

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA NANOENCAPSULADA SOBRE A TAXA DE APOPTOSE EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

**WILLIAM BORGES DOMINGUES¹; ELIZA ROSSI KOMNINOU¹; MARIANA
 HÄRTER REMIÃO¹; CAROLINE GOMES LUCAS¹; VINICIUS FARIAS CAMPOS¹;
 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
williamwwe@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A melatonina é um neuro-hormônio derivado da serotonina, sintetizado principalmente na glândula pineal, que possui um amplo espectro de funções fisiopatológicas, na qual se destaca a regulação do processo de apoptose (CHOI et al., 2008).

Considerando que diversos sistemas de produção *in vitro* de embriões vêm tentando aumentar o número e a qualidade de blastocistos produzidos, os efeitos de diversas substâncias antioxidantes na suplementação de meios de cultivo têm sido estudados. Neste contexto, a melatonina vem se destacando por apresentar um importante papel citoprotetor durante diferentes estágios de desenvolvimento de embriões em diferentes espécies (PAPIS et al., 2007; WANG et al., 2013).

A principal limitação do uso de melatonina está baseada em sua meia-vida biológica curta (HARDELAND, 2006). Estratégias biotecnológicas têm sido propostas através da administração de melatonina formulada em nanocápsulas a fim de superar esta limitação. O nanoencapsulamento de substâncias ativas confere proteção contra a degradação, e ainda, promove a redução da toxicidade e o aumento da eficácia da droga (ZHAO et al., 2011).

A qualidade embrionária é definida como a capacidade de um embrião de continuar seu desenvolvimento, a fim de estabelecer prenhez e produzir um indivíduo. Uma vez que a qualidade não pode ser baseada somente na morfologia (HAVLICEK et al., 2004; LONERGAN et al., 2003), outros parâmetros, tais como o número total de células e a frequência de apoptose são utilizados. O ensaio de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay) avalia a estrutura da cromatina e a integridade do DNA das células, detectando com confiabilidade fragmentações no DNA. Quando combinado com a técnica de coloração nuclear, este ensaio permite a avaliação da frequência de apoptose e a contagem do número total de células do embrião.

Este estudo teve o objetivo de comparar os efeitos da adição de melatonina livre e nanoencapsulada, no meio de cultivo de embriões bovinos, sobre a qualidade embrionária, usando como parâmetros o número total de células e a frequência de apoptose nos embriões.

2. METODOLOGIA

Os ovários utilizados para a obtenção dos CCOs (complexos cumulus oócitos) foram coletados de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico localizado na cidade de Pelotas/RS. Os folículos com tamanhos entre 2 a 8 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de seringa acoplada à uma agulha. O líquido folicular contendo os COCs foi depositado em tubo falcon de 50mL, para em seguida ser filtrado e lavado com PBS (Phosphate Buffer Saline) em filtro coletor de embriões

(Nutricell, Campinas-SP). 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 a 20 CCOs foram maturados em estufa a 38,5°C, com 5% de CO₂, durante 24h.

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 em meio TL Sêmen e FIV gotas (*In Vitro* Brasil, SP, Brasil). Após a obtenção do pellet, avaliou-se a motilidade espermática e ajustou-se a concentração de células. 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 – *In Vitro* Brasil, SP, Brasil) 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 no meio de cultivo (SOF), nas concentrações de 10⁻⁶, 10⁻⁹ e 10⁻¹² M, tanto para sua forma livre, quanto nanoencapsulada em 2 diferentes formulações, foi realizada no primeiro dia de cultivo (D1).

De acordo com o tratamento, as estruturas cultivadas foram distribuídas igualmente entre os grupos: Mel (melatonina livre), Mel-NC1 (melatonina em nanocápsulas de formulação 1), Mel-NC2 (melatonina em nanocápsulas de formulação 2), NC1 (nanocápsulas 1 vazias), NC2 (nanocápsulas 2 vazias) e Controle.

No sétimo dia de cultivo (D7), o número de células e a taxa de apoptose nos blastocistos foram avaliadas através da combinação do ensaio de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein - Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e do uso de corante fluorescente genômico Hoechst 333342 (Sigma-Aldrich, USA), seguindo as instruções dos fabricantes.

Para o ensaio de TUNEL, os embriões foram fixados durante 1 hora em 4% paraformaldeído em PBS. Logo após, foram lavados em gotas de PBS-PVP (Polivinilpirrolidona) e então permeabilizados com 0,5% Triton X-100 durante 30 minutos. A seguir, foram incubados com nucleotídeos marcados (d-UTP) com corante fluorescente verde (FITC), os quais são incorporados nos locais de fragmentação do DNA.

Como controle positivo, embriões foram tratados com DNase (Invitrogen) antes de serem incubados com os d-UTPs; e como controle negativo, outros não passaram pela etapa de incubação com os d-UTPs.

Após o ensaio de TUNEL, todos os embriões foram transferidos para gotas contendo 10 mg/ml de Hoechst 333342, onde permaneceram durante 30 min no escuro, e, então montados em lâminas cobertas por lamínulas.

As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio invertido de fluorescência (Olympus, Japão), onde todos os núcleos emitem a fluorescência azul e somente as células com DNA fragmentado emitem fluorescência verde. As imagens obtidas foram analisadas usando o software CellAF (New York, USA).

A taxa de apoptose foi calculada através da divisão do número de células apoptóticas pelo total de células. O número total de células e a taxa de apoptose para cada grupo foram analisadas por Two-way ANOVA seguido por um teste de Tukey para comparações múltiplas, sendo considerados significantes valores de $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do uso do corante Hoechst 33342, foi possível a contagem do número total de células nos blastocistos de todos os grupos (Fig.1).

Nos grupos que receberam a suplementação de melatonina livre (Mel), melatonina nanoencapsulada 2 (Mel-NC2) e nanocápsulas vazias 2 (NC2), os blastocistos apresentaram maior número de células ($p < 0,05$) quando comparados aos demais grupos.

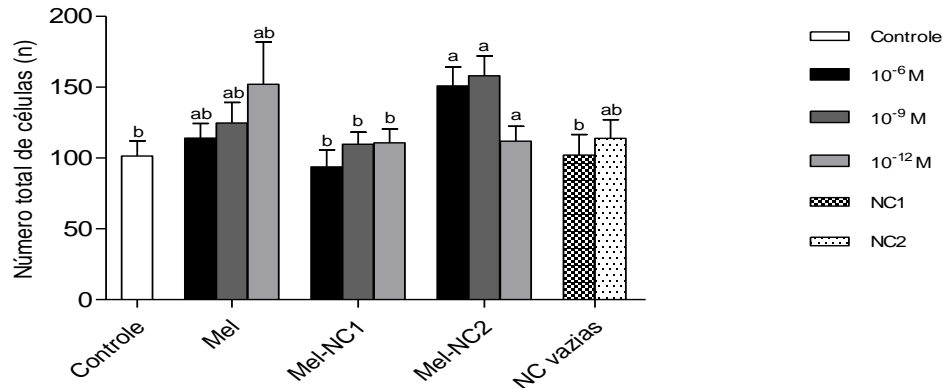


Figura 1. Número total de células dos blastocistos produzidos nos grupos Controle, Mel, Mel-NC1, Mel-NC2, NC1 e NC2.

Ao passo que, através do ensaio de TUNEL, o número de células com DNA fragmentado pôde ser contado e posteriormente a taxa de células apoptóticas obtida para cada grupo (Fig. 2).

Em conformidade com o resultado acima, o grupo de blastocistos que recebeu a suplementação de melatonina nanoencapsulada 2 (Mel-NC2), além de apresentar um maior número de células, exibiu uma diminuição na taxa de células apoptóticas ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos.

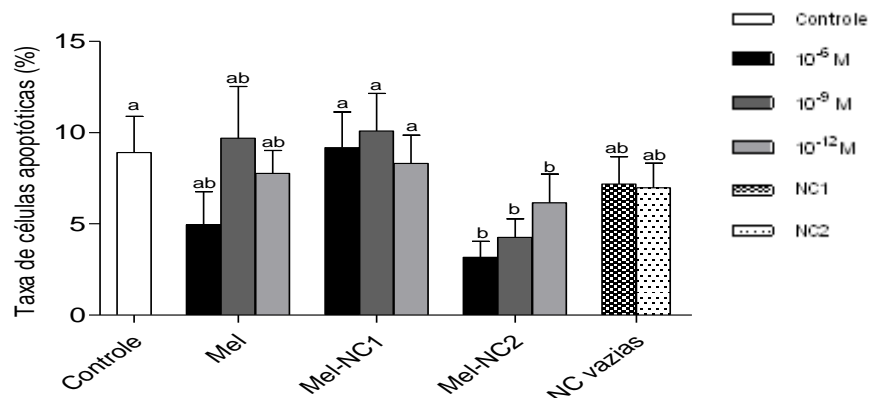


Figura 2. Taxa de células apoptóticas dos blastocistos produzidos nos grupos Controle, Mel, Mel-NC1, Mel-NC2, NC1 e NC2.

Estudos anteriores já constataram a capacidade anti-apoptótica da melatonina em sistemas de produção *in vitro* em diversas espécies, como por exemplo, em suínos (CHOI et al., 2008) e camundongos (WANG et al., 2013). No entanto, é a primeira vez que a melatonina é utilizada durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos, formulada em nanocápsulas, e com capacidade de diminuir a frequência de células apoptóticas.

4. CONCLUSÕES

Os blastocistos cultivados em meio suplementado com melatonina nanoencapsulada na formulação 2 (Mel-NC2) apresentaram maior número de células e menor taxa de apoptose em relação ao demais grupos.

Estes resultados mostram que, com o aumento do efeito anti-apoptótico da melatonina, o uso da nanotecnologia torna-se uma ferramenta adicional para o desenvolvimento de novos produtos capazes de potencializar seu efeito biológico e de melhorar os sistemas de produção *in vitro* de embriões.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.; JEONG, 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.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. Melatonin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.38, n.3, p.313-316, 2006.

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. **Veterinary Medicine**. v.50, n4, p.149-157, 2005.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J.; NEMCOVA, L.; MBAYE, A. M.; KINGSTON, M.; WADE, M.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**. v.126, p.337–346, 2003.

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.

SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; RODRIGUEZ, C.; TAN, D. X.; LOPEZ-BURILLO, S.; REITER, R. J. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.60, p. 1407–1426, 2003.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; TAN, D.; REITER, R. J.; LIU, 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. Redox-responsive nanocapsules for intracellular protein delivery. **Biomaterials**. v.32, n.22, p. 5223–5230, 2011.