFFMEISTER, C.R., DURLI, T.L., SCHAFFAZICK, S. R., RAFFIN, R. P., BENDER, E. A., BECK, R. C., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. Hydrogels Containing Redispersible Spray-Dried Melatonin-Loaded Nanocapsules: A Formulation for Transdermal-Controlled Delivery. **Nanoscale Research Letters**, v.251, n.7, p. 1-13. 2012.

KANG, J., KOO O., KWON, D., PARK, H., JANG, G., KANG, S., LEE, B. Effects of Melatonin on in Vitro Maturation of Porcine Oocyte and Expression of Melatonin Receptor RNA in Cumulus and Granulosa Cells. **Journal of Pineal Research**, v.46, n.1, p. 22–28. 2009.

LEE, K., WANG, C., CHAILLE, J. M., MACHATY, Z. Effect of Resveratrol on the Development of Porcine Embryos Produced in Vitro. **The Journal of Reproduction and Development**, v.56, n. 3, p. 330–335. 2010.

RODRIGUEZ-OSORIO, N., KIM, I.J., WANG, H., KAYA, A., MEMILI, E. Melatonin Increases Cleavage Rate of Porcine Preimplantation Embryos in Vitro. **Journal of Pineal Research**, v.43, n. 3, p.283–288. 2007.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., MEZZALIRA, G., GUTERRES, S. S. Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin. **Journal of Brazil Chemistry Society**, v. 17, n. 3, p.562–569. 2006.

SCHAFFAZICK, S.R., SIQUEIRA, I. R., BADEJO, A. S., JORNADA, D. S., POHLMANN, A. R., NETTO, C. A., GUTERRES, S. S. Incorporation in Polymeric Nanocapsules Improves the Antioxidant Effect of Melatonin against Lipid Peroxidation in Mice Brain and Liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.69, n. 1, p. 64–71. 2008.

TAKADA, L., MARTINS JUNIOR, A., MINGOTI, G. Z., BALIEIRO, J. C. C., CIPOLLANETO, J., COELHO, L. Effect of Melatonin on DNA Damage of Bovine Cumulus Cells during in Vitro Maturation (IVM) and on in Vitro Embryo Development. **Research in Veterinary Science**, v.92, n. 1, p. 124–27. 2012.

TAMURA, H., TAKASAKI, A., MIWA, I., TANIGUCHI, K., MAEKAWA, R., ASADA, H., YAMAGATA, A., SHIMAMURA, K., MORIOKA, H., ISHIKAWA, H., REITER, R. J., SUGINO, N. Oxidative Stress Impairs Oocyte Quality and Melatonin Protects Oocytes from Free Radical Damage and Improves Fertilization Rate. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 3, p.280–287. 2008.

TIAN, X., WANG, F., HE, C., ZHANG, L., TAN, D., REITER, R. J., XU, J., JI, P., LIU, G. Beneficial Effects of Melatonin on Bovine Oocytes Maturation: A Mechanistic Approach. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 3, p. 239-247. 2014.

WANG, F., TIAN, X., ZHANG, L., HE, C., JI, P., LI, Y., TAN, D., LIU, G. Beneficial Effect of Resveratrol on Bovine Oocyte Maturation and Subsequent Embryonic Development after in Vitro Fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 2, p. 577–586. 2013.