

EFEITO DA MELATONINA SOBRE A VIABILIDADE DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO*

NATHANIELE NEBEL BARTHER¹; MARIANA HÄRTER REMIÃO^{1,2}; CAROLINE GOMES LUCAS^{1,2}; WILLIAM BORGES DOMINGUES¹; MARIA EDUARDA BICCA DODE¹; VINICIUS FARIAS CAMPOS^{1,2}

¹Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil
nielenacth@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil
fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido utilizada como base para diferentes estudos relacionados à biotecnologia da reprodução, tanto em animais como em humanos (SYLVESTRE, et al., 2013). Devido às semelhanças fisiológicas embrionárias entre bovinos e humanos e a facilidade de acesso às peças de abatedouro (ovários), a PIVE de bovinos tem sido uma excelente alternativa para elucidar problemas remanescentes na pesquisa de produção *in vitro* de embriões humanos, bem como entender os mecanismos celulares envolvidos na biologia do embrião (GOOVAERTS et al., 2012).

No entanto, dificuldades relativas à compreensão das necessidades nutricionais e as limitações impostas pelas características físico-químicas dos meios utilizados para cultivar esses embriões, consistem em barreiras a serem superadas (Mingoti et al., 2009). A busca pelo maior aproveitamento dos gametas femininos faz com que as pesquisas no âmbito das biotecnologias reprodutivas procurem desenvolver sistemas cada vez mais eficientes visando uma maior produção de embriões viáveis (VAN DE VELDE et al., 1999). Assim, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de propiciar condições de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* mais adequados. Além disso, já é bem consolidado na literatura, que o cultivo *in vitro* de gametas e embriões predispõe as células a um aumento do estresse oxidativo (CHANDRA et al., 2000). Por isso, vários grupos de pesquisa vêm adicionando à formulação de seus meios, moléculas com conhecida ação antioxidante. Dentre estas moléculas, encontra-se a melatonina.

A melatonina (N-acetyl-5-methoxytryptamine) é um neuro-hormônio derivado da serotonina, sintetizado principalmente na glândula pineal, que possui um amplo espectro de funções fisiopatológicas e de regulação da apoptose (EL-RAEY et al., 2011). Nos últimos anos esta molécula tem recebido destaque 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, tanto em testes *in vivo* como *in vitro* (ANISIMOV et al., 2006; LUCHETTI et al., 2010)

Na PIVE, foi demonstrado que a suplementação do meio de maturação *in vitro* de embriões bovinos com melatonina melhora as taxas de maturação nuclear e acelera o processo de maturação do oócito (TAKADA et al., 2012). Além disso, foi observada uma redução significativa do nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (EL-RAEY et al., 2011) e aumento da taxa de fertilização (TAMURA et al., 2008) em oócitos tratados com melatonina. Quando adicionada no cultivo de

embriões, foi relatado um aumento nas taxas de clivagem (RODRIGUEZ-OSORIO et al., 2007), da qualidade de blastocisto, e da taxa de embriões eclodidos (F. WANG et al., 2014).

Sabendo que os meios utilizados na PIVE influenciam diretamente no desenvolvimento embrionário e fetal, e que cultivos *in vitro* são muito vulneráveis ao estresse oxidativo, esse trabalho visa a suplementação do meio de maturação *in vitro* com melatonina, a fim de analisar viabilidade de membrana dos oócitos de cada tratamento.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta e Classificação de oócitos

Ovários provenientes de abatedouro bovino localizado em Pelotas, foram coletados e transportados até o laboratório de Embriologia Molecular (UFPEL) em recipiente térmico. Ao chegar, eles foram lavados com solução salina 0,9% estéril, e após, os folículos antrais com tamanho entre 2-8mm foram puncionados com agulhas 40x1.2 e seringas de 20ml. O líquido folicular aspirado foi colocado em um tubo cônico 50ml mantido a 35°C. O líquido puncionado foi lavado com PBS (phosphate buffer saline) e filtrado com ajuda de filtro coletor de embriões, e posteriormente colocado em placa de petri para ser feita a procura em lupa estereomicroscópica. Oócitos classificados em Grau I e Grau II foram selecionados para seguir no processo.

2.2 Maturação *in vitro*

Os oócitos selecionados foram incubados em meio MIV [meio de cultivo de tecidos 199 (TCM 199) Hank's (Sigma® - Aldrich, Alemanha), FSH (100ng/mL), LH (100 ng/mL) e 17b-estradiol (1mg/mL), e sulfato de amicacina] suplementado ou não com melatonina nas concentrações 10^{-6} M, 10^{-9} M, 10^{-12} M. Os oócitos bovinos foram incubados durante 24h à temperatura de 38,5°C com atmosfera de 5% CO₂ (v/v) para completa maturação nuclear e citoplasmática.

2.3 Avaliação da viabilidade de membrana

Para avaliar a viabilidade de membrana dos oócitos, foi utilizado o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (Invitrogen) para células de mamíferos. Os oócitos maturados na presença ou não de melatonina a 10^{-6} M, 10^{-9} M e 10^{-12} M foram desnudados em gotas de hialuronidase (160U/mL) com ajuda de sucessivas pipetagens. Os oócitos foram lavados em gotas de PBS 3 vezes e colocados em gota contendo corantes do kit, seguindo instruções do fabricante. Passados 30 minutos em temperatura ambiente, os gametas foram lavados em PBS e visualizados em microscópio de fluorescência (~495 nm), e foram capturadas imagens para a contagem do número de oócitos viáveis e inviáveis. Os que estiverem viáveis devem apresentar uma coloração esverdeada, os inviáveis apresentam uma coloração avermelhada, indicando que houve dano de membrana.

2.4 Análise dos dados

As taxas de viabilidade de membrana foram comparadas entre os tratamentos e controle, através do teste de qui-quadrado. Diferenças significantes foram consideradas em $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da suplementação com melatonina na viabilidade e toxicidade celular durante a maturação *in vitro* é mostrada na Tabela 1. Comparando com o grupo controle, não foi observada diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$). Portanto, o tratamento com a melatonina não afeta os oócitos negativamente, demonstrando que o tratamento não é tóxico a ponto de desestabilizar a membrana celular dos oócitos. A melatonina adicionada no meio de maturação *in vitro* de bovinos possui geralmente efeitos benéficos na PIVE. Takada et al. (2012) testaram a melatonina adicionada no meio MIV nas concentrações de 0 e 10^{-9} M, e encontrou uma diminuição do dano de DNA das células do cumulus quando a molécula estava presente, porém não teve diferença em relação à PIVE. El-Raey et al. (2011) testaram a melatonina na MIV de bovinos nas concentrações de 0, 10, 50 e 100ng/mL, onde as concentrações com melhores taxas de maturação e redução da produção de espécies reativas de oxigênio foram as de 10 e 50ng/mL. Porém, nenhum destes trabalhos testou quanto à viabilidade de membrana dos oócitos tratados, nos levando a concluir que novos testes devem ser realizados para que possa ser confirmado que a adição de melatonina no meio é benéfica para a produção *in vitro* de embriões.

Tabela 1. Taxas de viabilidade celular nos tratamentos com melatonina na MIV e no controle sem tratamento.

Tratamentos	Número de oócitos avaliados	Taxa de viabilidade celular(%)
Controle	47	100
Melatonina 10^{-6}	41	95,1
Melatonina 10^{-9}	51	100
Melatonina 10^{-12}	49	100

4. CONCLUSÕES

Os dados demonstram que a adição de melatonina no meio de maturação *in vitro* de bovinos não causa danos à membrana celular dos oócitos tratados. Porém, novos testes como a quantificação de espécies reativas de oxigênio, o nível de glutathione intracelular, o desenvolvimento embrionário, a quantidade de células por blastocisto e a expressão gênica de embriões devem ser realizadas para que possa ser avaliado se a adição da molécula durante a maturação traz algum tipo de benefício para a produção *in vitro* de embriões bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANCIOTO, KL, Vantini R, Garcia JM, Mingoti GZ. Influência das células do cumulus e do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, supl., p.114, 2004.

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

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.

CHANDRA, J. et al. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p.323-333, 2000.

EL-RAEY, M et al. 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.

GONÇALVES, P. B. D; VISINTIN, J. A; OLIVEIRA, M. A. L; MONTAGNER, M. M. AND COSTA, L. F. S. Produção in vitro de embriões. , P. B. D; Figueiredo, J. R. & Freitas, V. J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1ª ed., São Paulo: Gonçalves. p. 195- 196, 2002.

GOOVAERTS, IGF, Leroy JLMR, Langbeen A, Jorssen EPA, Bosmans E, Bols PEJ. 2012. Unravelling the needs of singly in vitro-produced bovine embryos: from cumulus cell co-culture to semi-defined, oil-free culture conditions. **Reproduction, Fertility and Development**. doi: 10.1071/RD11286, 2012.

ISHIZUKA, B et al. The Effect of Melatonin on in Vitro Fertilization and Embryo Development in Mice. **Journal of pineal research** . v.28, n.1, p. 48–51, 2000.

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.

Mingoti, G Z et al. The Effect of Interaction between Macromolecule Supplement and Oxygen Tension on Bovine Oocytes and Embryos Cultured in Vitro. **Zygote**, Cambridge, England, v.17, n.4, p.321–8, 2009.

RODRIGUEZ, N et al. Melatonin Increases Cleavage Rate of Porcine Preimplantation Embryos in Vitro. **Journal of pineal research** , v.43, n.3, p.283–288, 2007.

Sylvestre, E et al. Evolutionary Conservation of the Oocyte Transcriptome among Vertebrates and Its Implications for Understanding Human Reproductive Function. **Molecular human reproduction**, v.19, n.6, p.369–79, 2013.

TAKADA, L et al. Effect of Melatonin on DNA Damage of Bovine Cumulus Cells during in Vitro Maturation and on in Vitro Embryo Development. **Research in veterinary science**, v.92, n.1, p.124–127, 2012.

Tamura, H 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.280–7, 2008.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y. Q.; PEELMAN, L. J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAESENS, H.; KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v. 57, p. 1453-1465, 2002.

WANG, F; Tian, X et al. Beneficial Effects of Melatonin on in Vitro Bovine Embryonic Development Are Mediated by Melatonin Receptor 1. **Journal of pineal research**, v.56, n.3, p.333–342, 2014.