

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

DOMINGUES, William Borges¹; KOMNINOU, Eliza Rossi¹; CAMPOS, Vinicius Farias¹; SEIXAS, Fabiana Kömmling²; COLLARES, Tiago Veiras¹

¹Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

²Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

williamwwe@hotmail.com¹

1. INTRODUÇÃO

A melatonina é um neuro-hormônio derivado da serotonina, sintetizado principalmente na glândula pineal, que possui um amplo espectro de funções fisiopatológicas. Em cultura de células, assim como em sistemas *in vivo*, a melatonina demonstra capacidade antioxidante e atua como um agente imunoestimulador e citoprotetor (Schaffazick et al., 2005).

Para um rápido crescimento e diferenciação, o embrião bovino requer energia, esta por sua vez é encontrada principalmente na forma de ATP e NADPH, sendo ambos produzidos através da cadeia transportadora de elétrons situada nas mitocôndrias. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas como subproduto deste sistema de produção de energia. Uma vez que os níveis intracelulares de ROS são regulados pelo balanço entre enzimas antioxidantes e enzimas pró-oxidantes, qualquer alteração fisiológica pode acarretar em uma produção excessiva de ROS, o que causa danos ao DNA, indução da apoptose e peroxidação lipídica (Takahashi, 2012).

Através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase e a glutamato peroxidase, a melatonina atua na proteção do DNA nuclear e dos lipídios de membrana frente a danos oxidativos (peroxidação lipídica), e através da diminuição da atividade de enzimas pró-oxidantes, melhorando a capacidade de defesa antioxidante total do organismo (Reiter et al., 1997).

Geralmente, é esperado que, após a maturação *in vitro*, aproximadamente 90% dos oócitos atinjam a metáfase II; destes, 80% são fecundados e iniciam a clivagem, pelo menos até o estágio de duas a quatro células. No entanto, apenas 25 a 40% destes embriões alcançam o estágio de blastocisto (Bavister et al., 1992). Este fato mostra que o cultivo *in vitro* é o principal passo a determinar a eficiência do desenvolvimento *in vitro* de embriões, e que muito deve ser feito para a obtenção de melhores resultados (Galli et al., 2003).

Considerando que diversos sistemas de produção *in vitro* de embriões vêm tentando minimizar os efeitos tóxicos causados pela produção de ROS através do uso de antioxidantes, a melatonina pode ser utilizada como um importante protetor durante o período de cultivo *in vitro* do embrião (Papis et al., 2007)

Com isso, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da suplementação de melatonina no meio de cultivo sobre a produção de ROS durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos.

2. METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Ovários provenientes de abatedouro local, foram transportados em recipiente térmico até o laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, localizado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPel. Os complexos *cumulus* oócitos (CCOs) foram aspirados dos folículos ovarianos com tamanhos entre 2-8 mm de diâmetro. O conteúdo folicular foi aspirado com auxílio de seringa de 20 mL e agulha 40 x 12 mm e depositado em tubo cônico de 50mL. O líquido folicular foi filtrado e lavado com PBS (*phosphate buffer saline*) em filtro coletor de embriões (Nutricell, Campinas-SP) e o depósito celular formado foi colocado em placa de petri para procura dos CCOs em lupa estereomicroscópica. Posteriormente, os oócitos foram avaliados quanto ao número de camadas e grau de compactação das células do *cumulus*, homogeneidade do citoplasma e integridade da zona pelúcida, sendo selecionados apenas os oócitos considerados viáveis (Papis et al., 2007). Grupos de 15 até 20 CCOs foram maturados em estufa a 38,5°C, com 5% de CO₂, durante 22 a 24 h.

Para a fertilização *in vitro* (FIV), as palhetas de sêmen foram descongeladas por 30 seg em banho-maria a 35°C e o sêmen passou por duas centrifugações de 5 min a 700 rpm, sendo a primeira em meio TL Sêmen (TALP - In Vitro Brasil, Mogi Mirim/SP, Brasil) e a segunda em meio FIV gotas (TALP Fertilization - In Vitro Brasil, Mogi Mirim/SP, Brasil) suplementado com 10µg/mL de heparina e 160µg/mL de PHE (solução de penicilamina, epinefrina e hipotaurina). Após a obtenção do *pellet*, avaliou-se a motilidade espermática e ajustou-se a concentração de células para 25x10⁶ espermatozoides móveis/mL. Cada gota contendo os CCOs recebeu 4µL de sêmen (concentração final 1x10⁵ espermatozoides por gota).

Após a FIV, os possíveis zigotos foram transferidos para o meio SOF (*synthetic oviduct fluid*) onde permaneceram nas placas de cultivo, acondicionados em estufa a 38,5°C, com 5% de CO₂, durante sete dias, até atingirem o estágio de desenvolvimento de blastocisto.

A suplementação com a melatonina foi realizada na concentração final de 10⁻⁹M em meio SOF, sendo realizada no primeiro dia de cultivo (D1). De acordo com o tratamento, as estruturas cultivadas foram distribuídas igualmente entre os dois grupos: MEL (melatonina) e CTRL (controle).

No sétimo dia de cultivo *in vitro* (D7), foram avaliadas a formação/atividade intracelular de ROS nos blastocistos através da técnica de imunofluorescência, utilizando 2,7'-diclorofluoresceína (DCF) (Sigma Aldrich - D6883). Os dados obtidos foram analisados no software Cell[^]F (Olympus Soft Imagin Solutions, GmbH), o qual gerou dados numéricos de intensidade de fluorescência, em *pixels*. Os dados foram comparados entre os grupos através do teste *t*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da técnica de imunofluorescência, com DCF, pôde-se observar a formação/atividade intracelular de ROS nos blastocistos de todos os grupos (Figura 1). O nível de fluorescência emitido está diretamente relacionado à quantidade de ROS produzidas pela célula.

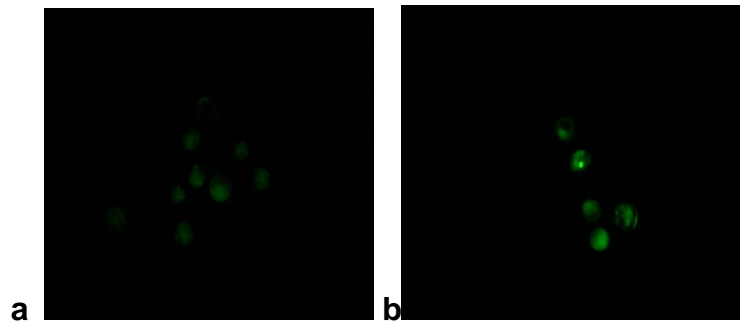


Figura 1. Imagens da formação intracelular de ROS (espécies reativas de oxigênio) nos blastocistos dos grupos: MEL (a) e CTRL (b), obtidas através da utilização de 2,7'- diclorofluoresceína.

Foi observada uma menor intensidade de fluorescência ($P < 0.05$) no grupo de blastocistos cultivados em meio SOF suplementado com melatonina (Figura 2).

O nível de fluorescência está diretamente relacionado à quantidade de ROS produzidas pela célula e, portanto o grupo suplementado com melatonina visualmente apresentou menor formação/atividade intracelular de ROS do que o grupo controle. Relação em igual sentido foi encontrada no estudo de Choi et al. (2010), onde foram observados menores níveis intracelulares de ROS nos blastocistos cultivados em meio suplementado com melatonina, comprovando a função antioxidante deste fármaco.

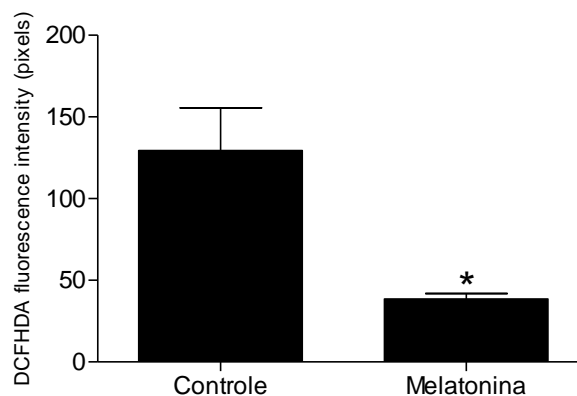


Figura 2. Intensidade de fluorescência em *pixels*, obtidos através do software Cell[^]F em blastocistos produzidos nos grupos controle e melatonina. O asterisco indica diferença significativa ($P < 0.05$) no teste *t*.

4. CONCLUSÃO

Embora o estudo esteja em sua fase inicial, pôde-se observar que a melatonina, quando acrescida ao meio de cultivo embrionário, foi capaz de reduzir a produção de ROS nos blastocistos produzidos. Pretende-se dar continuidade ao estudo, realizando novas repetições, a fim de confirmar a ação antioxidante que a melatonina exerce sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos e verificar se é possível incrementar sua atividade através da nano formulação.

5. REFERÊNCIAS

- Bavister, B.D.; Rose-Hellekant, T.A.; Pinyopummintr, T. Development of *in vitro* mature/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v.37, p.127-146, 1992.
- Choi,J.; Park,S.; Lee,E.; Kim,J.; Jeong,Y.; Lee,J.; Park,S.; Kim,H.; Hossein,M.S.; Jeong,Y.; Kim,S.; Hyun,S.; Hwang,W.. Anti-Apoptotic Effect of Melatonin on Preimplantation Development of Porcine Parthenogenetic Embryos. **Molecular Reproduction and Reproduction**. v.75, p.1127–1135, 2008.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.
- Papis, K.; Poleszezuk, O.; Wenta-Muchalska, E.; Modliunski, J.. Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. **J Pineal Res**. v. 43, p. 321-326, 2007.
- Reiter,R.; Tang,L.; Garcia,J.J.; Munhoz-Hoyos,A. . Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. **Life Science**. v. 60, p.2255-2271, 1997
- Schaffazicks,S.R.; Pohlmann,A.R.; De Cordova,C.A.; Creczynski-Pasa,T.B.; Guterres,S.S. .Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **Int. J. Pharm**. v. 289, p. 209-213, 2005
- 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.