



## Melatonina e desenvolvimento embrionário

*Melatonin and embryonic development*

L.H.C.M. Mota<sup>1,3</sup>, F.J. Moraes Júnior<sup>2</sup>, I.O.T. Souza<sup>1</sup>, Y.N.T. Carvalho<sup>1</sup>, M.A. Castelo Branco<sup>1</sup>,  
J.A.T. Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: [lhcmmota@icloud.com](mailto:lhcmmota@icloud.com)

### Resumo

A melatonina é o principal hormônio sintetizado e secretado pela glândula pineal e desempenha uma função importante na regulação dos ciclos reprodutivos sazonais. O seu papel na reprodução concentra-se, sobretudo, em suas ações diretas no ovário. Ela também é conhecida como uma eliminadora de espécie reativa de oxigênio (ROS). Dessa forma, o estresse oxidativo é um dos fatores que prejudicam o desenvolvimento tanto *in vitro* quanto *in vivo* dos oócitos até a fase de blastocisto. Esta revisão aborda os diversos efeitos da melatonina sobre o desenvolvimento embrionário, assim como os mecanismos responsáveis pela diminuição do estresse oxidativo durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário.

**Palavras-chave:** ROS, antioxidante, oócito, blastocisto.

### Abstract

*Melatonin is the principal hormone synthesized and secreted by the pineal gland and plays an important role in the regulation of seasonal breeding cycles. Your role in reproduction is focused on its direct actions in the ovary and also be known as a scavenger of reactive oxygen species (ROS). Thus oxidative stress is one of the factors hindering the development in vitro and in vivo oocyte to the blastocyst stage. This review covers the various effects of melatonin on embryonic development, as well as the mechanisms responsible for the reduction of oxidative stress during oocyte maturation and embryo development.*

**Keywords:** antioxidant, blastocyst, oocyte, ROS.

### Introdução

A melatonina é o principal hormônio sintetizado e secretado pela glândula pineal e desempenha uma função importante no controle dos ritmos circadianos e na regulação dos ciclos reprodutivos sazonais (Takada et al., 2010). Seu papel na reprodução está concentrado em suas ações diretas no ovário. Sabe-se também que a melatonina é uma eliminadora de espécie reativa de oxigênio (ROS). Ela age como um potente antioxidante, evitando, assim, o estresse oxidativo durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário (Tsantarliotou et al., 2007).

Nos últimos anos, tem ocorrido um crescente interesse pela produção *in vitro* de embriões (PIV) na espécie bovina, e sua aplicação comercial tornou-se viável após o aprimoramento das técnicas de aspiração folicular *in vivo* e do cultivo de embriões *in vitro* (Viana, 2013). No entanto, alguns pontos ainda precisam ser melhorados para o aperfeiçoamento dessa técnica devido ao fato de a produção de embriões ser aquém do desejado e a qualidade destes ser inferior aos produzidos *in vivo* por programas de superovulação, resultando em uma grande variação de resultados obtidos.

A qualidade e a integridade do oócito podem tanto influenciar o sucesso da fertilização *in vitro* como prejudicar o seu desenvolvimento embrionário (Takada et al., 2010). Assim, o estresse oxidativo atua como sendo um dos fatores que prejudicam o desenvolvimento *in vitro* dos oócitos até a fase de blastocisto. Durante o processo de ovulação, são produzidas dentro dos folículos espécies reativas de oxigênio (ROS), que são formadas continuamente como consequência de reações bioquímicas oxidativas e de fatores externos (Papis et al., 2007). No entanto, uma quantidade excessiva de ROS causa estresse oxidativo e pode danificar o oócito e as células da granulosa. Por outro lado, os sistemas de defesa antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona (GSH), responsáveis pela defesa natural e presentes dentro dos folículos, encarregam-se do equilíbrio entre as ROS e os antioxidantes (Tamura et al., 2012).

Dessa forma, a melatonina é conhecida por ser uma eliminadora de espécie reativa de oxigênio (ROS) e agirá como um potente antioxidante, evitando o estresse oxidativo durante o desenvolvimento embrionário (Tsantarliotou et al., 2007). Ela irá atuar no sentido de aliviar o envelhecimento do oócito produzido *in vitro*, provocado pelo estresse oxidativo, retardar o início da apoptose e evitar a fragmentação celular (Lord et al.,



2013). Alguns efeitos da melatonina são mediados por receptores de membrana específicos, mas muitos deles parecem basear-se no seu potencial como um captador de radicais livres direto, em um processo que não requer nenhum receptor (Tamura et al., 2012). Diante disso, a presente revisão aborda os diversos efeitos da melatonina sobre o desenvolvimento embrionário, assim como os mecanismos responsáveis pela diminuição do estresse oxidativo durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário.

### Ovulação e as espécies reativas de oxigênio (ROS)

Grandes quantidades de radicais livres são produzidas dentro do folículo não só por macrófagos e neutrófilos, mas também pelas células endoteliais dos capilares. As ROS produzidas dentro do folículo parecem ter um papel essencial na ruptura folicular e também como segundas mensageiras na modulação da expressão de genes que regulam processos fisiológicos na maturação do oócito (Tamura et al., 2012). No entanto, o excesso de ROS produzidas pode ser responsável por causar o estresse oxidativo, danificando as moléculas e estruturas dos oócitos bem como as células da granulosa no folículo. As ROS devem ser continuamente desativadas, para manter apenas a pequena quantidade necessária à função celular normal (Fatehi et al., 2005). Componentes foliculares, células do *cumulus* e fluido folicular podem proteger os oócitos contra os efeitos prejudiciais das ROS. Também é conhecido que as enzimas antioxidantes endógenas e os antioxidantes não enzimáticos estão presentes nos folículos e são responsáveis por combater ou reduzir as ROS. A falha ou deficiência dessas defesas podem resultar na acumulação de ROS e o desenvolvimento do estresse oxidativo, causando danos aos oócitos (Guerin et al., 2001).

As ROS, como radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), são conhecidas por serem prejudiciais para os oócitos. Elas causam degradação dos lipídeos da membrana celular, destruição do DNA, indução de bloco de duas células, apoptose e inibição da fertilização (Tamura et al., 2012). Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo excessivo pode ser uma causa para a má qualidade dos oócitos e que o equilíbrio entre as ROS e os antioxidantes dentro do folículo pode ser crítico para a maturação oocitária.

### Melatonina

A melatonina é um produto da secreção da glândula pineal, conhecida por modular a função ovariana em mamíferos e também conhecida por ser uma eliminadora de espécie reativa de oxigênio (ROS), agindo como um potente antioxidante evitando o estresse oxidativo durante o desenvolvimento embrionário (Tsantarliotou et al., 2007). A melatonina é o principal hormônio sintetizado e secretado pela glândula pineal e desempenha uma função importante no controle dos ritmos circadianos e na regulação dos ciclos reprodutivos sazonais. É sintetizada a partir do aminoácido triptofano, o qual é levado dos reservatórios cerebrais e convertido em serotonina. A serotonina é acetilada a N-acetilserotonina, que, por sua vez, é O-metilada, resultando na melatonina. As enzimas responsáveis por essas duas reações são a arilaquilamina N-acetiltransferase e a indoxi hidro-O-metiltransferase (Takada et al., 2010).

Com características lipofílicas e hidrofílicas, a melatonina está presente no fluido cérebro-espinhal, na saliva, no líquido amniótico, no plasma seminal e no fluido folicular (Rieter et al., 2001). Além da glândula pineal, a melatonina pode ser produzida também por outros tecidos, como a retina e plaquetas (Papis et al., 2007).

O papel da melatonina na reprodução concentra-se em suas ações diretas no ovário. Em alguns mamíferos, a reprodução se concentra em uma determinada época do ano, de modo que as condições ambientais sejam propícias à sobrevivência da espécie. De acordo com a duração da gestação, a ativação reprodutiva pode ocorrer durante a primavera e o verão (equinos) ou durante o outono e o inverno (caprinos e ovinos). Em ambos os casos, existem evidências de que a glândula pineal, mediante a secreção da melatonina, é responsável pela transmissão da informação da duração do dia ao eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Badura e Goldman, 1992).

De modo geral, a melatonina exerce efeito inibitório no número de neurônios secretores de GnRH em animais que se reproduzem nas estações do ano com dias longos, enquanto nas espécies que se reproduzem nas estações de dias curtos, a melatonina exerce efeitos estimulatórios sobre a produção de GnRH, acionando o início da estação reprodutiva. Em espécies não estacionais, a melatonina exerce uma ação antigonadotrófica (Takada et al., 2010). Sabe-se também que a melatonina é uma eliminadora de espécie reativa de oxigênio (ROS). Ela age como um potente antioxidante, evitando, assim, o estresse oxidativo durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário (Tsantarliotou et al., 2007). A melatonina pode efetivamente aliviar o envelhecimento do oócito produzido *in vitro*, provocado pelo estresse oxidativo, retardando o início da apoptose e evitando a fragmentação celular (Lord et al., 2013).

#### *Melatonina e seu efeito antioxidante*

Embora a melatonina exerça efeitos por meio de seus receptores, ela também pode atuar como um



poderoso removedor de radical livre direto. Em 1993, a melatonina foi descoberta para funcionar como um eliminador de radicais livres direto, demonstrando seu efeito para desintoxicar o radical hidroxila (OH-) altamente reativo (Poeggeler et al., 1993). Desde então, vários relatórios confirmaram a capacidade da melatonina para reduzir o estresse oxidativo. Dessa forma, a melatonina funciona de várias maneiras para reduzir os níveis do estresse oxidativo.

Demonstrou-se que a melatonina tem a capacidade de reduzir os danos oxidativos em todas as variedades de macromoléculas que produzem radicais livres, como radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete, óxido nítrico, ânion peroxinitrito, lipídeos e radicais peroxila, e também pode reparar algumas moléculas que haviam sido oxidadas (Tamura et al., 2012). A melatonina pode passar facilmente através das membranas celulares devido às suas propriedades de hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade, e demonstrou-se que elevados níveis de melatonina existem não só no interior do citoplasma, mas também na região do núcleo (Tamura et al., 2012). As propriedades antioxidantes da melatonina como um protetor de células tem sido extensivamente estudadas, e relatos demonstram que a capacidade da melatonina para desintoxicar o radical hidroxila (OH-) foi superior aos antioxidantes bem mais conhecidos, como a vitamina C, a vitamina E e seus análogos (Rieter et al., 2001).

Tan et al. (1993) documentaram, em um sistema *in vitro*, a habilidade da melatonina em neutralizar radicais hidroxila altamente tóxicos de forma mais eficiente do que a glutatona reduzida (um antioxidante endógeno) e melhor do que o manitol (um antioxidante encontrado em plantas). Além disso, o radical peroxila, que é produzido durante a oxidação de ácidos poli-insaturados, é sequestrado pela melatonina de um modo mais eficiente do que a vitamina E e de maneira duas vezes mais eficiente que o trolox<sup>®</sup> e análogos sintéticos da vitamina E (Pieri et al., 1994). A melatonina também é capaz de reduzir quantidades excessivas de óxido nítrico, conhecido por causar mudanças citotóxicas nas células (Noda et al., 1999). Ao contrário da maioria dos antioxidantes, a melatonina está desprovida de atividade peroxidativa e de todos os intermediários gerados pela interação com as espécies reativas de oxigênio (Rao e Gangadharan, 2008).

Diversos trabalhos também relatam o papel de várias enzimas antioxidantes presentes nos folículos, como, por exemplo, SOD, glutatona-peroxidase (GPx), catalase e os antioxidantes não enzimáticos, tais como a vitamina E, a vitamina C, a glutatona, o ácido úrico e a albumina (Agarwal et al., 2005; Goud et al., 2008). Além disso, relatam reduzidos níveis de enzimas antioxidantes, como a GPx, nos fluidos foliculares de mulheres com infertilidade inexplicada (Paszkowski et al., 1995).

#### *Melatonina e seu efeito na qualidade embrionária*

A melatonina tem um papel importante no metabolismo lipídico, na gravidez, no período do parto e na função do corpo lúteo (CL; Tamura et al., 1998). Altos níveis de melatonina são encontrados no fluido folicular humano, em concentrações pré-ovulatórias mais elevadas do que nos níveis séricos no plasma. Sabe-se ainda que as concentrações de melatonina no fluido folicular aumentam de acordo com o crescimento folicular (Nakamura et al., 2003).

Foi observado que as concentrações de melatonina no ovário foram maiores no proestro, quando os ovários apresentam folículos pré-ovulatórios durante o ciclo estral. Também se verificou que as concentrações de melatonina no fluido folicular tanto em protocolos de superovulação *in vivo* como em aspiração folicular *in vitro* foram significativamente maiores em folículos pré-ovulatórios de vacas (>18mm) do que em folículos pequenos (10-12mm) e médios (15-16mm) (Nakamura et al., 2003; Tamura et al., 2012).

Recentemente foi relatado um efeito direto das ROS e da melatonina sobre a maturação de oócitos *in vitro*. Esses resultados indicaram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) inibe a maturação de oócitos por meio da produção de ROS, mas a melatonina mostrou atividade protetora contra o estresse oxidativo causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tamura et al., 2008).

Kang et al. (2009), ao investigarem os efeitos da melatonina sobre a maturação *in vitro* de oócitos suínos, identificaram maior proporção de oócitos com extrusão do primeiro corpúsculo em oócitos tratados com melatonina (10ng/mL), os quais tiveram níveis significativamente mais baixos de ROS do que o controle.

A capacidade da melatonina para promover o desenvolvimento de embriões em diferentes espécies foi observada, quando oócitos de camundongos inseminados foram cultivados em meio com melatonina (10<sup>-8</sup> e 10<sup>-4</sup> M), e foi observado aumento das taxas de fertilização e de blastocisto (Ishizuka et al., 2000). Suplementação com melatonina (10<sup>-9</sup> M) teve um efeito positivo sobre as taxas de fertilização de embriões suínos. Embora as taxas de blastocisto não tenham sido aumentadas pela melatonina, o número de células de blastocistos no grupo suplementado com melatonina foi significativamente mais elevado do que no grupo controle (Tamura et al., 2012). Da mesma forma, quando oócitos aspirados de folículos de suínos foram incubados em meio com melatonina (10<sup>-7</sup> M), a taxa de fertilização, a taxa de blastocistos e o número de células de blastocisto foram significativamente mais elevados do que no controle (Shi et al., 2009).

O efeito da melatonina no desenvolvimento de embriões parece ser, pelo menos parcialmente, provocado pela sua ação como um antioxidante. Papis et al. (2007) demonstraram que os efeitos benéficos da melatonina no desenvolvimento embrionário bovino não foram observados em um ambiente de baixo teor de



oxigênio, mas sim em um ambiente com elevada tensão de oxigênio, em que os radicais livres são produzidos facilmente. Recentemente, confirmou-se o benefício do tratamento com melatonina para as mulheres que se submetem a programas de FIV e TE. Quando as mulheres foram tratadas com 3mg de melatonina por dia desde o dia cinco do ciclo menstrual anterior até o dia da aspiração dos oócitos, a porcentagem de embriões de boa qualidade no dia 2 após a inseminação foi significativamente superior em comparação com o controle (Papis et al., 2007). Esses dados sugerem que a melatonina pode estar envolvida na maturação de oócitos e no desenvolvimento embrionário.

### Considerações finais

Conforme demonstrado, a descoberta da melatonina como um eliminador de radicais livres direto ampliou a compreensão de suas múltiplas funções fisiológicas. Recentemente, as pesquisas têm demonstrado os efeitos antioxidantes da melatonina no folículo, especialmente durante o processo de ovulação, confirmando a diminuição na formação de radicais livres durante a maturação oocitária e no decorrer do desenvolvimento embrionário. A diminuição da produção de ROS, dentro do folículo ou mesmo durante o desenvolvimento embrionário, reduz o estresse oxidativo, otimizando o processo de produção *in vitro* de embriões. No entanto, necessita-se de mais estudos para que a melatonina seja mais bem utilizada comercialmente no processo de produção *in vitro* de embriões, melhorando os índices de desenvolvimento embrionário em níveis compatíveis aos produzidos *in vivo*.

### Referências

- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK.** Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, v.3, p.28, 2005.
- Badura, LL, Goldman, BD.** Central sites mediating reproductive responses to melatonin in juvenile male Siberian hamsters. *Brain Res*, v.598, p.98-106, 1992.
- Fatehi AN, Roelen BA, Colenbrander B, Schoevers EJ, Gadella BM, Beverst MM, Van Den Hurk R.** Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote*, v.13, p.177-185, 2005.
- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Gonik B, Abu-Soud HM.** Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, v.44, p.1295-1304, 2008.
- Guerin PEL, Mouatassim S, Menezo Y.** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, v.7, p.175-189, 2001.
- Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, Amemiya A, Itoh MH.** The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. *J Pineal Res*, v.28, p.48-51, 2000.
- Kang JT, Koo OJ, Kwon DK, Park HJ, Jang G, Kang SK, Lee BC.** Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *J Pineal Res*, v.46, p.22-28, 2009.
- Lord T, Nixon B, Jones KT, Aitken RJ.** Melatonin prevents post-ovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization *in vitro*. *Biol Reprod*, v.30, p.67-88, 2013.
- Nakamura Y, Tamura H, Takayama H, Kato H.** Increased endogenous level of melatonin in pre-ovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril*, v.80, p.1012-1016, 2003.
- Noda Y, Mori A, Liburdy R, Packer L.** Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. *J Pineal Res*, v.27, p.159-163, 1999.
- Papis K, Poleszczuk O, Wenta-Muchalska E, Modlinski JA.** A melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. *J Pineal Res*, v.43, p.321-236, 2007.
- Paszowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D.** Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta*, v.236, p.173-180, 1995.
- Pieri C, Marra M, Monari R, Recchioni R, Marcheselli F.** Melatonin: A peroxy radical scavenger more potent than vitamin E. *Life Sci*, v.55, p.271-276, 1994.
- Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC.** Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res*, v.14, p.151-168, 1993.
- Rao MV, Gangadharan B.** Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa *in vitro*. *Toxicol In Vitro*, v.22, p.935-942, 2008.
- Rieter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W.** Biochemical reactivity of melatonin with active oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys*, v.34, p.237-256, 2001.
- Shi JM, Tian XZ, Zhou GB, Wang L, Gao C, Zhu SE, Zeng SM, Tian JH, Liu GS.** Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves *in vitro* maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *J Pineal Res*, v.47, p.318-323, 2009.
- Takada L, Martins-Junior A, Mingoti GZ, Baleiro JCC, Coelho LA.** Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates and DNA damage of bovinos embryos. *Sci Agric*, v.67,



p.393-398, 2010.

**Tamura H, Nakamura Y, Takiguchi SS, Kashida-Yamagata Y, Sugino N, Kato H.** Pinealectomy does not affect melatonin implantation increased prolactin or luteal function in pseudopregnant rats. *J Endocrinol*, v.45, p.377-383, 1998.

**Tamura H, Takasaki A, Miwa IK, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K.** Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*, v.44, p.280-287, 2008.

**Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N.** The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J Ovarian Res*, v.5, p.1757-2215, 2012.

**Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC.** Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine*, v.1, p.57-60, 1993.

**Tsantarliotou MP, Attanasio L, De Rosa A, Boccia L, Pellerano G, Gasparrini B.** The effect of melatonin on bovine in vitro embryo development. *Ital J Anim Sci*, v.6, p.488-489, 2007.

**Viana JHM.** Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O embrião*, ed. 51, 2013 (Boletim Técnico). Disponível em: <http://www.sbte.org.br>. Acesso em: 23 set. 2013.

---