

DESENVOLVENDO UMA ESTRATÉGIA PARA REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVOS CELULAR ATRAVÉS DA NANOTECNOLOGIA

**NATHANIELE NEBEL BARTHER¹; JÚLIA DAMÉ PASCHOAL¹; MARIANA
HÄRTER REMIÃO¹; WILLIAM BORGES DOMINGUES¹; CAROLINE GOMES
LUCAS¹; TIAGO COLLARES¹**

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

1. INTRODUÇÃO

A maturação ineficiente do oócito inviabiliza a produção embrionária *in vitro* e que a qualidade do oócito determina a proporção de oócitos que irão se desenvolver até o estágio de blastocistos (Wang et al. 2014; Kwak et al. 2012). Uma das principais causas da redução da qualidade oocitária durante a maturação *in vitro* é o stress oxidativo, gerado pelo aumento exacerbado de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Tamura et al. 2008). A manipulação *in vitro* leva a uma elevação na produção de EROs, resultante tanto de fatores exógenos, tais como exposição à luz e a concentrações elevadas de oxigênio, como de fatores endógenos, como a falta de um sistema antioxidante competente o suficiente para competir com os metabólitos e substratos encontrados na produção *in vitro* (Guérin, Mouatassim, and Menezo 2001).

Uma vez que os níveis intracelulares de EROs são regulados pelo balanço entre enzimas antioxidantes e enzimas pró-oxidantes, alterações fisiológicas podem acarretar uma produção excessiva de EROs, o que causa danos ao DNA, indução da apoptose e peroxidação lipídica (Takahashi, 2012). Por este motivo, vários grupos de pesquisa vêm acrescentando à formulação de seus meios, moléculas com conhecida ação antioxidante. A glutathiona (GSH) é um antioxidante encontrado nas células, o qual desempenha um papel importante no mecanismo de proteção contra o stress oxidativo intracelular vivo, uma vez que pode reagir tanto com ROS e como co-fator para a glutathiona peroxidase, que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) tóxico, protegendo contra danos induzido pelo ROS em muitos tipos de células (Stradaoli, G. et al. 2007).

Neste contexto, a melatonina vem se destacando por atuar como um agente imunoestimulador e citoprotetor, através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes, protegendo DNA e lipídios de membrana frente a danos oxidativos, durante diferentes estágios de desenvolvimento de embriões em diferentes espécies, tanto em testes *in vivo* como *in vitro* (ANISIMOV et al., 2006; LUCHETTI et al., 2010; PAPIS et al., 2007; WANG et al., 2013). No entanto, existem limitações ao uso de melatonina, devido às suas propriedades químicas, incluindo baixa e variável biodisponibilidade, meia-vida biológica curta, rápida absorção e sua solubilidade em água (Hoffmeister et al. 2012). Estas características limitam a atividade da melatonina aplicada como uma molécula antioxidante e antiapoptótica.

Estratégias biotecnológicas têm sido propostas através do nanoencapsulamento da melatonina com o propósito de superar esta limitação. A proteção da molécula com nanocápsulas previne não apenas contra a degradação, como ainda promove a redução da toxicidade e o aumento da eficácia da droga. Testes *in vivo* e *in vitro* mostraram que quando a melatonina está associada com os sistemas de nanoparticulados, suas propriedades antioxidantes são maximizadas (ZHAO et al., 2011; Hoffmeister et al. 2012; S R Schaffazick et al. 2005; Scheila R Schaffazick et al. 2008).

Com isso, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da suplementação de melatonina no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a produção de EROs e glutatona (GSH).

2. METODOLOGIA

Ovários bovinos provenientes de abatedouro local foram utilizados para punção dos complexos *cumulus* oócitos (CCOs). Os ovários foram previamente lavados com solução salina 0,9% aquecida, e após, os folículos com tamanho de 2 a 8mm foram puncionados com seringa acoplada a agulha. O líquido puncionado foi mantido em tubo cônico a 35°C, lavado com PBS (*phosphate buffer saline*) e filtrado com ajuda de filtro coletor de embriões. Os CCOs retidos no filtro foram colocados em placa de petri para procura em lupa estereomicroscópica e avaliados quanto ao número de camadas e grau de compactação das células do *cumulus* e homogeneidade do citoplasma, sendo selecionados apenas os oócitos considerados viáveis. Os CCOs selecionados foram incubados em gotas de 100 µL de meio MIV (In Vitro Brasil S/A, São Paulo, Brasil) em grupos de 15 a 20 oócitos nos seguintes tratamentos: melatonina livre (MEL) melatonina nanoencapsulada (MEL-NC); nanocápsula sem melatonina (NC); e um grupo controle sem tratamento. Os CCOs foram incubados durante 24h, à temperatura de 38,5°C com atmosfera de 5% CO₂ para completa maturação nuclear e citoplasmática.

Para mensurar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e (GSH) endógenos nos oócitos maturados, os CCOs maturados foram desnudados com hialuronidase (160 UI/mL) e lavados três vezes em 70 µL de solução PBS-PVP (*Phosphate Buffer Saline-Polivinilpirrolidona*). Uma vez desnudados os oócitos foram incubados simultaneamente com 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCHFDA) e 4-clorometil-6,8-difluoro-7-hidroxycumarina (*CellTracker Blue* CMF2HC Molecular Probes; Beyotime Institute of Biotechnology) para medir os níveis de EROs e de GSH respectivamente. Grupos de 15 a 20 oócitos foram incubados em gotas de PBS-PVP contendo 10µM de DCHFDA e 10µM de *CellTracker Blue* no escuro por 30 min. Após esse período, os oócitos foram lavados em PBS-PVP, e a fluorescência foi visualizada em uma gota de PBS-PVP utilizando microscópio invertido de epifluorescência IX 71 (Olympus Co.) equipados com filtros de UV (460nm para EROs e 379nm para GSH). Todas as imagens foram obtidas utilizando câmera digital DP72 (Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio e a intensidade de fluorescência foi medida pela intensidade de pixels utilizando o software Cell[^]F (Soluções de Imagens Olympus, Münster, Alemanha). Todos os testes foram realizados em triplicata, com grupos de 15 a 20 oócitos por replicata.

Para análise estatística os níveis de EROs e GSH dos oócitos foram comparados entre todos os grupos experimentais, utilizando análise de variância de uma entrada (ANOVA) seguida de teste de múltipla comparação de Newman-

Keuls. Os resultados foram obtidos com valores médios de cada grupo de dados, e o grau de significância estatística para todas as análises foi definida em $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados mostraram que os níveis de EROs foram estatisticamente inferiores nos grupos suplementados com melatonina tanto na forma livre quanto nanoencapsulada. O grupo Mel-NC (22.65 ± 1.68), foi o que apresentou os menores níveis de EROs dentre todos os grupos, seguido pelos grupos Mel (43.00 ± 2.93), NC (68.10 ± 7.52) e controle (59.05 ± 5.81 ; $P < 0,05$). Com relação aos níveis de GSH, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais, sendo encontrados os seguintes valores médios (controle: 157.90 ± 6.63 , NC: 132.70 ± 10.71 , Mel: 147.10 ± 7.10 , e Mel-NC: 128.40 ± 14.90).

A melatonina adicionada no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos possui geralmente efeitos benéficos na produção *in vitro* de embriões (PIVE) (Tian et al. 2014). Além do resultado apresentado neste trabalho, trabalhos prévios demonstram que quando adicionada ao meio de MIV, numa formulação não-encapsulada, a melatonina é capaz de diminuir a produção de EROs, tanto em oócitos bovinos (El-Raey et al. 2011), quanto suínos (Kang et al. 2009). A suplementação de melatonina associada à nanocápsulas levou a níveis de EROs significativamente mais baixos em relação aos demais grupos, indicando que a esta associação potencializou o efeito antioxidante da melatonina. Essa melhora é significativa, demonstrando que o tratamento com melatonina pode reduzir danos oxidativos e, conseqüentemente, prevenir danos celulares e o decréscimo da viabilidade do oócito maturado *in vitro*.

4. CONCLUSÕES

Os dados demonstram que a adição de melatonina no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos foi capaz de reduzir a produção de EROs nos oócitos maturados, porém não alterou os níveis de GSH endógeno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANISIMOV, V. N. et al. Melatonin as Antioxidant, Geroprotector and Anticarcinogen. **Biochimica et biophysica acta**, n.1757.5-6, p.573–589, 2006.

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.

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human reproduction update**, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

HOFFMEISTER, Cristiane RD et al. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale research letters**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2012.

KANG, Jung-Taek et al. 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.

KWAK, Seong-Sung et al. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*, v. 78, n. 1, p. 86-101, 2012.

LUCHETTI, F et al. Melatonin Signaling and Cell Protection Function. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** , v.24, n.10 010, p.3603–3624, 2010.

PAPIS, K.; POLESZEZUK, O.; WENTA-MUCHALSKA, E.; MODLIUNSKI, J. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. **Journal of Pineal Research**. v. 43, p.321-326, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International journal of pharmaceutics**, v. 289, n. 1, p. 209-213, 2005.

SCHAFFAZICK, Scheila R. et al. 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.

STRADAIOLI, G. et al. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1249-1255, 2007.

Takahashi, M.. Oxidative stress and redox regulation in vitro development of mammalian embryos. **Journal of reproduction and development**. v.58, n. 1, p. 1-9, 2012.

TAMURA, Hiroshi et al. 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, XiuZhi et al. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of pineal research**, v. 57, n. 3, p. 239-247, 2014.

WANG, Feng et al. Melatonin improves the quality of in-vitro produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression. **PloS one**, v. 9, n. 4, 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.

ZHAO, M.; BISWAS, A.; HU, B.; JOO, K. I.; WANG, P.; GU, Z.; TANG, Y. Redoxresponsive nanocapsules for intracellular protein delivery. **Biomaterials**. v.32, n.22, p. 5223–5230, 2011.