

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

MURILO FARIAS RODRIGUES

**MELATONINA: RECEPTORES DE MEMBRANA E AÇÃO NA EXPRESSÃO
GÊNICA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO ÚTERO DE ÉGUAS**

PORTO ALEGRE

2023

MURILO FARIAS RODRIGUES

**MELATONINA: RECEPTORES DE MEMBRANA E AÇÃO NA EXPRESSÃO
GÊNICA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO ÚTERO DE ÉGUAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal: Equinos

ORIENTADOR: Dr^a ADRIANA PIRES NEVES

COORIENTADOR: Dr. ROGÉRIO FERREIRA

PORTO ALEGRE

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Murilo Farias
MELATONINA: RECEPTORES DE MEMBRANA E AÇÃO NA
EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO ÚTERO
DE ÉGUAS / Murilo Farias Rodrigues. -- 2023.
75 f.
Orientadora: Adriana Pires Neves.

Coorientador: Rogério Ferreira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto
Alegre, BR-RS, 2023.

1. ÉGUA. 2. ÚTERO. 3. MELATONINA. 4. RECEPTORES. 5.
CITOCINAS. I. Pires Neves, Adriana, orient. II.
Ferreira, Rogério, coorient. III. Título.

MURILO FARIAS RODRIGUES

**MELATONINA: RECEPTORES DE MEMBRANA E AÇÃO NA EXPRESSÃO
GÊNICA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO ÚTERO DE ÉGUAS**

Tese defendida e aprovada em: 14 de setembro de 2023

Banca Examinadora:

Prof. Dr^a Adriana Pires Neves
Orientadora e Presidente da Comissão
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Membro da Comissão
(UFRGS)

Prof. Dr. Marcelo Bertolini
Membro da Comissão
(UFRGS)

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho
Membro da Comissão
(UNIVATES)

Dedico esta tese aos meus amados pais, Lucas Rodrigues Neto e Nair Farias Rodrigues, e ao meu avô Vitor Rodrigues Nunes - *in memoriam*, os maiores incentivadores e fontes inesgotáveis de apoio, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que, para mim, se não existisse, ao menos deveria de ser inventado!

Aos meus pais Lucas e Nair, pela educação, suporte afetivo e por me ensinarem que a vida é constituída mais por momentos difíceis do que por facilidades, o que me possibilitou a suplantar os desafios facilmente. Obrigado de Coração!

Ao meu avô Vitor – *in memoriam*, pelas cobranças de quando eu traria o “diploma” que, embora não tivesse a mínima noção do que eu estava fazendo “no estudo”, sabia que aquilo era importante para finalizar mais um ciclo de minha vida. Infelizmente, não terei como lhe mostrar o diploma fisicamente, porém, acredito, que de alguma forma seja transmitido. Obrigado pela cobrança!

E como não deixar de agradecer a Prof^a Adriana Pires Neves, pelo apoio incondicional não só pela minha orientação, mas por toda a trajetória, mesmo um pouco antes de iniciar o caminho na pós-graduação, como exemplo, incentivo e ensinamentos dentro da reprodução equina. Nunca me esquecerei o que fizeste por mim!

Ao meu coorientador Prof^o Rogério Ferreira, um exemplo de profissional e de postura ilibada na docência e pesquisa, pelos seus ensinamentos precisos a uma pessoa não nativa em biologia molecular, pelos conselhos do que seria factível de ser respondido nessa tese, de acordo com os recursos disponíveis, e pelo suporte estatístico. Meu muito obrigado!

Ao Prof^o Gilson Antônio Pessoa, da Universidade Federal de Santa Maria, uma peça fundamental para a realização dessa pesquisa, por deixar o laboratório - Embryolab e a sua equipe a minha disposição. Obrigado! Conte comigo para os próximos!

A Prof^a Denise de Araújo, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CEO que, gentilmente, cedeu o Labmim com os seus equipamentos de biologia molecular. Agradeço-te de coração!

A toda equipe do Frigorífico Foresta-S/A, em especial à médica veterinária Neide Severo, do programa de qualidade, por viabilizarem a doação das peças uterinas. Os meus sinceros agradecimentos na contribuição dessa pesquisa!

E claro, não poderia deixar de agradecer que essa trajetória na pesquisa e na docência foi influenciada graças a um exemplo de incentivo, por uma pessoa que

considero um exemplo de profissional, que foi o meu professor na quarta fase de minha graduação, e que ainda hoje continua me influenciando pelo legado vivo presente em minha memória, Profº Marcelo Bertolini. Muito obrigado pelos seus ensinamentos, e por me mostrar que a docência e a pesquisa pode ser algo muito gratificante!

Só é útil o conhecimento que nos torna melhores. Sócrates

MELATONINA: RECEPTORES DE MEMBRANA E AÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO ÚTERO DE ÉGUA.

RESUMO

A melatonina apresenta a capacidade de minimizar ou de até atenuar a atividade das vias inflamatórias responsáveis pela persistência do processo inflamatório. Apesar das éguas serem influenciadas pelo fotoperíodo, ainda é desconhecida a ação da melatonina no útero de éguas. Os objetivos desse estudo consistem: i) verificar a expressão gênica dos receptores MT1 e MT2 de melatonina no endométrio de éguas, e se a inflamação interfere na expressão de cada receptor. ii) citotoxicidade da melatonina em células endometriais nas concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹, 1 mMol.L⁻¹, 2 mMol.L⁻¹, 4 mMol.L⁻¹ e 8 mMol.L⁻¹. iii) verificar a influência da melatonina na expressão gênica das citocinas IL1-β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α em explantes uterinos de éguas em 6, 12 e 24 horas de cultivo. Cada objetivo foi dividido em três experimentos, sendo, o primeiro, realizado com 12 biópsias uterinas, metade derivada de uma infusão com 10⁹ de espermatozoides vivos/mortos. O segundo experimento foi verificado a toxicidade da melatonina em células endometriais. O terceiro, com o uso das concentrações menos citotóxicas de melatonina, 54 explantes uterinos de três úteros foram cultivados por 6, 12 e 24 horas, expostos a uma suspensão espermática com 10 milhões de espermatozoides vivos/mortos por mililitro. Foi observado a expressão gênica dos receptores de membrana MT1 e MT2 no endométrio de éguas, porém o processo inflamatório com espermatozoides não foi capaz de interferir na síntese de RNAm. As concentrações menos citotóxicas foram as de 0,5 mMol.L⁻¹ e 1 mMol.L⁻¹. No experimento 3, não foi possível de se verificar a ação concreta da melatonina na expressão gênica relativa das citocinas inflamatórias, apesar de a IL1-β ter apresentado uma diferença nas 24 horas de cultivo. Provavelmente se o tempo de cultivo fosse de até 48 horas com o uso de espermatozoides poderia se ter certificado uma melhor dinâmica na expressão entre os tratamentos.

Palavras-chave: Égua, Útero, Melatonina, Receptores, Citocinas.

MELATONIN: MEMBRANE RECEPTORS AND ACTION ON THE GENE EXPRESSION OF INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE UTERUS OF MARES

ABSTRACT

Melatonin can minimize or even attenuate the activity of inflammatory pathways responsible for the persistence of the inflammatory process. Although mares are affected by photoperiod, the effect of melatonin in the uterus of mares is still unknown. The objectives of this study are: i) to examine the gene expression of the melatonin receptors MT1 and MT2 in the endometrium of mares and determine whether inflammation affects the expression of each receptor. ii) cytotoxicity of melatonin in endometrial cells at concentrations of 0.5 mMol.L⁻¹, 1 mMol.L⁻¹, 2 mMol.L⁻¹, 4 mMol.L⁻¹ and 8 mMol.L⁻¹. (iii) To examine the effect of melatonin on gene expression of the cytokines IL1-β, IL -6, IL -8, IL -10, and TNF-α in uterine explants from mares after 6, 12, and 24 hours of culture. Each objective was divided into three experiments, the first using 12 uterine biopsies, half of which were derived from an infusion of 10⁹ live/dead sperm. The second experiment checked the toxicity of melatonin in endometrial cells. In the third experiment, using the least cytotoxic concentrations of melatonin, 54 uterine explants from three uterine were cultured for 6, 12, and 24 hours and exposed to a sperm suspension containing 10⁷ live/dead sperm per milliliter. Gene expression of the membrane receptors MT1 and MT2 was observed in the endometrium of mares, but the inflammatory process with the sperm was not able to affect the mRNA synthesis of the receptors. The least cytotoxic concentrations were 0.5 mMol.L⁻¹ and 1 mMol.L⁻¹. In experiment 3, it was not possible to verify the specific effect of melatonin.

Keywords: Mare, Uterus, Melatonin, Receptors, Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Vias de inibição da melatonina na ocorrência de mucosite oral induzida por radioterapia. A produção de ERO's induzida pela radiação ionizante promoveu a ativação do NF-κB, degradação do DNA e lesão mitocondrial. A disfunção mitocondrial causada pela lesão da mitocôndria promove o aumento da produção de ERO's, na ativação do inflamassoma NLRP3 e na indução da apoptose celular. A melatonina foi capaz de bloquear nos principais locais de ação das ERO's, o qual inibiu a cascata inflamatória. Adaptado de ORTIZ et al., (2015)..... 23
- Figura 2 - Diagrama esquemático demonstrando o bloqueio dos efeitos nocivos pela melatonina, causados pela indução das LPS no tecido ovariano em hamster adultos Golden. Adaptado de PAL, et al., (2022)..... 25
- Figura 3 - Comparação da expressão relativa entre os tratamentos Sem Espermatozoide (S/SPTZ) e Com Espermatozoide (C/SPTZ) realizados para os receptores MT1 e MT2. (ns - $P > 0,05$)..... 36
- Figura 4 - Distribuição dos explantes uterinos derivados de três peças obtidas em abatedouro frigorífico, sendo submetidos aos tratamentos de melatonina com suspensão espermática (MEL +) ou sem suspensão espermática (MEL -) nas concentrações de 0,0 mmol.L⁻¹ (MEL + 0,0 e MEL - 0,0), 0,5 mmol.L⁻¹ (MEL + 0,5 e MEL - 0,5) e 1 mmol.L⁻¹ (MEL + 1,0 e MEL - 1,0). O tempo de cultivo em estufa de cultivo regulada a 38 °C, com mistura gasosa de 5 % de O₂ e 5 % CO₂ sob umidade saturada foram de 6, 12 e 24 horas..... 49

Figura 5 - Citotoxicidade da melatonina em células endometriais nas concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹ (MEL0.5), 1 mMol.L⁻¹ (MEL1.0), 2 mMol.L⁻¹ (MEL2.0), 4 mMol.L⁻¹ (MEL4.0) e 8 mMol.L⁻¹ (MEL8.0), avaliado através da Lactato desidrogenase – (CYQUANT®, LDH, C200300, Invitrogen, THERMOFISCHER SCIENTIFIC®)

53

Figura 6 Médias corrigidas das expressões relativas dos genes IL1-β, IL1-RN, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α de explantes de útero equino submetidos aos tratamentos MEL – 0.0 (sem melatonina e sem espermatozoides), MEL – 0.5 (com 0,5 mMol.L⁻¹ de melatonina e sem espermatozoides), MEL – 1 (com 1 mMol.L⁻¹ de melatonina e sem espermatozoides), MEL + 0.0 (sem melatonina e com espermatozoides), MEL + 0.5 (com 0,5 mMol.L⁻¹ de melatonina e com espermatozoides), e MEL + 1 (com 1 mMol.L⁻¹ de melatonina e com espermatozoides). Os tempos de cultivo dos explantes foi de 6, 12 e 24 horas em estufa com 5 % de CO₂, 5 % de O₂ a 38 °C.....

55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de acesso ao GenBank – NCBI® e sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (F= Forward; R= Reverse) dos genes MTNR1A e MTNR1B e do de referência (β -actina) utilizadas no PCR em tempo quantitativo.....	35
Tabela 2	Gene, número de acesso (GenBank – NCBI®) e a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (F= Forward; R= Reverse) dos genes IL-1 β , IL-1RN, IL-6, IL8, IL-10, TNF- α e β -Actina (gene de referência), utilizados para a expressão gênica em explantes uterinos extraídos de três peças uterinas de éguas e cultivadas por 6, 12 e 24 horas.....	50
Tabela 3	Concentração de RNA (ng/ μ L), e relação A260/280 e 260/230 dos explantes derivados de três peças uterinas, cultivados em Solução de William's por 6, 12 e 24 horas, suplementada com melatonina e adicionada com uma suspensão espermática 10 milhões de espermatozoides vivos e mortos/mL (MEL +) ou sem espermatozoides (MEL -) nas concentrações de 0,0 mmol.L ⁻¹ (MEL + 0 e MEL - 0), 0,5 mmol.L ⁻¹ (MEL + 0,5 e MEL - 0,5) e 1 mmol.L ⁻¹ (MEL + 1,0 e MEL - 1,0).....	68
Tabela 4	Concentração de DNA (ng/ μ L), e relação A260/280 e 260/230 dos explantes derivados de três peças uterinas, cultivados em Solução de William's por 6, 12 e 24 horas, suplementada com melatonina e adicionada com uma suspensão espermática 10 milhões de espermatozoides vivos e mortos/mL (MEL +) ou sem espermatozoides (MEL -) nas concentrações de 0,0 mmol.L ⁻¹ (MEL + 0 e MEL - 0), 0,5 mmol.L ⁻¹ (MEL + 0,5 e MEL - 0,5) e 1 mmol.L ⁻¹ (MEL + 1,0 e MEL - 1,0).....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AANT – Arilalquilamina-N-acetil-transferase
ASMT- Alanino Amino-Transferase
 β -actina – Beta Actina
CCS – Contagem de Células Somáticas no Leite
COX-2- Ciclo Oxigenase tipo 2
COM/SPTZ – Com Espermatozoides
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ER α – Receptor de Estrógeno Tipo Alfa
ER β – Receptor de Estrógeno Tipo Beta
ERO's – Espécies Reativas de Oxigênio
EPPC – Endometrite Persistente Pós-Cobertura
HIOMT – Hidroxi-indole-O-Metil Transferase
IL1- β – Interleucina 1 beta
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
IL-10 – Interleucina 10
IL-18 - Interleucina 18
IL1-RA – Interleucina RA
IL1-RN – Interleucina RN
IFN- γ - Interferon gama
ITS – Insulina, transferina e selenito de sódio
KG – Quilograma
LPS – Lipopolissacarídeos
MDM2 - Anti-Apoptotic Mouse Double Minute 2 protein
MT1 – Receptor de membrana de melatonina do Tipo I
MT2 – Receptor de membrana de melatonina do Tipo II
MTNR1A – Gene do Receptor de Membrana de Melatonina do Tipo I
MTNR1B – Gene do Receptor de Membrana de Melatonina do Tipo II
Mol/L – Molar por Litro
 μ g – Micrograma

mL – Mililitro

mMol.L⁻¹ – Milimolar por Litro

Mol.L⁻¹ – Molar por Litro

NF-κB – Fator Nuclear Tipo Kappa

NLRP3 - Nucleotide-binding Oligomerization Domain–like Receptor Pyrin Domain–containing 3

ng/μL – Nanogramas por microlitro

P27 KIP-1 - Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 1B

Pró-IL-1β - Interleucina 1 beta inativa

q.s.p. – Quantidade Suficientes Para

RZR-α – Receptor Nuclear Z de Melatonina Tipo Alfa.

ROR-α - Receptor Nuclear R de Melatonina Tipo Alfa.

RZR/ROR - Receptor Nuclear de Melatonina Tipo RZR/ROZ

RNA_m – Ácido Ribonucleico mensageiro

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SIRT-1 - NAD-dependente de acetilase sirtuin-1

SEM/SPTZ – Sem espermatozoides

TNF-α – Fator Nuclear Tipo Alfa

TLR-2 – Toll-Like Receptors 2

T3 - Triiodotironina

T4 - Tiroxina

TPH1- Triptofano Hidroxilase Tipo 1.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	2.1 Mediadores inflamatórios no útero de éguas	20
2.2	Melatonina: Ação antioxidante e bloqueio da cascata inflamatória	21
2.3	Síntese e tecidos-alvo de melatonina	25
2.4	2.2 Receptores de membrana e nucleares de melatonina	27
2.5	Cultivo <i>ex vivo</i> de explantes uterinos	28
3	ARTIGO 1. EXPRESSÃO DE RECEPTORES MT1 E MT2 DE MELATONINA NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS MEDIANTE A INFLUÊNCIA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO	30
4	ARTIGO 2. MELATONINA: CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS E AÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM EXPLANTES UTERINOS CULTIVADOS POR 6, 12, E 24 HORAS	42
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7	APÊNDICES	68
	Apêndice A. Concentração (ng/μL) de RNA dos explantes utilizados.	68
	Apêndice B. Concentração (ng/μL) de cDNA dos explantes utilizados.	70
	Apêndice C. Composição dos meios	71

8	ANEXOS	73
	Anexo A. Coleta de explante com <i>punch</i> dermatológico de 8 mm de diâmetro de uma das peças uterinas pelo acesso dorsal da curvatura maior.	73
	Anexo B. Explantes em 4,25 mililitros de Solução de William's prontos para o cultivo em estufa com 5 % de CO ₂ , 5 % de O ₂ , 38 °C sob umidade saturada.	74
	Anexo C. Fatiamento do explante congelado com lâmina de bisturi, e deposição dos fragmentos e degradação com seringa de 3 mililitros acoplado a uma agulha de 18 G de diâmetro.	74

1 INTRODUÇÃO

A endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) caracteriza-se por um distúrbio inflamatório, observado em algumas éguas, que apresentam à dificuldade em promover uma eficiente limpeza uterina requerida após a presença do sêmen no útero (TROEDSSON et al., 2001). Atribui-se a essa persistência inflamatória pela atividade prolongada das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α por mais de 6 horas, mantendo-se elevadas acima de 24 horas {Formatting Citation}. Além disso, é observado um bloqueio das anti-inflamatórias IL-10 e IL-1RN (WOODWARD et al., 2013). Em éguas que não apresentam o distúrbio inflamatório, ditas como resistentes à EPPC, observa-se uma atividade das citocinas pró-inflamatória predominante dentro de 6 horas da presença do sêmen e, em seguida, as citocinas anti-inflamatórias começam a cessar a cascata de inflamação dentro de 24 a 36 horas (WOODWARD et al., 2012).

O estudo de novas moléculas que poderão auxiliar na contenção do processo inflamatório bem como a capacidade de exercer a proteção contra agentes nocivos deve ser o principal foco das pesquisas implicadas na resolução da EPPC em éguas. Para tanto, a melatonina, um hormônio produzido pela glândula pineal e em diferentes tecidos, várias pesquisas apontam a sua capacidade de promover a regulação e a proteção contra agentes nocivos responsáveis por promover a cascata inflamatória persistente.

No processo inflamatório, a melatonina é implicada por agir diretamente, através de sua ação antioxidante sobre as EROs, ou indiretamente, por meio da ativação de genes de antioxidantes naturais ou através de bloqueadores de inflamassomas. Já foi observado essa ação em tecidos submetido a raios ionizantes (ORTIZ et al., 2015), na proteção contra a ação nociva dos glicocorticoides na regeneração de condrócitos (YANG et al., 2017b) e, até mesmo, no bloqueio de genes pró-apoptóticos (SHIU et al., 2013; ORTIZ et al., 2015; ZHANG et al., 2016; CHEN et al., 2020). Em experimentos envolvendo o uso de lipopolissacarídeos (LPS) em meios de cultivo foi observado que a melatonina foi capaz tanto de bloquear por meio dos receptores TLR-4 a TLR-2, além de promover a *upregulation* do gene SIRT-1

responsável por inativar o inflamassoma NLRP-3 (PENG et al., 2018; ARIOSZ et al., 2019; CHEN et al., 2020; WU et al., 2020). Além disso, esse hormônio promove o bloqueio na ativação de outro inflamassoma, o NF- κ B, que induz a transcrição nuclear da pró-IL-1 β (interleucina inativa) (ORTIZ et al., 2015; CHEN et al., 2020). A pró-IL-1 β acaba sendo transformada na forma ativa (IL-1 β) através da clivagem executada pela caspase-3, enzima que é ativada pela ação do NLRP-3. A IL-1 β , quando ativa, é capaz de manter ativa a persistência do processo inflamatório, além de desencadeadora da expressão de IL-6 e IL-10 e da IL1-ra (DUVAL et al., 2019).

Nos tecidos onde já foi comprovada a sua atuação, a melatonina pode se ligar em um ou mais receptores específicos, pois há três nucleares, o RZR- α , ROR- α e RZR/ROR, e mais outros três de membrana, o MT1, MT2 e MT3, sendo o último associado a uma enzima (CARRILLO-VICO et al., 2013). Em tecidos reprodutivos, já foi constada a presença dos receptores MT1 e MT2 no ovário de ratos (PAL; HALDAR; VERMA, 2022), no miométrio de mulheres (SHARKEY et al., 2009), no útero de vacas (DIRANDEH; ANSARI-PIRSARAEI; THATCHER, 2022) e no testículo e epidídimo de carneiros (GONZÁLEZ-ARTO et al., 2017). A administração de melatonina, além de bloquear a atividade inflamatória, aumenta a expressão do próprio receptor MT1 no tecido ovariano (PAL; HALDAR; VERMA, 2022). Essa característica também foi observada em vacas leiteiras prenhes aos 16 dias de gestação, onde níveis séricos de melatonina foi elevado, em relação as que tiveram morte embrionária, onde se observou no endométrio maiores expressões gênicas do receptor MT1 (DIRANDEH; ANSARI-PIRSARAEI; THATCHER, 2022).

As concentrações utilizadas de melatonina em cultivo de tecidos, gametas e embriões situam-se de 0,5 nMol a 2 mMol. No cultivo de condrócitos foi observado que concentrações superiores a 4 mMol apresentou maior citotoxicidade (CHEN et al., 2020). Em espermatozoides equinos foram as menores concentrações testadas em células reprodutivas, entre 0,5 nMol a 1 μ Mol (BALAO DA SILVA et al., 2011).

Na espécie equina, as pesquisas envolvendo melatonina apenas se restringe na influência desta na atividade cíclica de éguas e, diferente ao que já se conhece em outras espécies, ainda é desconhecida a sua ação na atividade inflamatória. Sendo assim, os objetivos desse estudo são de: i) verificar a expressão gênica dos receptores MT1 e MT2 de melatonina no endométrio de éguas, e se a inflamação interfere na

expressão de cada receptor; ii) avaliar a citotoxicidade da melatonina em células endometriais nas concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹, 1 mMol.L⁻¹, 2 mMol.L⁻¹, 4 mMol.L⁻¹ e 8 mMol.L⁻¹; e iii) verificar a influência da melatonina na expressão gênica das citocinas IL1-β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α em explantes uterinos de éguas em 6, 12 e 24 horas de cultivo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mediadores inflamatórios no útero de éguas

A presença de um processo inflamatório transitório associado a uma atividade miometrial eficiente promovem uma eficiente limpeza uterina após o contato do sêmen e de bactérias no útero (TROEDSSON et al., 2005; FEDORKA et al., 2016). Em condições normais, o processo inflamatório uterino em éguas perdura por 24 a 36 horas do contato com sêmen e de bactérias no útero (TROEDSSON; WOODWARD, 2016). As interleucinas IL-1α e IL-1β, além de determinarem atividade pró-inflamatória, também são precursoras de outras moléculas de ação similar como o interferon-gama (IFN-δ) (FEDORKA et al., 2016). Há a participação no início do processo inflamatório, logo após o contato do sêmen no útero, do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-α). As interleucinas de ação anti-inflamatória apresentam sua ação marcadamente expressiva a partir das 6 horas do início da atividade inflamatória, com a expressão de RNAm das IL-10 e IL1-RN sendo responsáveis por cessar o processo inflamatório dentro de 24 a 36 horas (WOODWARD et al., 2012). No entanto, a IL-6 apresenta características distintas dependendo do momento da atividade inflamatória; no início, contribui para a sua instalação e depois de 6 horas auxilia em cessar a endometrite (TILG et al., 1994).

O equilíbrio na ação entre agentes pró- e anti-inflamatórios na endometrite é fundamental para a eficiência da limpeza uterina. Entretanto, em algumas éguas, observa-se um desequilíbrio na ação destes, resultando na persistência do processo inflamatório (Endometrite Persistente Pós Cobertura – EPPC). Em parte, deve-se à baixa expressão de citocinas anti-inflamatórias como a IL1-RN e IL-10, em relação a

éguas resistentes à EPPC, quando avaliada nas primeiras 6 horas após a inseminação artificial (WOODWARD et al., 2013). Contudo, no mesmo estudo, não se observaram diferenças significativas entre éguas susceptíveis e resistentes à EPPC quanto à produção dos agentes pró-inflamatórios TNF- α e IFN- δ . Em éguas infectadas experimentalmente com *Escherichia coli*, observou-se nas éguas susceptíveis um incremento na expressão das IL-1 β e IL-8 nas primeiras 24 horas, com a primeira permanecendo aumentada em até 72 horas em relação às éguas resistentes (CHRISTOFFERSEN et al., 2012). A persistência do processo inflamatório propicia um ambiente uterino inóspito para a sobrevivência embrionária, o que contribui em uma maior perda gestacional das fêmeas susceptíveis à EPPC.

3.2 Melatonina: Ação antioxidante e bloqueio da cascata inflamatória

A inibição da cascata inflamatória pode ser realizada de forma direta, através da ação antioxidante, e indireta por meio do aumento da expressão gênica benéfico. A ação indireta pode ocorrer por meio do aumento da expressão gênica de antioxidantes celulares, de bloqueadores de inflamassomos e de genes pró-apoptóticos sobre as espécies reativas de oxigênio (EROs), que promovem a lipoperoxidação da membrana plasmática, fragmentação do DNA, a ativação de genes apoptóticos e disfunção da atividade mitocondrial (ORTIZ et al., 2015).

A ação antioxidante direta auxilia no combate às EROs, as quais são responsáveis por promover a lipoperoxidação lipídica, fragmentação do DNA e danificar a mitocôndria, além de aumentar disponibilidade de moléculas antioxidantes que não sofreram a oxidação. No entanto, a ação antioxidante pode ser indireta, através do aumento da expressão de RNAm de genes de agentes antioxidantes como a superperóxido dismutase, catalase, glutatona e malonaldeído (ZHAO et al., 2017).

A melatonina vem sendo alvo de pesquisas que tangem a ação desta no controle do processo inflamatório em diferentes espécies animais e em diferentes condições nocivas em vários estudos. Em um estudo, avaliando a ação da melatonina subcutânea no tratamento de vacas com mastite subclínica, observou-se que 4,64

mg/vaca/dia, por 4 dias consecutivos, reduziu a quantidade de células somáticas (CCS) no leite, principalmente nas fêmeas que tiveram 1 bilhão de CCS (YANG et al., 2017a). No mesmo estudo foi observada uma redução dos níveis plasmáticos de cortisol no grupo tratado. Em outra pesquisa, relacionando a ação da melatonina no controle do processo inflamatório em fibras musculares cardíacas de ratos, observou-se que a administração da mesma atenuou parcial e até mesmo totalmente a expressão das mieloperoxidase, além de diminuir o RNAm das citocinas TNF- α , IL1- β e IL-6, responsáveis pela lesão muscular, intermediada por ela via a ação do Fator NF- κ B (VENEROSO et al., 2009). Em humanos submetidos a corridas extenuantes, foi observado que a administração oral de melatonina reduziu os níveis de TNF- α e IL1-RA implicados no processo inflamatório, e controle do estresse oxidativo (OCHOA et al., 2011).

O uso da melatonina não fica apenas restrito a seu uso isolado, mas também como terapia complementar a outro tratamento, como em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A SIDA promove a redução dos níveis de IL-1 e IL-6, e a adição de melatonina no tratamento, em um estudo, possibilitou o aumento destas citocinas pró-inflamatórias vitais para o aumento da imunidade (WICHMANN et al., 1996). Os mecanismos de ação pleitrópica da melatonina refletem decisivamente contra a sepse, bloqueando a expressão excessiva de agentes pró-inflamatórios, em especial a de TNF- α em ratos, associado com ocitocina (ERBAŞ et al., 2013), e no aumento dos níveis de IL-10 local e sistemicamente (CARRILLO-VICO et al., 2005). A melatonina, através da estimulação de receptores MT1, promove a inibição da atividade do NF- κ B, o qual é implicado pela ativação do gene P27 KIP-1, que é o promotor da proliferação de células tumorais do câncer de próstata, servindo, portanto, como alternativa em conjunto à quimioterapia em humanos acometidos (SHIU et al., 2013). Os glicocorticoides são coadjuvantes no tratamento de afecções intra-articulares, pois amenizam a dor e minimizam a atividade inflamatória. Contudo, estes anti-inflamatórios esteroidais reduzem a formação da matriz extracelular, dificultando a regeneração dos condrócitos. Entretanto, foi observado que a administração prévia de melatonina à dexametasona, em cultivos *in vitro* de condrócitos articulares de rato, possibilitou a preservação celular, ao passo que ao contrário, não se observou efeito de proteção (YANG et al., 2017b).

Em pesquisas mais recentes sobre a rota inflamatória ligada à IL-1 β , a melatonina promove o bloqueio dos inflamassomas como, NLRP3 e NF- κ B (ORTIZ et al., 2015; CHEN et al., 2020; WU et al., 2020). Na indução de mucosite por radiação em ratos, uma das proteções exercidas pela melatonina foi através do bloqueio do inflamassoma NLRP3, sendo este o ativador da Caspase-3, enzima responsável pela clivagem da Pró-IL-1 β em IL-1 β , que é a forma ativa (ORTIZ et al., 2015). (Fig. 1).

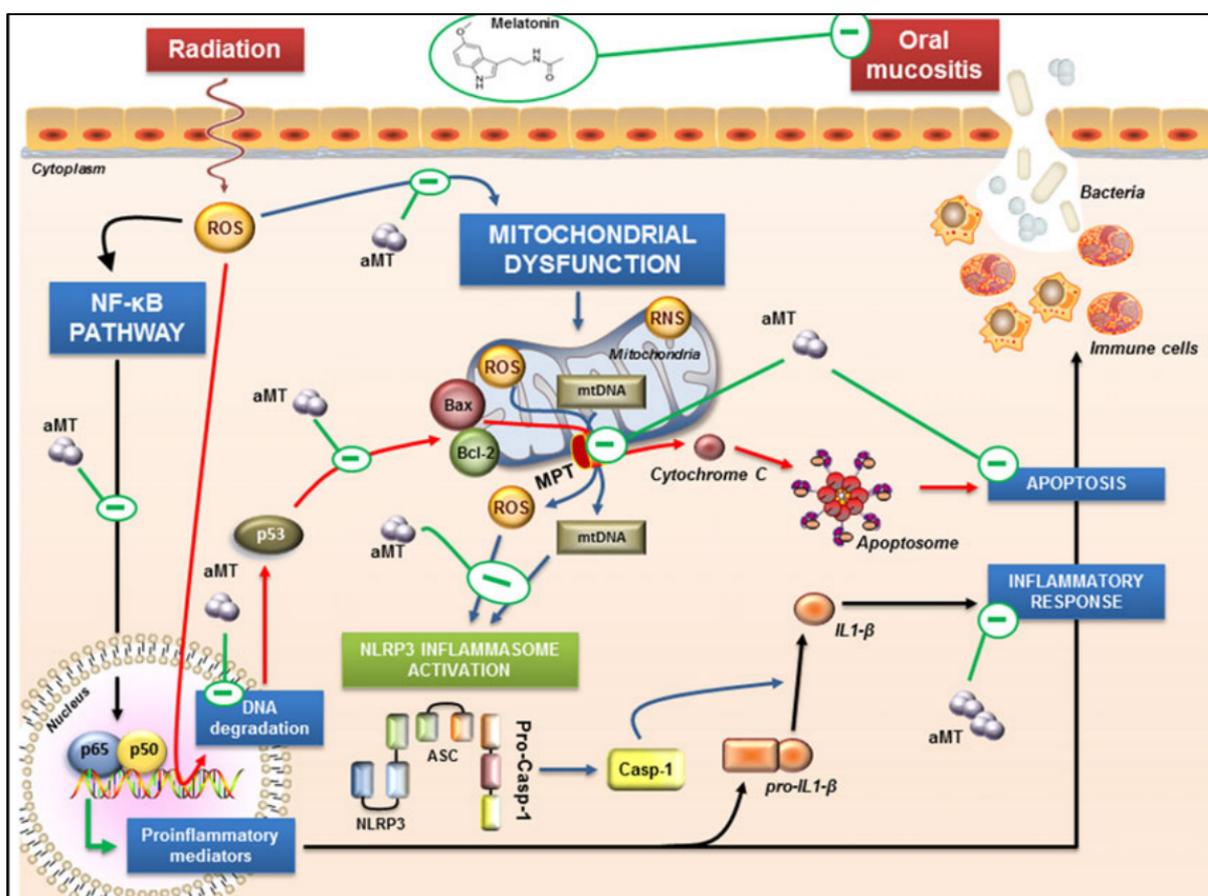


Fig. 1. Vias de inibição da melatonina na ocorrência de mucosite oral induzida por radioterapia. A produção de EROs induzida pela radiação ionizante promoveu a ativação do NF- κ B, degradação do DNA e lesão mitocondrial. A disfunção mitocondrial causada pela lesão da mitocôndria promove o aumento da produção de EROs, na ativação do inflamassoma NLRP3 e na indução da apoptose celular. A melatonina foi capaz de bloquear nos principais locais de ação das ERO's, o qual inibiu a cascata inflamatória. Adaptado de ORTIZ et al. (2015).

A comprovação da manutenção dessa cascata inflamatória também foi observada no processo degenerativo da cartilagem intervertebral, onde essa via inflamatória permanecia ativa por meio da retroalimentação positiva ocorrida pela

própria IL1- β (CHEN et al., 2020). No bloqueio da via inflamatória descrita acima, o NAD-dependente de acetilase sirtuin-1 (SIRT-1) é ativado pela melatonina, o qual promove a desacetilação de vários genes alvo incluindo proteínas histonas, p53, NF- κ B implicados em promover, respectivamente, a ativação de genes apoptóticos como o (BCL-2 e o BAX-2) e a persistência do processo inflamatório (ARIOZ et al., 2019). Em paralelo ao bloqueio do NF- κ B, a persistência da atividade inflamatória causada pela ativação da Caspase-3 por meio do NLRP3 é inibida. (PENG et al., 2018). WU et al. (2020), avaliando a manutenção do processo alérgico nas vias respiratórias em murinos, observaram um aumento na ativação dos receptores Toll-like-receptors-2 (TLR-2), o qual, quando estimulado, aumenta a expressão de IL1- β e IL-18. Além disso, os autores verificaram que diminuía a expressão dos genes ASMT e AANAT, que são precursores da melatonina. A administração da melatonina promovia a diminuição da expressão do TLR-2 e, portanto, aumentava a expressão das precursoras de melatonina.

A ação nociva dos LPS das bactérias gram negativas nos tecidos já é bem conhecida, e pode estar associada a distúrbios metabólicos que levam tanto à indução do processo inflamatório, quanto na persistência deste. PAL et al. (2022), administrando 100 μ g/kg de peso vivo de LPS em Golden hamsters, observaram um aumento de efeitos nocivos no tecido ovariano, desde uma deformidade da parede folicular e aumento na atresia de folículos ovarianos, um estresse metabólico e da persistência da atividade inflamatória. O processo inflamatório foi em decorrência do bloqueio na expressão de genes como ER α , T3 e T4, na redução no RNAm dos receptores MT1, superperóxido dismutase e catalase. Além disso, houve o aumento na expressão de genes responsáveis pela persistência do processo inflamatório como NF- κ B, Capase-3, TNF- α e COX-2. A melatonina foi capaz de reverter a ação nociva causada pela LPS no tecido ovariano, o que proporcionou na melhora da qualidade folicular quando aplicada 5 mg/kg de peso vivo da indoleamina (Fig. 2).

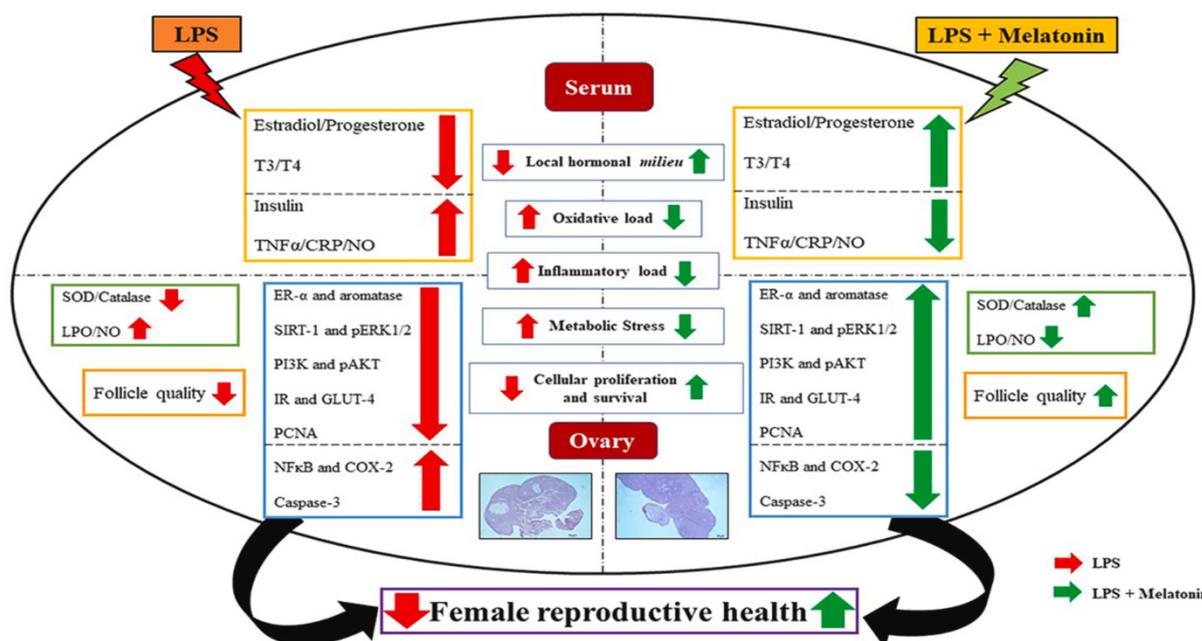


Fig.2. Diagrama esquemático que ilustra o bloqueio dos efeitos nocivos pela melatonina, causados pela indução das LPS no tecido ovariano em hamster adultos Golden. Adaptado de PAL et al. (2022).

3.3 Síntese e tecidos-alvo de melatonina

A melatonina (N-Acetyl-5-metoxitriptamina) é uma pequena indoleamina lipofílica produzida de forma rítmica pelos tecidos neurais da glândula pineal, sendo responsável pela regulação do ciclo circadiano no núcleo supraquiasmático no hipotálamo de mamíferos (CARRILLO-VICO et al., 2013; PFEFFER; KORF; WICHT, 2018). Todavia, através do uso de anticorpos altamente sensíveis às indolealquilaminas foi observado que há produção extrapineal da indoleamina em tecidos como retina, cerebelo, epitélio das vias respiratórias, fígado, rins, adrenais, timo, tireoide, pâncreas, ovário, placenta e endométrio (KVETNOY, 1999). Das quatro enzimas precursoras do hormônio, a Tryptofano-Hidroxilase (TPH1), Descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos, Arilalquilamina-N-acetil-transferase (AANAT) e a Hidroxi-indole-O-Metil Transferase (HIOMT), destacam-se as duas últimas para a comprovação específica da síntese. Além disso, já foi verificada a mutação de alguns genes que podem interferir na sua biossíntese, o que pode estar implicado em casos de distúrbios inflamatórios (DOMINGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2010). A AANAT, ou também denominada Serotonina N-Acetil-transferase, apresenta sua atividade aumentada pela ação da glutathiona peroxidase (MORITANI et al., 2018). A

suplementação com melatonina aumenta não só a expressão gênica de receptores MT1, mas a expressão de RNAm de genes antioxidantes naturais como a catalase, superperóxido dismutase e da glutatona peroxidase (ZHAO et al., 2017). Em células da granulosa de ovelhas, DUAN (2022) constatou a presença de receptores e dos precursores primordiais da biossíntese de melatonina, a enzima AANAT e HIOMT.

A ação da melatonina vem sendo comprovada em vários tecidos e em gametas e embriões. Essa indoleamina é capaz de propiciar um aumento de imunidade em casos de imunossupressão, e de imunodeprimir em situações de choque séptico onde o processo inflamatório está exacerbado (CARRILLO-VICO et al., 2013). Em distúrbios inflamatórios que permaneciam ativos nas vias respiratórias de ratos, a melatonina também foi capaz de bloquear os precursores ativadores, os quais são responsáveis pela manutenção da inflamação (PENG et al., 2018; WU et al., 2020). Além das pesquisas supracitadas, há a constatação na preservação celular contra a ação nociva da persistência do processo inflamatório, como o que ocorre em condições de exercício extenuante em células cardíacas em ratos (VENEROSO et al., 2009) e de humanos (OCHOA et al., 2011), além de ser comprovada proteção na regulação epigenética cardiovascular (FAVERO et al., 2017a). Além disso, há pesquisas em humanos que comprovaram sua ação como anti-hipertensiva e anti-lipidêmica (DOMINGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2010), como adjuvante na terapia ao combate de células tumorais (SHIU et al., 2013).

Na reprodução, especificamente no útero, a melatonina promove sinergismo com a ocitocina na contração uterina do miométrio de mulheres no final de gestação (SHARKEY et al., 2009). BROCKUS et al. (2016) verificaram que a administração oral de 20 mg de melatonina/novilha entre os 190 e 262 dias de gestação possibilitou no aumento de 25% no fluxo sanguíneo no útero, o que poderia ser utilizado como terapia complementar em gestações com comprometimento vascular. Em vacas gestantes, porém em outra pesquisa, foi comprovado que as fêmeas prenhes no início da gestação (32 dias de gestação) tiveram maior expressão de receptores MT1 e de melatonina, em comparação a fêmeas que tiveram morte embrionária (DIRANDEH; ANSARI-PIRSARAEI; THATCHER, 2022). Além disso, os pesquisadores também observaram uma maior expressão de genes responsáveis pela regulação da apoptose no útero (MDM2, MTBP e LIF).

Em gametas e embriões, tanto na criopreservação quanto na proteção de agentes nocivos, foi observada uma ação pela melatonina. Em espermatozoides equinos, apesar de não ter evidenciado a presença de receptores MT1 e MT2 nas células, a exposição à indoleamina possibilitou uma proteção antioxidante (BALAO DA SILVA et al., 2011). Em oócitos vitrificados/reaquecidos de ratos, a concentração de 10^{-9} Mol.L⁻¹ foi capaz de melhorar a taxa de sobrevivência de embriões de ratos (ZHANG et al., 2016), e em outro estudo na mesma espécie, de melhorar a implantação embrionária por meio da proteção a agente ionizante (ZHAO et al., 2017).

3.4 Receptores de membrana e nucleares de melatonina

A investigação dos receptores de ligação e os mecanismos de funcionamento são fundamentais para o estudo dos mecanismos de ação dos hormônios. A melatonina apresenta dois receptores de membrana, MT1 e MT2 e, possivelmente um terceiro, o MT3, embora não considerado um receptor clássico, por estar associado a uma enzima, mas está presente na membrana plasmática. Há três receptores nucleares denominados de RZR- α , ROR- α e RZR/ROR, distribuídos em distintos tipos celulares no organismo (CARRILLO-VICO et al., 2013).

Dentre os receptores mais observados se destaca os de membrana, presentes no tecido reprodutivo. No miométrio de mulheres foi evidenciado tanto a presença dos receptores MT1 quanto do MT2, e foi observado que aumentava a expressão de receptores de ocitocina quando da administração do hormônio (SHARKEY et al., 2009; OLCESE; BEESLEY, 2014). Além disso, a placenta de mulheres que tiveram perda gestacional tiveram uma menor expressão gênica dos receptores MT1 e MT2. Na implantação embrionária, a melatonina foi implicada por facilitar a entrada do citotrofoblasto no endométrio, além de melhorar a vascularização sanguínea (WADDELL et al., 2012). No tecido ovariano de camundongos, a exposição aos lipopolissacarídeos (LPS) reduziu a expressão dos receptores MT1, porém quando a indoleamina foi administrada no meio de cultivo, possibilitou a síntese de tal receptor, além do bloqueio da cascata inflamatória (PAL; HALDAR; VERMA, 2022). Nos testículos de carneiros, GONZÁLEZ-ARTO et al. (2017) verificaram por meio da imuno-histoquímica a presença dos receptores MT1 e MT2 em espermátogônias,

espermátides e espermatozoides nos túbulos seminíferos, e os MT2 no fluido epididimário, porém, nas células de Leydig e Sertoli não foi observada.

A presença dos receptores MT1 e MT2 não fica apenas restrita no tecido reprodutivo, mas já foi também observado em gametas. Nas células da granulosa de ovelhas, a presença dos receptores já foi certificada, porém quando da exposição ao estradiol, via receptores do estrógeno (ERA e ERB), foi capaz de reduzir a expressão dos receptores de melatonina (DUAN et al., 2022).

Entretanto, em espermatozoides equinos, em um estudo para verificar a ação da melatonina sobre estas células, embora observou-se apenas uma significativa redução na peroxidação lipídica (antioxidante), não foi identificada a presença de receptores de membrana (BALAO DA SILVA et al., 2011).

3.5 Cultivo *ex vivo* de explantes uterinos

A plataforma *ex vivo* por meio do uso de explantes é uma alternativa de estudo que pode mimetizar as condições *in vivo* do tecido. Há estudos com o uso de explantes de tecidos reprodutivos, como a placenta de humanos (DUVAL et al., 2019), e endométrio de equinos (NASH et al., 2008, 2010; DE BARROS, 2019) e bovinos (BORGES; HEALEY; SHELDON, 2012).

Em explantes de endométrio bovino cultivados, foi observada uma resposta inflamatória similar ao ocorrido em biópsias uterinas (BORGES; HEALEY; SHELDON, 2012). Nesse estudo, o material foi coletado com uso de um *punch* dermatológico, pois percebeu-se uma menor expressão de citocinas inflamatórias em comparação ao coletado por bisturi. Um estudo similar visou comparar o perfil de transcritomas de explantes de endométrio equino e de biópsias, bem como de verificar o comportamento entre os dois tipos de tecido mediante a exposição aos LPS (DE BARROS, 2019). Na comparação de transcriptomas de explantes de endométrio equino cultivados *in vitro* em relação aos obtidos por biópsias, foi observada uma diferença entre ambas nas primeiras 24 horas de cultivo; porém, nas 48 horas o perfil foi similar (DE BARROS, 2019). No mesmo estudo, porém, avaliando a concentração de PGF₂ α presente no meio quando exposto às concentrações de 0,3 μ g/mL, 1 μ g/mL

e 3 µg/mL de LPS, foi verificada uma menor concentração no explantes cultivados *in vitro*, mas que nas 48 horas o acúmulo de PGF_{2α} foi similar aos explantes *in vivo*. Entretanto, em explantes bovinos, após a exposição a cepas das bactérias de *Escherichia coli* e *Trueperella pyogenes*, um acúmulo de IL-1β, IL-6 e IL-8 já foi observado nas 24 e 48 horas de cultivo (BORGES; HEALEY; SHELDON, 2012).

NASH et al. (2008), cultivando explantes de endométrio, verificaram com o uso de LPS um aumento nas concentrações de PGF_{2α}, avaliada por radioimunoensaio. Entretanto, em outro estudo utilizando 10⁷ espermatozoides vivos/mortos, os mesmos autores observaram menores concentrações de PGF_{2α}, porém em 24 a 72 horas de cultivo, além de que com maiores concentrações de PGF_{2α}, obteve maiores expressões de IL-8 (NASH et al., 2010).

4 ARTIGO 1

Artigo a ser submetido ao periódico *Reproduction in Domestic Animals*

EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES MT1 E MT2 DE MELATONINA NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS MEDIANTE A INFLUÊNCIA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

M.F. Rodrigues^{a,c,d*}, A.P. Neves^b, R. Ferreira^c, G.A. Pessoa^e.

^aREPROLAB – Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil

^bUniversidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Dom Pedrito-RS, Brazil

^cUniversidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Chapecó-SC, Brazil

^dCentro Universitário Barriga Verde – UNIBAVE, Orleans-SC, Brazil

^eUniversidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria-RS, Brazil.

*Corresponding author. Tel. +55 49 2049-9524

E-mail address: murilo.rodrigues@udesc.br (M.F. Rodrigues)

RESUMO

O desequilíbrio entre os mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios observado em algumas éguas após o contato do sêmen no útero leva à endometrite persistente pós-cobertura. A melatonina, por meio dos receptores MT1 e MT2 nos tecidos reprodutivos, é conhecida por bloquear a cascata inflamatória. No entanto, em equinos, é desconhecida a presença de receptores de melatonina no útero. O objetivo desse estudo consiste em verificar a expressão gênica dos receptores MT1 e MT2 de melatonina no endométrio de éguas, e se a indução inflamatória espermática interfere na expressão de cada receptor. Seis éguas no estro na eminência da ovulação foram submetidas, cada, a uma infusão uterina com os seguintes tratamentos: **COM/SPTZ** (1 bilhão de espermatozoides vivos/mortos) e **SEM/SPTZ** (solução fisiológica). Após 6 horas da infusão uterina, foram coletadas as biópsias uterinas, sendo submetidas posteriormente à análise de RNAm. Houve a expressão gênica relativa dos receptores MT1 e MT2, porém, não houve diferença relativa na quantidade de RNAm para cada receptor entre os tratamentos COM/SPTZ e SEM/SPTZ ($P > 0,05$). Conclui-se que há expressão gênica dos receptores MT1 e MT2 de melatonina no endométrio da égua,

e que a extenuação do processo inflamatório com espermatozoides não foi capaz de interferir na síntese de RNAm de tais receptores.

Palavras-chave: Égua; Endométrio, MT1, MT2, Inflamação

INTRODUÇÃO

A endometrite transitória é um processo requerido que auxilia na limpeza uterina após o contato do sêmen no útero (TROEDSSON, 2006; FEDORKA et al., 2017). Essa atividade inicialmente acontece por meio de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-6 (no início), IL-8, Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Interferon-Gama (IFN- δ) (TILG et al., 1994; WOODWARD et al., 2012, 2013; FEDORKA et al., 2017). O processo inflamatório normalmente persiste variando de 24 a 36 horas após a deposição do sêmen no útero, e para isso, é desencadeado uma ação anti-inflamatória que inicia a partir de 6 horas, promovida pela IL-10 e IL-1RN (WOODWARD et al., 2012).

O desequilíbrio entre os mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios é observado em éguas que apresentam acúmulo de secreções após o contato do sêmen no útero. Esse distúrbio inflamatório leva à endometrite persistente pós-cobertura – EPPC, e é caracterizada pela baixa expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-1RN e IL-10, em comparação a éguas resistentes à EPPC após 6 horas do início da atividade inflamatória (WOODWARD et al., 2013). No entanto, no mesmo estudo, não foi observado diferenças na expressão gênica dos agentes pró-inflamatórios TNF- α e IFN- δ entre as resistentes e as susceptíveis à EPPC.

A infusão intrauterina com melatonina poderá ser uma alternativa que auxiliará na regulação do processo inflamatório em éguas com EPPC, pois apresenta uma capacidade de proteger as células contra agentes nocivos e de bloquear a persistência da atividade inflamatória. A melatonina é uma pequena indoleamina inicialmente descoberta a sua síntese na glândula pineal, sendo responsável pela regulação do ciclo circadiano no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (CARRILLO-

VICO et al., 2013). Além disso, também é atribuída à melatonina a capacidade de proteção contra raios ionizantes (ORTIZ et al., 2015), de proteger a matriz da cartilagem aos glicocorticoides (YANG et al., 2017b) e, até mesmo, o bloqueio de genes pró-apoptóticos, são algumas das ações comprovadas dessa indoleamina (SHIU et al., 2013; ORTIZ et al., 2015; ZHANG et al., 2016; CHEN et al., 2020). PAL et al. (2022) observaram que a melatonina foi capaz de reverter as lesões causadas no tecido ovariano de Golden Hamsters quando exposto aos lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos.

As ações direta e indireta promovida pela melatonina de proteção e regulação do processo inflamatório depende não só da presença de um receptor específico no tecido, mas também do tipo de receptor presente. O hormônio apresenta seis tipos de receptores, sendo, três de membrana, o MT1 e MT2 e, possivelmente um terceiro, o MT3, que, apesar de não ser um receptor clássico, está associado a uma enzima presente na membrana. Já os três receptores nucleares são o RZR- α , ROR- α e RZR/ROR, sendo os quais constatados em distintos tipos celulares no organismo como em leucócitos (CARRILLO-VICO et al., 2013). Os receptores o MT1 e o MT2 são os mais constatados em tecidos reprodutivos, sendo, os quais, encontrados no útero de mulheres (OLCESE; BEESLEY, 2014) e vacas (DIRANDEH; ANSARI-PIRSARAEI; THATCHER, 2022), no ovário de ratos (PAL; HALDAR; VERMA, 2022), e no testículo e epidídimo de carneiros (GONZÁLEZ-ARTO et al., 2017).

A expressão gênica local dos receptores MT1 e MT2 pode determinar em uma ação local específica. Além disso, a constatação destes poderá servir como plataforma de estudos para a resolução de distúrbios inflamatórios, como na EPPC. Assim sendo, o objetivo desse estudo consistiu em verificar a expressão gênica dos receptores MT1 e MT2 de melatonina no endométrio de éguas, e se a indução inflamatória espermática interfere na expressão de cada receptor.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

A pesquisa foi conduzida de acordo com as normas institucionais de bem-estar e de uso de animais em pesquisa, aprovada sob o número de protocolo 028/2018, pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Barriga Verde – UNIBAVE (CONCEA CIAEP Nº 01.0519.2018), Orleans, Santa Catarina.

Foram utilizados dois estros de seis éguas mestiças da raça crioula, com a faixa etária entre 5 e 12 anos de idade, sem histórico de problemas reprodutivos. Os animais foram submetidos a um fotoperíodo de 15 horas de luz por dia, sendo fornecido 30 dias antes e durante a realização do estudo.

Os estros de cada fêmea foram identificados por meio da palpação retal e ultrassonografia com transdutor retal de 7,5 MHz (Mindray, DP20[®], China). Na presença de um folículo ovariano de ≥ 35 mm de diâmetro, da ausência de um corpo lúteo e de um edema endometrial presente, foi realizada a indução da ovulação com 1.500 UI de hCG por via IV (Vetecor[®] HERTAPIE CALLIER). Após 36 horas do uso do indutor da ovulação, o primeiro estro de cada éguas foi aleatoriamente distribuído aos seguintes tratamentos:

- **C/SPTZ** - Infusão uterina com uma suspensão espermática 1 bilhão de espermatozoides (vivos/mortos), diluídos em 20 mL de uma solução salina estéril aquecida a 37 °C (NaCl a 0,9%).

- **S/SPTZ** - Infusão uterina com 20 mL de uma solução salina estéril aquecida a 37 °C (NaCl a 0,9%).

Após 6 horas da infusão uterina, foram coletados de cada tratamento uma biópsia uterina por meio de uma pinça do modelo Yeoman, de acordo com (KELLER et al., 2018). Os fragmentos de endométrio foram armazenados em tubos criogênicos de 2 mL (CORNING[®], CNG430659), sendo imediatamente armazenadas em Nitrogênio Líquido.

Extração e transcrição reversa do RNA

O RNA extraído de cada amostra (C/SPTZ e S/SPTZ) foi obtido de 60 mg de tecido uterino, sendo extraído e purificado em coluna de sílica por centrifugação. Os procedimentos foram de acordo com as orientações do fabricante (SV Total RNA Isolation System® PROMEGA®, Wisconsin, EUA). No entanto, antes da introdução na solução de lise, o tecido congelado foi fatiado com uma lâmina de bisturi em pequenos fragmentos e, posteriormente, depositado na solução de lise. A desintegração do fragmento na solução de lise foi auxiliada por meio de uma agulha 18 G acoplada a uma seringa e, posteriormente, utilizada uma agulha 21 G de calibre. O RNAm foi eluído em 100 µL em H₂O ultrapura. A transcrição reversa foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (MultiScribe®, Applied Biosystems, THERMOFISCHER SCIENTIFIC, EUA).

Tanto o RNAm, quanto o cDNA foi mensurado por medição fotométrica (NanoDrop®, THERMOFISCHER SCIENTIFIC, EUA). A concentração de cDNA de todas as amostras utilizadas para o PCR quantitativo em tempo real foi ajustada para 6 ng/µL, sendo antes mensuradas as concentrações por medição fotométrica (NanoDrop®, THERMOFISCHER SCIENTIFIC, EUA).

PCR quantitativo em tempo real

Os oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*) dos receptores MT1 (gene MTNR1A) e MT2 (gene MTNR1B) foram pesquisados no banco de dados GenBank® (NCBI, EUA), e projetados pelo software *online* Primer3 (National Human Genome Research Institute, USA – <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). A sequência de nucleotídeos foi validada na plataforma BLAST® (NCBI, EUA) para a espécie. A β-actina foi o gene de referência, sendo compilado de Fedorka et al. (2017) (Tab.1.)

Tab. 1. Número de acesso ao GenBank – NCBI® e sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (F= Forward; R= Reverse) dos genes MTNR1A e MTNR1B e do de referência (β -actina) utilizadas no PCR em tempo quantitativo.

GenBank® - Nº de acesso	Gene	Sequência
		F → ACCCAGACTGAAACCCACAGG
XM_001490171.2	MTNR1A	R → TAACTGGCCACAAACAACCA
		F → GCTGCTGAACCAGAACTTCC
XM_001917051.1	MTNR1B	R → CCCTTGGAGCAGACTCACTC
		F → CTGGACTTCGAGCAGGAGATG
NM_001163856.1	β -Actina	R → CGTCGGGCAGCTCGTA

Fonte: Autor, 2023.

A concentração dos primers utilizada foi de 200 nM (*Forward* e *Reverse*). O PCR quantitativo em tempo real de cada amostra (C/SPTZ e S/SPTZ) foi realizado em duplicatas, sendo o volume final da reação de 10 μ L, de acordo com as orientações do fabricante (PCR Master Mix, PROMEGA, Wisconsin, EUA). O perfil do programa utilizado para a amplificação foi de 95 °C por 10 minutos no início, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos, anelamento por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. A temperatura de anelamento de todos os genes foi de 60 °C. O termociclador CFX96 real-time PCR® (BIO-RAD LABORATORIES®, INC., EUA) foi utilizado para as aplicações.

Análise estatística

A análise da expressão relativa de cada gene foi calculada com base na β -actina (gene de referência) através do software Gene Study® (BIO-RAD LABORATORIES® INC., EUA). A comparação entre médias das expressões relativas entre os tratamentos foi realizada por ANOVA obedecendo pressupostos para análise paramétrica. A normalidade e homoscedasticidade foram avaliadas pelos testes de

Shapiro Wilk e Levene, respectivamente. Os dados estão representados como média corrigida (*least squares corrected means*) e erro padrão da média. As análises foram realizadas com o software JMP Pro® (JMP Statistical Discovery LLC). Foi adotado 5% ($P < 0,05$) com nível de significância.

RESULTADOS

Foi possível de verificar a expressão gênica relativa dos receptores MT1 e MT2 com base no gene endógeno das amostras uterinas das éguas coletadas na eminência da ovulação. O tecido coletado utilizado para a análise que resultou nas expressões relativa dos receptores foi predominantemente o de endométrio, porém todo o fragmento processado poderia conter partes do miométrio.

A máxima indução inflamatória com a suspensão espermática de 1 bilhão de espermatozoides vivos/mortos - C/SPTZ não foi capaz de reduzir ou de aumentar a expressão relativa de cada receptor de membrana, em comparação ao tratamento sem suspensão de espermatozoides (S/SPTZ) ($P > 0,05$) (Fig. 3).

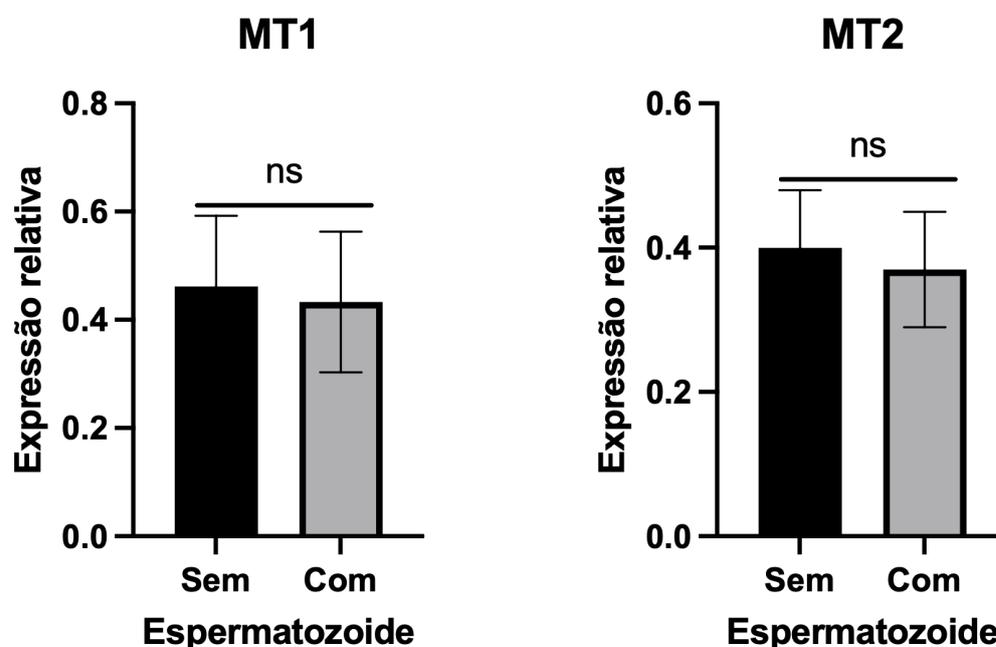


Fig. 3. Comparação da expressão relativa dos receptores MT1 e MT2 obtido de amostras uterinas coletadas 6 horas após de terem sido submetidas aos tratamentos Sem Espermatozoides (S/SPTZ) e Com Espermatozoides (C/SPTZ). (ns - $P > 0,05$).

DISCUSSÃO

Neste estudo constatamos a expressão gênica dos receptores de membrana de melatonina MT1 e MT2 em células uterinas de éguas na eminência da ovulação, o que pode denotar uma ação local específica, pelo menos nesse momento do ciclo estral. Na espécie equina, os estudos envolvendo melatonina na reprodução, na maioria das vezes, apenas se restringe do impacto dessa no bloqueio da atividade cíclica. Entretanto, em outras espécies, a constatação de tais receptores presentes e das ações locais no trato reprodutivo são amplamente estudadas, como, por exemplo, nas espécies humana (SHARKEY et al., 2009; WADDELL et al., 2012; OLCESE; BEESLEY, 2014) (SHARKEY et al., 2009; OLCESE; BEESLEY, 2014), bovina (BROCKUS et al., 2016; DIRANDEH; ANSARI-PIRSARAEI; THATCHER, 2022) e murina (PAL; HALDAR; VERMA, 2022), ovina (GONZÁLEZ-ARTO et al., 2017).

Dentre as ações locais largamente observadas em vários estudos realizados com a melatonina observa-se não só a capacidade de proteção direta, mas também indireta contra agentes nocivos, bem como de bloquear a persistência do processo inflamatório. A ação antioxidante direta contra as espécies reativas de oxigênio (ERO's) já foi observada na preservação de gametas e de embriões (BALAO DA SILVA et al., 2011; ZHANG et al., 2016; ZHAO et al., 2017) e na gestação de bovinos (DIRANDEH; ANSARI-PIRSARAEI; THATCHER, 2022). No entanto, o combate às ERO's também poderá ser de forma indireta, através do aumento da expressão dos antioxidantes naturais superperóxido dismutase, da glutatona sintetase e da malonaldeído desencadeadas pela ação da melatonina em embriões de ratos submetidos a indução oxidativa por iodeto de sódio (ZHAO et al., 2017). No mesmo estudo também foi observado o aumento da atividade das enzimas supracitadas, além de melhorar a pré-implantação embrionária exercidas pela proteção antioxidante conferida. Já o bloqueio da persistência do processo inflamatório poderá ser realizado de diferentes frentes, seja no sequestro das ERO's na membrana plasmática, na mitocôndria e na proteção contra a fragmentação do DNA que levaria a síntese de inflamassomos implicados no desencadeamento e da persistência do processo inflamatório. Os inflamassomos NF- κ B e o NLRP3 são as principais vias de transcrição e ativação da IL-1 β , respectivamente, e em estudos que submeteram os tecidos a

agentes nocivos a melatonina foi capaz de proteger, bloqueando essas vias (ORTIZ et al., 2015b; CHEN et al., 2020; PAL; HALDAR; VERMA, 2022).

Em éguas com EPPC apresentam um distúrbio inflamatório após o contato com sêmen no útero, onde observa-se que a atividade prolongada das citocinas pró-inflamatória IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-8 levam ao acúmulo de líquido e da consequente migração de polimorfonucleares significativa para a luz uterina (CHRISTOFFERSEN et al., 2012). Além disso, WOODWARD et al. (2012) observaram uma menor expressão gênica das citocinas anti-inflamatórias após 6 horas do contato do sêmen no útero como a IL-1RN e a IL-10 em éguas com EPPC em comparação à éguas resistentes. Esse desequilíbrio entre os mediadores pró e anti-inflamatórios nas éguas com EPPC poderá ser contornado pelo uso da melatonina, pois, a descoberta inédita dos receptores de membrana realizada neste estudo, serve de embasamento para pesquisas futuras com o objetivo de verificar uma possível regulação da cascata inflamatória. Entretanto, é necessário certificar da presença física e do local onde estão presentes os receptores no útero de éguas, por meio de imuno-histoquímica ou por imunofluorescência.

O comprometimento da expressão gênica de receptores MT1 já foi certificado tanto em estudos que identificaram menores concentrações plasmáticas de melatonina em vacas que tiveram perdas embrionárias (DIRANDEH; ANSARI-PIRSARAEI; THATCHER, 2022), quanto no tecido ovariano submetido a indução inflamatória por lipopolissacarídeos (PAL; HALDAR; VERMA, 2022). No entanto, em nosso estudo, não observamos diferenças na expressão gênica relativa ocasionada pela extenuação do processo inflamatório com espermatozoides ($P > 0,05$). Embora a solução fisiológica estéril com pH e osmolaridade adequada (pH: 7,35; osmolaridade de 270 mOms.KG/H₂O) também seja capaz de promover uma indução do processo inflamatório, acreditamos que a indução causada pelos espermatozoides tenha sido maior. FIALA (2004) testando a suspensão espermática com diferentes concentrações observou uma maior atividade inflamatória das diferentes concentrações de espermatozoides em relação ao uso apenas de solução fisiológica estéril.

CONCLUSÃO

Houve a expressão gênica dos receptores de melatonina MT1 e MT2 no endométrio da égua, porém, em 6 horas da indução do processo inflamatório, a expressão de RNAm de ambos os receptores não foi afetada.

REFERÊNCIAS

BALAO DA SILVA, C. M. et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 2, p. 172–179, 2011.

BROCKUS, K. E. et al. Dietary melatonin alters uterine artery hemodynamics in pregnant Holstein heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 1–10, 2016.

CARRILLO-VICO, A. et al. Melatonin: Buffering the immune system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 8638–8683, 2013.

CHEN, F. et al. Melatonin alleviates intervertebral disc degeneration by disrupting the IL-1 β /NF- κ B-NLRP3 inflammasome positive feedback loop. **Bone Research**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41413-020-0087-2>>.

CHRISTOFFERSEN, M. et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 41, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/41>>.

DIRANDEH, E.; ANSARI-PIRSARAEI, Z.; THATCHER, W. Melatonin as a Smart Protector of Pregnancy in Dairy Cows. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2022.

FEDORKA, C. et al. The effect of select seminal plasma proteins on endometrial mRNA cytokine expression in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis. **Reproduction in Domestic Animals**, n. November 2016, 2016.

FEDORKA, C. E. et al. The effect of select seminal plasma proteins on endometrial mRNA cytokine expression in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 1, p. 89–96, 2017.

FIALA, S. M. da E. Transporte espermático e resposta inflamatória uterina na égua após inseminação com diferentes concentrações de espermatozóides. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p. 159, 2004.

GONZÁLEZ-ARTO, M. et al. Melatonin MT1 and MT2 receptors in the ram reproductive tract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 1–15,

2017.

KELLER, A. et al. Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 3, p. 215, 2018.

OLCESE, J.; BEESLEY, S. **Clinical significance of melatonin receptors in the human myometrium** *Fertility and Sterility* Elsevier Inc., , 2014. .

ORTIZ, F. et al. Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 1, p. 34–49, 2015a.

ORTIZ, F. et al. Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 1, p. 34–49, 2015b.

PAL, S.; HALDAR, C.; VERMA, R. Melatonin attenuates LPS-induced ovarian toxicity via modulation of SIRT-1, PI3K/pAkt, pErk1/2 and NFκB/COX-2 expressions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 451, n. May, 2022.

SHARKEY, J. T. et al. Melatonin synergizes with oxytocin to enhance contractility of human myometrial smooth muscle cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 2, p. 421–427, 2009.

SHIU, S. Y. W. et al. Melatonin MT1 receptor-induced transcriptional up-regulation of p27Kip1 in prostate cancer antiproliferation is mediated via inhibition of constitutively active nuclear factor kappa B (NF-κB): Potential implications on prostate cancer chemoprevention and . **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 69–79, 2013.

TILG, H. et al. Interleukin-6 (IL-6) as an Anti-inflammatory Cytokine: Induction of Circulating IL-1 Receptor Antagonist and Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor p55. **Blood**, v. 83, n. 1, p. 113–118, 1994.

TROEDSSON, M. H. T. Breeding-Induced Endometritis in Mares. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 705–712, 2006.

WADDELL, B. J. et al. A rhythmic placenta? Circadian variation, clock genes and placental function. **Placenta**, v. 33, n. 7, p. 533–539, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.03.008>>.

WOODWARD, E. M. et al. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 495–501, 2012.

WOODWARD, E. M. et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Reproduction**, v. 145, n. 3, p. 289–296, 2013.

YANG, W. et al. Melatonin protects chondrocytes from impairment induced by glucocorticoids via NAD⁺-dependent SIRT1. **Steroids**, v. 126, n. April, p. 24–29, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.08.005>>.

ZHANG, Y. et al. Improved development by melatonin treatment after vitrification of mouse metaphase II oocytes. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 335–342, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.09.171>>.

ZHAO, J. et al. Melatonin protect the development of preimplantation mouse embryos from sodium fluoride-induced oxidative injury. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. March, p. 133–141, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.014>>.

5 ARTIGO 2

Artigo a ser enviado para a publicação no Journal of Equine Veterinary Science

MELATONINA: CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS E AÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM EXPLANTES UTERINOS CULTIVADOS POR 6, 12 E 24 HORAS

M.F. Rodrigues^{a,c,d,*}, A.P. Neves^b, R. Ferreira^c, G.A. Pessoa^e, D. Araújo^c

^a REPROLAB – Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil

^b Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Dom Pedrito-RS, Brazil

^c Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Chapecó-SC, Brazil

^d Centro Universitário Barriga Verde – UNIBAVE, Orleans-SC, Brazil

^e Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria-RS, Brazil

*Corresponding author. Tel. +55 49 2049-9524

E-mail address: murilo.rodrigues@udesc.br (M.F. Rodrigues)

RESUMO:

A melatonina é capaz de regular a atividade inflamatória, porém no útero de éguas é desconhecida a sua ação sobre os mediadores inflamatórios. Os objetivos desse estudo foram: i) determinar as concentrações menos citotóxicas de melatonina em células endometriais nas concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹, 1 mMol.L⁻¹, 2 mMol.L⁻¹, 4 mMol.L⁻¹ e 8 mMol.L⁻¹; e ii) verificar a influência da melatonina na expressão gênica das citocinas IL1-β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α em explantes uterinos de éguas em 6, 12 e 24 horas de cultivo. O estudo foi dividido em dois experimentos. No Experimento 1, as concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹ e 1 mMol.L⁻¹ foram similares entre si e as menos citotóxicas (98% ± 2 e 97% ± 1, respectivamente) em comparação as demais concentrações (P > 0,05). A concentrações de 2 mMol.L⁻¹ (66% ± 4) foi menor em relação as de 4 mMol.L⁻¹ (44% ± 3) e 8 mMol.L⁻¹ (4% ± 5) (P > 0,05). Da mesma forma a concentração de 4 mMol.L⁻¹ foi menor em relação a de 8 mMol.L⁻¹ (P > 0,05). No Experimento 2 foram utilizados 54 explantes de três peças uterinas. Um controle

positivo (Melatonina Com Espermatozoides – MEL+) e outro negativo (Melatonina Sem Espermatozoides – MEL-) foram testados com as concentrações menos citotóxicas do Experimento 1 e sem melatonina. As expressões relativas não diferiram entre si e em cada período, exceto entre alguns tratamentos da IL-1 β no período de 24 horas. A maior expressão relativa foi no MEL-0, em relação ao MEL-0,5 e MEL+0,5. Entretanto, nos demais tratamentos o MEL-0 não teve diferença estatística. Concluímos que as concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹ e 1 mMol L⁻¹ de melatonina são as menos citotóxicas para células endometriais equinas, em que não foi possível de verificar a ação da indoleamina mediante à exposição espermática em explantes de útero de éguas em 24 horas de cultivo.

Palavras-chave: Égua; Útero; Melatonina; Citotoxicidade; Explante. Citocinas.

INTRODUÇÃO

A melatonina é uma indoleamina que exerce diferentes funções fisiológicas em mamíferos, sendo, algumas delas, a sincronização do ritmo circadiano e na regulação da atividade inflamatória. A inibição da cascata inflamatória poderá ser realizada de forma direta através da ação antioxidante, e indireta por meio do aumento da expressão gênica de antioxidantes celulares e de bloqueadores de inflamassomos e de genes pró-apoptóticos (ORTIZ et al., 2015; ZHANG et al., 2016; FAVERO et al., 2017b; ZHAO et al., 2017; CHEN et al., 2020).

PAL et al. (2022) verificaram que a exposição aos lipopolissacarídeos (LPS) foi capaz de manter a via de produção da IL-1 β ativa através do aumento da expressão do inflamassoma NLRP3. Esse inflamassoma promove a ativação da caspase-3, uma enzima que cliva a pró-IL-1 β em IL-1 β (forma ativa da interleucina) (ORTIZ et al., 2015a; CHEN et al., 2020). Os autores descrevem a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) na manutenção dessa via inflamatória, onde a ativação do NF- κ B, um outro inflamassoma, promove a produção da pró-IL1- β . Após ativada a via inflamatória pelos dois inflamassomas, ocorre uma retroalimentação positiva pela própria IL-1 β (WU et al., 2020).

A endometrite persistente pós-cobertura (EPCC) é um distúrbio inflamatório que ocorre após o contato do sêmen no útero em algumas éguas, o que resulta em morte embrionária devido ao ambiente inóspito no lúmen uterino (TROEDSSON, 2006; WOODWARD et al., 2012). Embora a endometrite seja requerida para a limpeza uterina, esta deve ser transitória, por meio da regulação entre os mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (WOODWARD et al., 2012, 2013). As citocinas pró-inflamatórias são as IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ e TNF- α , ao passo que, IL-1RN e IL-10 são as anti-inflamatórias, e começam o bloqueio inflamatório após 6 horas do início (WOODWARD et al., 2013; FEDORKA et al., 2017).

A cascata inflamatória em éguas resistentes à EPCC apresenta um pico na expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias entre 2 e 12 horas, enquanto nas susceptíveis à EPCC ocorre um retardo (WOODWARD et al., 2013). No entanto, os autores verificaram uma elevada expressão das citocinas IL-1 β e IL-6 e o TNF- α após 6 horas, mantendo-se elevadas por mais de 24 horas. Além disso, há estudos que demonstram que estas citocinas pró-inflamatórias promovem o bloqueio das anti-inflamatórias, e que o processo inflamatório poderá se manter ativo por até 72 horas (CHRISTOFFERSEN et al., 2012).

Apesar de alguns estudos comprovarem a ação da melatonina no bloqueio dos mediadores inflamatórios, as pesquisas envolvendo essa indoleamina na reprodução de equinos apenas se restringe ao bloqueio da atividade cíclica. A presença de receptores de melatonina já foi observada no ovário de camundongos (PAL; HALDAR; VERMA, 2022) e no útero de mulheres (SHARKEY et al., 2009) e de vacas (BROCKUS et al., 2016). Entretanto na égua, uma espécie que tem influência do fotoperíodo, ainda não foi avaliada, sobretudo na possível influência do processo inflamatório no útero. Os objetivos desse estudo foram de: i) determinar as concentrações menos citotóxicas de melatonina em células endometriais nas concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹, 1 mMol.L⁻¹, 2 mMol.L⁻¹, 4 mMol.L⁻¹ e 8 mMol.L⁻¹; e ii) verificar a influência da melatonina na expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α em explantes uterinos de éguas em 6, 12 e 24 horas de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Ética no uso Animal

A pesquisa foi conduzida de acordo com as normas institucionais de bem-estar e de uso de animais em pesquisa, aprovada sob o número de protocolo 028/2018, pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Barriga Verde – UNIBAVE (CONCEA CIAEP Nº 01.0519.2018), Orleans, Santa Catarina.

Experimento 1 – Citotoxicidade em células endometriais de éguas em diferentes concentrações de melatonina

Local e animais

A análise de citotoxicidade das células endometriais foi realizada no mês de janeiro de 2020, no Laboratório de Embriologia Animal – Embryolab[®], Hospital Veterinário, da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria/RS. Foram utilizadas duas éguas cíclicas no estro (folículos pré-ovulatórios > 38 mm de diâmetro), de 7 e 8 anos, da raça Crioula, sem histórico de problemas reprodutivos.

Os animais eram mantidos em piquetes cultivados com azevém e arraçoados com 1% do peso vivo de um concentrado comercial com 12% de PB, com água e suplemento mineral *ad libitum*.

Preparo da Solução de William's e da melatonina

O meio de cultivo foi a Solução de William's, sendo suplementado com 0,1 µg/mL de Fator de Crescimento Epidermal (E5036, SIGMA-ALDRICH[®], EUA), 2 mM de L-Glutamina (G7513, SIGMA-ALDRICH[®], EUA), Insulina, Transferrina e Selenito de Sódio (I3146, SIGMA-ALDRICH[®], EUA) e 10 % de soro fetal bovino (NASH et al., 2008, 2010; DE BARROS, 2019).

As concentrações de melatonina (M5250, SIGMA-ALDRICH®) foram ajustadas para o volume de 100 µL em Solução de William's, sendo, inicialmente, solubilizadas em álcool etílico (50 mg/mL) e ajustado o volume conforme a densidade do álcool (0,8 g/cm³).

Obtenção das células e teste de citotoxicidade

As biópsias uterinas para a obtenção das células endometriais foram coletadas por meio de uma pinça do tipo Yeoman, de acordo com FIALA (2004). Em seguida, procedeu-se a separação do tecido endometrial. Os procedimentos de lavagem e obtenção das células endometriais das biópsias uterinas, do teste da curva de atividade da enzima Lactato desidrogenase utilizada para determinar a viabilidade celular foi realizado de acordo com as orientações do fabricante do kit da Lactato desidrogenase (CYQUANT®, LDH, C200300, Invitrogen, THERMOFISCHER SCIENTIFIC).

Os fragmentos de tecido foram lavados duas vezes em solução de PBS estéril. As células foram isoladas com solução de Tripsina 0,25 % + EDTA em PBS, sendo mantidas em incubadora de cultivo a 38°C em mistura gasosa de 5% de CO₂ e 5% de O₂ por 15 min (NASH et al., 2008).

Após a incubação, a suspensão celular foi centrifugada e, posteriormente, ressuspendidas em Solução de William's suplementada com 5% de soro fetal bovino (SFB), e uma outra parte sem SFB. A quantidade de células viáveis foi determinada em câmara hemocitométrica, mas antes, foram coradas em Azul de Tripán a 0,4%, a fim de verificar o percentual de células viáveis para os ajustes de concentração da suspensão celular. Foi realizada uma diluição seriada em Solução de William's com 2.000, 4.000, 6.000, 8.000 e 10.000 células viáveis, sendo, em seguida, incubadas a 38°C sob mistura gasosa de 5% de CO₂ e 5% de O₂ *overnight*. A atividade da enzima Lactato Desidrogenase foi avaliada nos cultivos com células endometriais equinos, conforme a orientação do fabricante (CYQUANT®, LDH, C200300, Invitrogen, THERMOFISCHER SCIENTIFIC, EUA).

Cultivo *in vitro* e análise de citotoxicidade

Todos os procedimentos realizados foram de acordo com as orientações do fabricante do kit da Lactato desidrogenase (CYQUANT[®], LDH, C200300, Invitrogen, THERMOFISCHER SCIENTIFIC). Foi utilizada uma suspensão em triplicata com 10.000 células viáveis suspensas em 100 µL de Solução de William's com e sem SFB, ajustadas nas concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹ (MEL0.5), 1 mMol.L⁻¹ (MEL1.0), 2 mMol.L⁻¹ (MEL2.0), 4 mMol.L⁻¹ (MEL4.0) e 8 mMol.L⁻¹ (MEL8.0). A concentração das soluções utilizadas foi similar a CHEN et al. (2020) em condrócitos de murinos.

Foi utilizada uma suspensão celular de 10.000 células, sendo cultivadas em triplicatas em micropoços de uma placa de ELISA (Microplaca, poços tipo "U", KASVI[®]), *overnight* em incubadora de cultivo, a 38°C, com mistura gasosa de 5% de CO₂ e 5% de O₂ (modelo CO₂-auto zero, HERAEUS[®]). A média das triplicatas obtidas de cada tratamento pelo kit da LDH foi quantificada por medição fotométrica em leitor de microplaca compacto (HIDEX SENSE[®], EUA).

Experimento 2: Expressão gênica das citocinas IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RN e TNF-α em explantes uterinos de égua cultivados por 6, 12 e 24 horas

Obtenção dos explantes

Ao todo, foram obtidos 18 explantes de cada uma de três peças uterinas de éguas coletadas em abatedouro-frigorífico (Frigorífico Foresta[®], São Gabriel/RS). As peças selecionadas apresentavam folículos pré-ovulatórios com ≥ 30 mm de diâmetro e ausência de corpo lúteo. As informações de idade e do histórico reprodutivo não foram coletadas.

As peças foram transportadas imersas em solução salina estéril de NaCl a 0,9%, resfriada em caixa térmica a 5°C até o laboratório (Laboratório de Embriologia Animal – Embryolab[®], Hospital Veterinário, da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria/RS). No laboratório, antes da coleta dos explantes, foi realizada uma citologia uterina a fim de descartar uma possível endometrite (REFS). A coleta foi

procedida através de uma incisão realizada na curvatura maior de cada órgão. Na avaliação citológica não foi constatada endometrite, e a técnica de avaliação foi de acordo com Riddle et al. (2007).

Os explantes foram coletados por meio de um *Punch* dermatológico estéril de 8 mm de diâmetro (Punch dermatológico, RAZORMED®).

Cultivo dos explantes e delineamento experimental

Os explantes foram cultivados em placas de 6 poços estéril (KASVI®, K12-006, BRA), com 4,25 mL de meio de cultivo, similar ao realizado por NASH e colaboradores (2008, 2010), exceto sem a plataforma de alumínio estéril para a deposição do fragmento de tecido. A Solução de William's foi preparada da mesma forma como no Experimento 1, porém, com as concentrações de melatonina de 0,5 mMol.L⁻¹ e 1 mMol.L⁻¹, e sem melatonina (0,0 mMol.L⁻¹).

A fim de intensificar o processo inflamatório e, portanto, verificar o comportamento das citocinas inflamatórias nos explantes, foi depositado nos poços de cultivo uma suspensão espermática que resultou em 10 milhões de espermatozoides/mL (Controle Positivo). Abaixo, está o delineamento do Experimento 2 (Fig. 4).

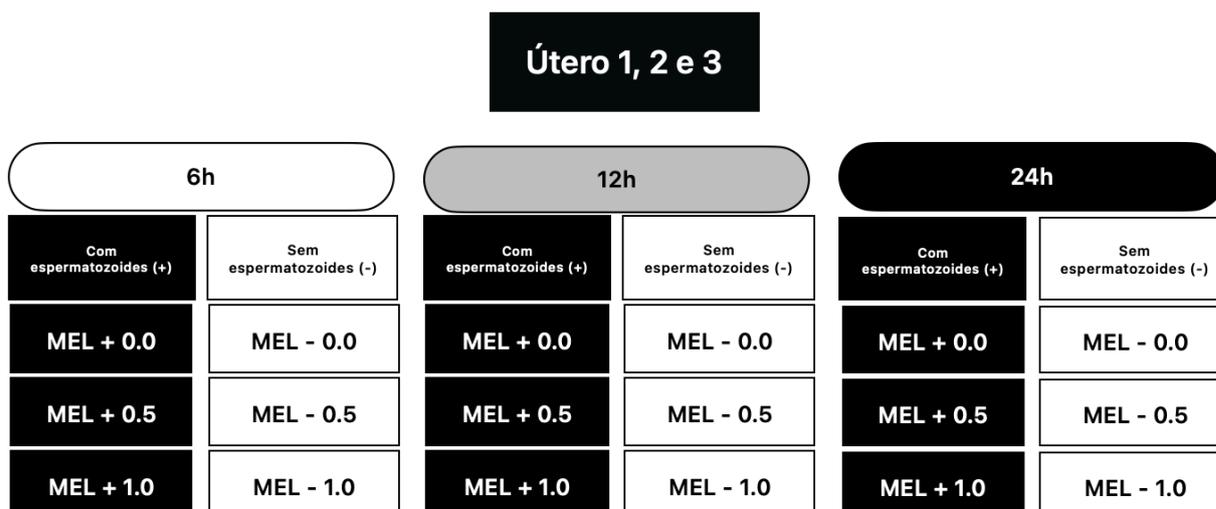


Fig. 4. Distribuição dos explantes uterinos derivados de três peças obtidas em abatedouro/frigorífico, sendo submetidos aos tratamentos de melatonina com suspensão espermática (MEL +) ou sem suspensão espermática (MEL -) nas concentrações de 0,0 mmol.L⁻¹ (MEL + 0,0 e MEL - 0,0), 0,5 mmol.L⁻¹ (MEL + 0,5 e MEL - 0,5) e 1 mmol.L⁻¹ (MEL + 1,0 e MEL - 1,0). O tempo de cultivo foi de 6, 12 e 24 horas em incubadora de cultivo regulada a 38°C, com mistura gasosa de 5% de O₂ e 5% CO₂ sob umidade saturada.

Fonte: Autor, 2023.

Extração e transcrição reversa do RNAm

O RNA foi extraído de 60 mg de tecido uterino em coluna de extração e purificação de RNA por centrifugação em coluna de sílica. Os procedimentos foram de acordo com as orientações do fabricante (SV Total RNA Isolation System[®] PROMEGA[®], Wisconsin, EUA). No entanto, antes da introdução do tecido na solução de lise, o tecido congelado a - 80°C foi fatiado com uma lâmina de bisturi em pequenos fragmentos e, posteriormente, depositado em solução de lise. O tecido foi totalmente desintegrado na solução de lise por meio de uma seringa acoplada a uma agulha 18 G e, posteriormente, com uma 21 G de calibre. O RNAm foi eluído em 100 µL em H₂O ultrapura. A transcrição reversa foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (MultiScribe[®], Applied Biosystems, THERMOFISCHER SCIENTIFIC, EUA).

Tanto o RNAm, quanto o cDNA foi mensurado por medição fotométrica (NanoDrop[®], THERMOFISCHER SCIENTIFIC, EUA) (Apêndice A e Apêndice B). A diluição 1:10, sendo, 1 parte do cDNA eluído em 9 partes H₂O ultrapura foi estocada para a amplificação no PCR quantitativo em tempo real.

PCR quantitativo em tempo real

Os oligonucleotídeos iniciadores das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-1RN, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , e β -Actina (gene de referência) foram compilados de Fedorka e colaboradores (2016) (Tab.2.).

Tab. 2. Gene, número de acesso (GenBank – NCBI®) e a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (F= *Forward*; R= *Reverse*) dos genes IL1- β , IL1-RN, IL-6, IL8, IL-10, TNF- α e β -Actina (gene de referência), utilizados para a expressão gênica em explantes uterinos extraídos de três peças uterinas de éguas e cultivadas por 6, 12 e 24 horas

Gene	GenBank® - Nº de acesso	Sequências
(IL-1 β)	NM_001082526.1	F → CCGACACCAGTGACATGATGA R → ATCCTCCTCAAAGAACAGGTCATTC
(IL-6)	NM_001082496.2	F → GGATGCTTCCAATCTGGGTTCAAT R → TCCGAAAGACCAGTGGTGATTTT
(IL-8)	AB035735.1	F → GCCGTCTTCCTGCTTTCTG R → CCGAAGCTCTGCAGTAATTCTTGAT
TNF- α	*AB035735.1	F → TTACCGAATGCCTTCCAGTCAAT R → GGGCTACAGGCTTGTCACCTT
(IL-1RN)	XM_005599766.3	F → AGTTGCTGGATACTTGCAAGAATCA R → GAGTCCCAGGAATAGAGCATCAG
(IL-10)	NM_001082490.1	F → ATGCCCCAGGCTGAGAAC R → CGGAGGGTCTTCAGCTTTTCC
β -Actina	NM_001163856.1	F → CTGGACTTCGAGCAGGAGATG R → CGTCGGGCAGCTCGTA

Fonte: Adaptado de FEDORKA et al. (2017).

A concentração dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados foi de 200 nM (*forward* e *reverse*). O PCR quantitativo em tempo real foi realizado com volume final de 10 μ L, realizado de acordo com as orientações do fabricante. (PCR Master Mix (PROMEGA, Wisconsin, EUA). O perfil do programa utilizado para a amplificação foi de 95 °C por 10 minutos no início, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos, e 30 segundos para o anelamento, e a extensão a 60 °C por 30 segundos. A temperatura de anelamento de todos os genes foi de 60 °C. O termociclador CFX96 real-time PCR® (BIO-RAD LABORATORIES®, INC., EUA) foi utilizado para as aplicações.

Análise estatística

No Experimento 1, a viabilidade celular foi determinada através da análise de citotoxicidade obtida das triplicatas dos espectros das absorbâncias, de acordo a orientação do fabricante do Kit da Lactato desidrogenase. Os valores percentuais foram transformados em raiz quadrada, a fim de obedecer aos pressupostos para análise paramétrica. A ANOVA foi realizada, seguido do teste de comparação de médias Tukey. Foi adotado 5% ($P < 0,05$) como nível de significância. O pacote estatístico SAS® OnDemand (*System Analysis Statistics*, Inc., Cary, NC, EUA) foi utilizado para a inferência estatística.

As expressões relativas das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RN e TNF- α (Experimento 2) foram calculadas no software Gene Study® (BIO-RAD LABORATORIES®, INC., EUA) contra o gene de referência (β -actina). O efeito dos tratamentos sobre a expressão relativa dos genes-alvo foi analisado por ANOVA obedecendo pressupostos para análise paramétrica. Os efeitos da indução inflamatória, concentração de melatonina e interação entre eles foram utilizados como efeitos fixos do modelo estatístico e o útero como efeito aleatório. As diferenças entre grupos foram estabelecidas pelo teste de Tukey-HSD. A normalidade e homoscedasticidade foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados estão representados como média corrigida (*least squares corrected means*) e erro padrão da média. As análises foram realizadas com o

software JMP Pro (JMP Statistical Discovery LLC). Foi adotado 5% ($P < 0,05$) como nível de significância.

RESULTADOS

Experimento 1:

Houve um efeito inverso em dose-resposta das concentrações de melatonina sobre a sobrevivência celular a partir de 1 mMol.L⁻¹. Os maiores percentuais de viabilidade celular foram obtidos das concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹ e 1 mMol.L⁻¹, e corresponderam a 98,3% ($\pm 2,3$) e 97,0% ($\pm 2,3$), respectivamente, sendo similares entre si ($P > 0,05$). Entretanto, as concentrações de 2, 4 e 8 mMol.L⁻¹ apresentaram um menor percentual de células viáveis em relação às menores concentrações testadas, e corresponderam em 66,3% ($\pm 2,3$), 43,0% ($\pm 2,3$) e 4,0% ($\pm 2,34$), respectivamente. A concentração de 2 mMol.L⁻¹ apresentou um maior percentual de células em comparação às concentrações de 4 mMol.L⁻¹ e 8 mMol.L⁻¹ ($P > 0,05$). A concentração de 8 mMol.L⁻¹ foi a que determinou um menor percentual de células viáveis ($P > 0,05$) (Fig. 5.)

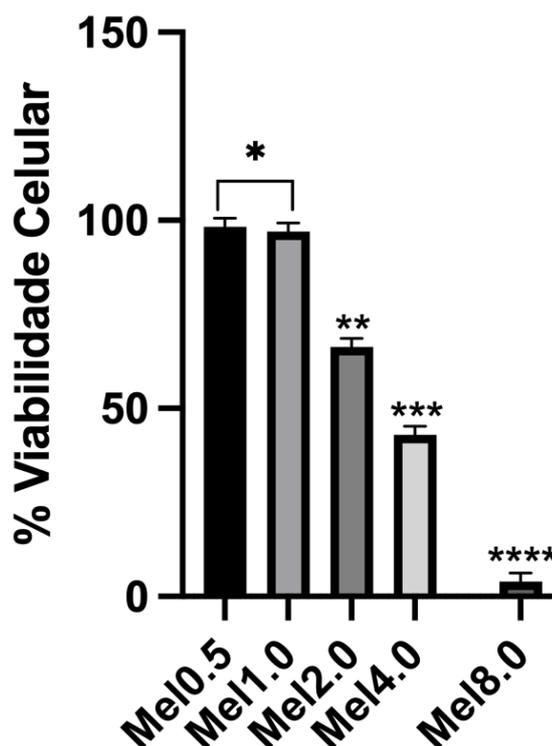


Fig. 5. Citotoxicidade da melatonina em células endometriais nas concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹ (MEL0.5), 1 mMol.L⁻¹ (MEL1.0), 2 mMol.L⁻¹ (MEL2.0), 4 mMol.L⁻¹ (MEL4.0) e 8 mMol.L⁻¹ (MEL8.0), avaliado através da Lactato desidrogenase – (CYQUANT[®], LDH, C200300, Invitrogen, THERMOFISCHER SCIENTIFIC[®]).

(*) (**) (***) (****) - Asteriscos diferentes correspondem a uma diferença estatística ($P < 0,05$).

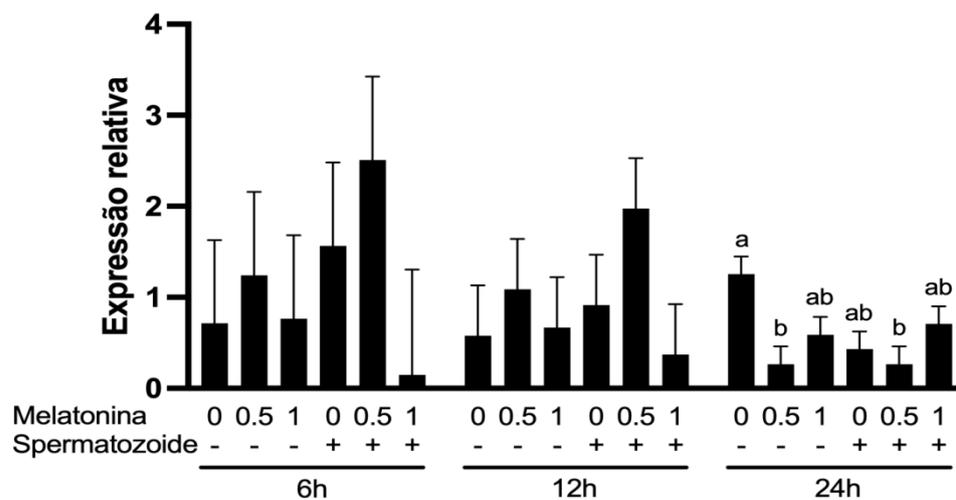
Fonte: Autor, 2023

Experimento 2:

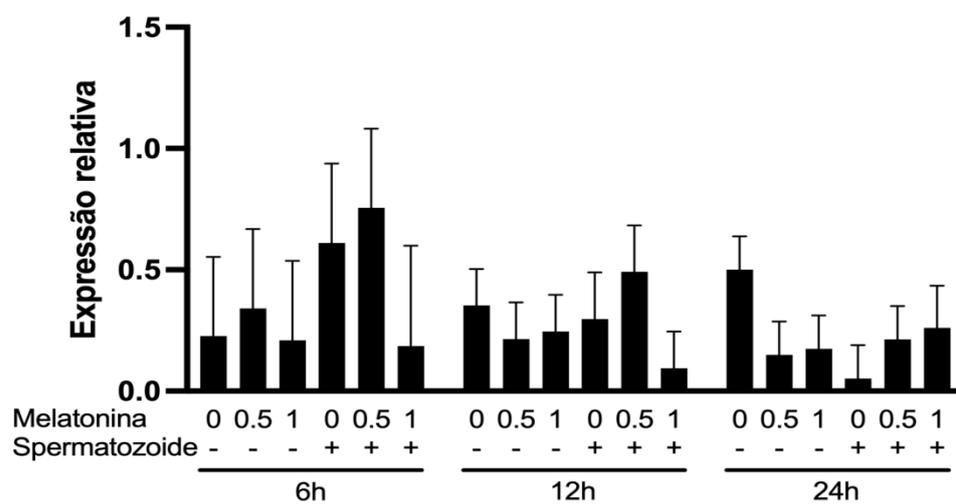
As médias corrigidas das expressões relativas da IL1- β entre todos os tratamentos nos períodos de 6 e 12 horas de cultivo não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$). Nas 12 horas de cultivo, o tratamento MEL-0,0 apresentou a maior expressão relativa que nos tratamentos MEL-0,5 e MEL+0,5 ($P < 0,05$). Entretanto, o MEL-0,0 não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos MEL-1,0, MEL+0,0 e MEL+1,0 ($P > 0,05$). Os tratamentos MEL-0,5, MEL-1,0, MEL+0,0, MEL+0,5 e MEL+1,0 também foram similares entre si ($P > 0,05$).

Os genes IL-1RN, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α não apresentaram diferença estatística entre os períodos de cultivo e entre os tratamentos ($P > 0,05$). (Fig.6).

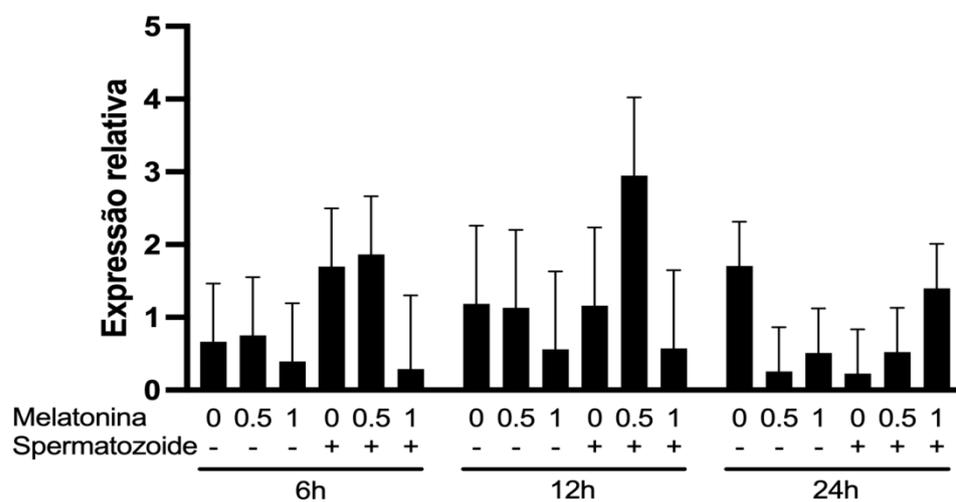
IL1- β



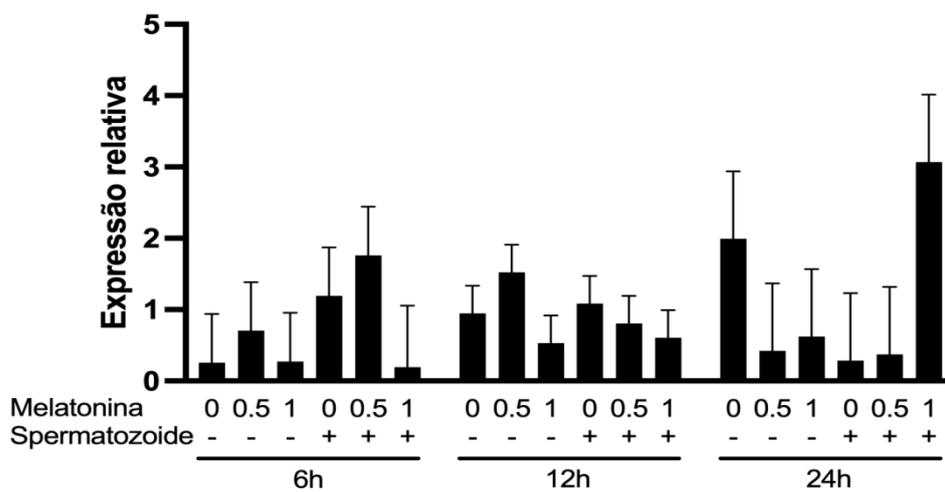
IL1-RN



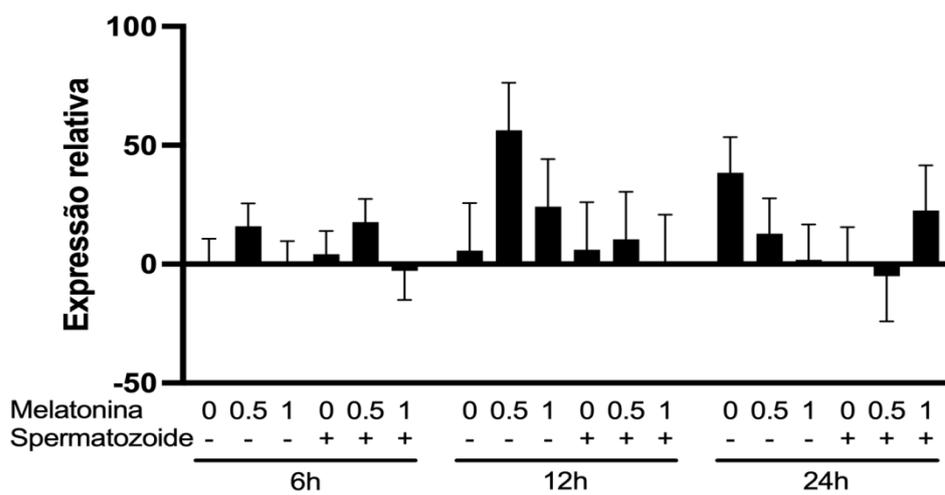
IL-6



IL-8



IL-10



TNF- α

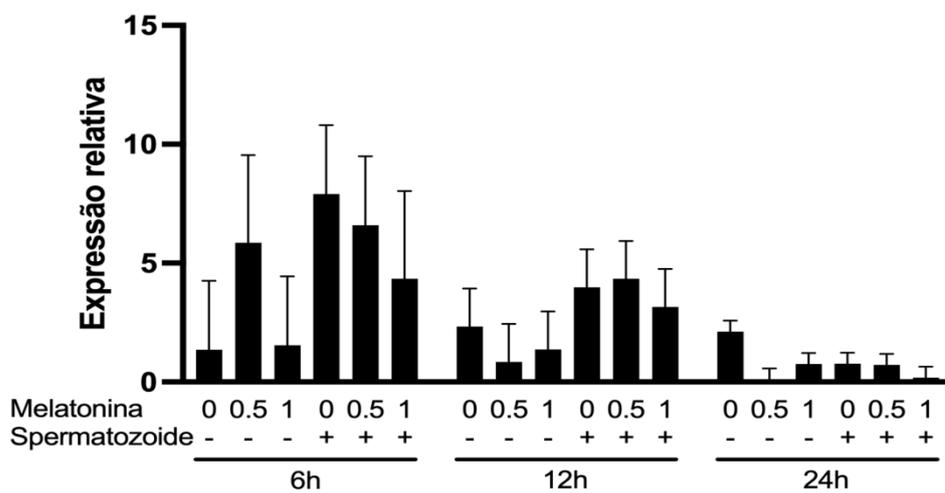


Fig.6. Médias corrigidas das expressões relativas dos genes IL1- β , IL1-RN, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α de explantes de útero equino submetidos aos tratamentos MEL – 0.0 (sem melatonina e sem espermatozoides), MEL – 0.5 (com 0,5 mMol.L⁻¹ de melatonina e sem espermatozoides), MEL – 1 (com 1 mMol.L⁻¹ de melatonina e sem espermatozoides), MEL + 0.0 (sem melatonina e com espermatozoides), MEL + 0.5 (com 0,5 mMol.L⁻¹ de melatonina e com espermatozoides), e MEL + 1 (com 1 mMol.L⁻¹ de melatonina e com espermatozoides). Os tempos de cultivo dos explantes foi de 6, 12 e 24 horas em estufa com 5% de CO₂, 5% de O₂ a 38°C.

Fonte: Autor, 2023.

DISCUSSÃO

As concentrações de melatonina utilizadas para determinar a citotoxicidade nas células endometriais foram as mesmas utilizadas por CHEN et al. (2020) em condrócitos de murinos. Os autores observaram que as concentrações de 4 mMol.L⁻¹ e 8 mMol.L⁻¹ apresentaram uma maior citotoxicidade em cultivo de condrócitos, avaliada pela atividade da lactato desidrogenase, ao passo que, 2 mMol.L⁻¹, 1 mMol.L⁻¹ e 0,5 mMol.L⁻¹ foram menores e similares entre si. Esses resultados corroboraram com os obtidos em nosso estudo, exceto para a concentração de 2 mMol.L⁻¹ que, na pesquisa supracitada, determinou uma citotoxicidade similar às menores concentrações testadas. As altas concentrações de melatonina promovem uma maior lesão celular com a consequente liberação de grande quantidade de substrato reagente da enzima do Kit (piruvato) ao meio, o que determina em uma maior absorbância.

O emprego de diferentes concentrações de melatonina em meios de cultivo vem determinando em resultados satisfatórios inerente ao bloqueio da cascata inflamatória em diferentes tecidos, e as concentrações utilizadas em várias pesquisas variam de 1 μ Mol a 8 mMol (BALAO DA SILVA et al., 2011; ZHANG et al., 2016; CHEN et al., 2020). A ampla variação da viabilidade celular obtida em nossa pesquisa (98% a 4%) reforça que a escolha das concentrações utilizadas contemplou efetivamente na análise de citotoxicidade exercida pela melatonina em células endometriais equinas.

Para tanto, no Experimento 2, as concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹ e 1 mMol.L⁻¹ de melatonina foram utilizadas para verificar o efeito do hormônio em explantes uterinos de éguas sobre as citocinas responsáveis pela dinâmica do processo

inflamatório na espécie (FUMUSO et al., 2003; WOODWARD et al., 2013). A fim de aumentar a intensidade da ação inflamatória no tecido cultivado, foram depositados 10^7 espermatozoides vivos/mortos por mililitro de meio de cultivo com as duas concentrações menos citotóxicas de melatonina (MEL+0.5 e MEL+1 → Controle positivo) e outro sem espermatozoides (MEL-0.5 e MEL-1 → Controle negativo). Contudo, não foi possível observarmos uma diferença na expressão relativa nas citocinas inflamatórias IL-6, IL-8, IL-10, IL-1RN e TNF- α nos explantes cultivados por 6, 12 e 24 horas de cultivo entre os tratamentos utilizados ($P > 0,05$), exceto a IL-1 β , nas 24 horas de cultivo, entre alguns tratamentos ($P < 0,05$).

A nossa hipótese era que o tratamento MEL+0,0 obtivesse uma maior expressão relativa de IL-1 β , porém, o resultado foi ao contrário. O MEL-0,0 foi a que apresentou a maior expressão de RNAm, em relação ao MEL-0,5 e MEL+0,5, mas similar entre os demais tratamentos. Esse resultado, embora controverso à nossa hipótese, pode estar relacionado conforme descrito na revisão de CARRILLO-VICO et al., (2013), onde a melatonina exerce ações paradoxais no sistema imunológico, sendo que os quais consideram como um “imunológico tampão”. Os autores descrevem que a indoleamina diminui a atividade anti-inflamatória, o que promove uma ação imunoestimulante, como o observado em situações de imunodepressão causado por corticoides, ou sobre o reflexo idade, e nos casos de intoxicação por metais pesados ou por outras patologias. Entretanto, também se comporta como um inibidor do estímulo imunológico pelo aumento da atividade anti-inflamatória, como o que acontece em processos inflamatórios crônicos e em transplantes. No entanto, para comprovar as colocações expostas pelos autores em células uterinas de éguas deveria de se usar o Luzindole, um antagonista de receptores de MT1 e MT2 de melatonina, ou de se utilizar células endometriais imortalizadas.

O tempo de 48 horas de cultivo poderia possibilitar uma maior recuperação tecidual e, por sua vez, resultaria em maior concentração de RNAm, pois, com a morte do animal inicia a degradação do RNA por ribonucleases, e o cultivo promove a recuperação das células com a posterior transcrição no tecido. DE BARROS (2019), em um estudo comparando o perfil de transcriptomas de explantes equinos cultivados *in vitro* e de biópsias uterinas, observou uma diferença significativa nas primeiras 24 horas de cultivo entre ambos, mas nas 48 horas foram similares. No mesmo estudo,

mas avaliando a concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ presente no meio, quando exposto as concentrações de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, observou uma menor concentração nos explantes; porém, após 48 horas, as concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foram similares ao das biópsias. Entretanto, resultados diferentes foram observados em explantes bovinos após a exposição a cepas das bactérias de *Escherichia coli* e *Trueperella pyogenes*, o que resultou em acúmulo de IL-1 β , IL-6 e IL-8 já nas 24 horas de cultivo (BORGES; HEALEY; SHELDON, 2012).

Há a possibilidade de a exposição aos espermatozoides (Controle positivo) não ter sido eficaz no aumento da intensidade inflamatória. Uma alternativa seria o uso de LPS, pois induzem à liberação de mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 β/α e IL-1 β (DUVAL et al., 2019). No entanto, NASH et al. (2010), utilizando explantes de endométrio equino, com a mesma concentração de espermatozoides (10^7 de vivos/mortos por mililitro), observaram maiores expressões de IL-8 e uma maior concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ presente no meio em tempo de cultivo de explantes cultivados de 24 a 72 horas em Solução de William's. Isso reforça que o cultivo dos explantes por mais de 24 horas poderia resultar em um perfil mais concreto da dinâmica das citocinas inflamatórias no estudo. O tempo de cultivo utilizado em nosso estudo se baseou de acordo com o tempo de transição entre a presença as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias de 6 horas (WOODWARD et al., 2013).

Há estudos que comprovam efeitos de proteção executada pela melatonina antes da administração do agente nocivo, como no caso de glicorticoides em cartilagens (YANG et al., 2017b), e exposição a fluoreto de sódio para a ação oxidante na mucosite em camundongos (ORTIZ et al., 2015). O cultivo dos explantes expostos à melatonina por 24 horas e, posteriormente, adicionados os espermatozoides ou a molécula nociva, cultivando-os por até 48 horas poderia resultar em efeito de proteção.

A melatonina apresenta a capacidade de minimizar ou de até atenuar a atividade das vias inflamatórias responsáveis pela persistência do processo inflamatório (ORTIZ et al., 2015; ZHANG et al., 2016; CHEN et al., 2020). Entretanto, no nosso delineamento experimental e nos experimentos, não foi possível de verificar essa capacidade.

CONCLUSÃO

Concluimos que as concentrações de 0,5 mMol.L⁻¹ e 1 mMol.L⁻¹ de melatonina são as menos citotóxicas para células endometriais equinas, em que não foi possível de verificar a ação da indoleamina mediante à intensificação da indução inflamatória com espermatozoides em explantes de uterinos de éguas cultivados em 6, 12 e 24 horas.

REFERÊNCIAS

BALAO DA SILVA, C. M. et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 2, p. 172–179, 2011.

BORGES, Á. M.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Explants of Intact Endometrium to Model Bovine Innate Immunity and Inflammation Ex Vivo. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 6, p. 526–539, 2012.

BROCKUS, K. E. et al. Dietary melatonin alters uterine artery hemodynamics in pregnant Holstein heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 1–10, 2016.

CHEN, F. et al. Melatonin alleviates intervertebral disc degeneration by disrupting the IL-1 β /NF- κ B-NLRP3 inflammasome positive feedback loop. **Bone Research**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41413-020-0087-2>>.

CHRISTOFFERSEN, M. et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 41, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/41>>.

DE BARROS, M. R. M. The ex vivo and in vitro transcriptomic profiles of equine endometrium using an explant model to further study endometritis. n. May, 2019.

DUVAL, C. et al. Differential effect of LPS and IL-1 β in term placental explants. **Placenta**, v. 75, n. November 2018, p. 9–15, 2019.

FAVERO, G. et al. Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. **International Journal of Endocrinology**, v. 2017, p. 17–19, 2017.

FEDORKA, C. E. et al. The effect of select seminal plasma proteins on endometrial mRNA cytokine expression in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 1, p. 89–96, 2017.

FIALA, S. M. da E. Transporte espermático e resposta inflamatória uterina na égua após inseminação com diferentes concentrações de espermatozóides. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p. 159, 2004.

FUMUSO, E. et al. Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 1–2, p. 31–41, 2003.

NASH, D. et al. Endometrial explant culture for characterizing equine endometritis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, n. 2, p. 105–117, 2008.

NASH, D. M. et al. Endometrial explant culture to study the response of equine endometrium to insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 4, p. 670–676, 2010.

ORTIZ, F. et al. Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 1, p. 34–49, 2015.

PAL, S.; HALDAR, C.; VERMA, R. Melatonin attenuates LPS-induced ovarian toxicity via modulation of SIRT-1, PI3K/pAkt, pErk1/2 and NF κ B/COX-2 expressions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 451, n. May, 2022.

RIDDLE, W. T.; LEBLANC, M. M.; STROMBERG, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 395–402, 2007.

SHARKEY, J. T. et al. Melatonin synergizes with oxytocin to enhance contractility of human myometrial smooth muscle cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 2, p. 421–427, 2009.

TROEDSSON, M. H. T. Breeding-Induced Endometritis in Mares. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 705–712, 2006.

WOODWARD, E. M. et al. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 495–501, 2012.

WOODWARD, E. M. et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Reproduction**, v. 145, n. 3, p. 289–296, 2013.

WU, H. M. et al. TLR2-Melatonin Feedback Loop Regulates the Activation of NLRP3 Inflammasome in Murine Allergic Airway Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–13, 2020.

YANG, W. et al. Melatonin protects chondrocytes from impairment induced by glucocorticoids via NAD⁺-dependent SIRT1. **Steroids**, v. 126, n. April, p. 24–29, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.08.005>>.

ZHANG, Y. et al. Improved development by melatonin treatment after vitrification of mouse metaphase II oocytes. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 335–342, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.09.171>>.

ZHAO, J. et al. Melatonin protect the development of preimplantation mouse embryos from sodium fluoride-induced oxidative injury. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. March, p. 133–141, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.014>>.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão de receptores de membrana MT1 e MT2 de melatonina no útero de éguas é inédito, o que evidencia uma possível ação local regulatória que, baseado ao visto em pesquisas com outras espécies, pode resultar em mecanismos regulatórios e de proteção. Esse hormônio vem sendo implicado no bloqueio da cascata inflamatória em vários tecidos submetidos à persistência do processo inflamatório, seja aquela desencadeada por lipopolissacarídeos bem como por outras substâncias nocivas, ou, até mesmo, por apresentarem um distúrbio da atividade inflamatória espontânea. No entanto, é necessário constatar fisicamente a presença dos receptores no endométrio, o que poderia ser realizado pelo uso de imunohistoquímica.

A determinação das concentrações que exibiram menor citotoxicidade celular realizada nessa pesquisa propiciará como ponto de partida para outros estudos relacionados ao uso da melatonina no útero de éguas. A ampla variação de viabilidade celular obtida deixa claro a partir de quais doses deverão ser testadas, pelo menos em meio de cultivo de celular.

Embora não tenha sido possível observar com clareza a ação da melatonina em explantes cultivados por até 24 horas, submetidos à intensificação do processo inflamatório com espermatozoides, não significa que o hormônio não possa exercer algum efeito sobre os mediadores inflamatórios conhecidos no útero da espécie. Nesse contexto, a inserção de algumas hipóteses para estudos futuros, a partir do embasamento obtido nessa pesquisa, poderia ser realizada. Talvez o prolongamento do tempo de cultivo dos explantes por até 48 horas em melatonina, administrando a mesma concentração de espermatozoides a partir de 24 horas, poderia resultar uma proteção que se refletiria na expressão dos mediadores inflamatórios, pois proteção exercida já é bem conhecida. Outra forma seria o uso de células imortalizadas de endométrio equino, o que poderia refletir com mais segurança e determinando menor variabilidade nas expressões gênicas relativas, mesmo que utilizando o delineamento experimental realizado nesse estudo com explantes.

Enfim, a espécie equina, por apresentar uma atividade reprodutiva influenciada pelo fotoperíodo, sobretudo, mediante a ação da melatonina, reforça essa linha de

pesquisa, mas no sentido de verificar os impactos locais em tecidos reprodutivos, principalmente quando submetidos a diferentes tipos de injúrias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIOZ, B. I. et al. Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JUL, 2019.

BALAO DA SILVA, C. M. et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 2, p. 172–179, 2011.

BORGES, Á. M.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Explants of Intact Endometrium to Model Bovine Innate Immunity and Inflammation Ex Vivo. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 6, p. 526–539, 2012.

BROCKUS, K. E. et al. Dietary melatonin alters uterine artery hemodynamics in pregnant Holstein heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 1–10, 2016.

CARRILLO-VICO, A. et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: Regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 4, p. 400–408, 2005.

CARRILLO-VICO, A. et al. Melatonin: Buffering the immune system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 8638–8683, 2013.

CHEN, F. et al. Melatonin alleviates intervertebral disc degeneration by disrupting the IL-1 β /NF- κ B-NLRP3 inflammasome positive feedback loop. **Bone Research**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41413-020-0087-2>>.

CHRISTOFFERSEN, M. et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 41, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/41>>.

DE BARROS, M. R. M. The ex vivo and in vitro transcriptomic profiles of equine endometrium using an explant model to further study endometritis. n. May, 2019.

DIRANDEH, E.; ANSARI-PIRSARAEI, Z.; THATCHER, W. Melatonin as a Smart Protector of Pregnancy in Dairy Cows. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2022.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A. et al. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. **Journal of Pineal Research**, v. 49, n. 1, p. 14–22, 2010.

DUAN, H. et al. β -Estradiol inhibits melatonin synthesis and melatonin receptor expression in sheep granulosa cells. **Gene**, v. 814, n. September 2021, p. 146128, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146128>>.

DUVAL, C. et al. Differential effect of LPS and IL-1 β in term placental explants. **Placenta**, v. 75, n. November 2018, p. 9–15, 2019.

ERBAŞ, O. et al. Comparison of melatonin and oxytocin in the prevention of critical illness polyneuropathy in rats with experimentally induced sepsis. **Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 1, p. 313–320, 2013.

FAVERO, G. et al. Melatonin: Protection against age-related cardiac pathology. **Ageing Research Reviews**, v. 35, p. 336–349, 2017a.

FAVERO, G. et al. Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammation Activation. **International Journal of Endocrinology**, v. 2017, p. 17–19, 2017b.

FEDORKA, C. E. et al. The effect of select seminal plasma proteins on endometrial mRNA cytokine expression in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 1, p. 89–96, 2017.

FIALA, S. M. da E. Transporte espermático e resposta inflamatória uterina na égua após inseminação com diferentes concentrações de espermatozoides. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p. 159, 2004.

FUMUSO, E. et al. Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 1–2, p. 31–41, 2003.

GONZÁLEZ-ARTO, M. et al. Melatonin MT1 and MT2 receptors in the ram reproductive tract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 1–15, 2017.

KELLER, A. et al. Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 3, p. 215, 2018.

KVETNOY, I. M. Extrapineal melatonin: Location and role within diffuse neuroendocrine system. **Histochemical Journal**, v. 31, n. 1, p. 1–12, 1999.

MORITANI, C. et al. Isolation of activating factors of serotonin N -acetyltransferase from rice peptides. **Journal of Functional Foods**, v. 41, n. September 2017, p. 148–154, 2018.

NASH, D. et al. Endometrial explant culture for characterizing equine endometritis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, n. 2, p. 105–117, 2008.

NASH, D. M. et al. Endometrial explant culture to study the response of equine endometrium to insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 4, p. 670–676, 2010.

OCHOA, J. J. et al. Melatonin supplementation ameliorates oxidative stress and inflammatory signaling induced by strenuous exercise in adult human males. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 4, p. 373–380, 2011.

OLCESE, J.; BEESLEY, S. **Clinical significance of melatonin receptors in the human myometrium** *Fertility and Sterility* Elsevier Inc., , 2014. .

ORTIZ, F. et al. Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 1, p. 34–49, 2015.

PAL, S.; HALDAR, C.; VERMA, R. Melatonin attenuates LPS-induced ovarian toxicity via modulation of SIRT-1, PI3K/pAkt, pErk1/2 and NFκB/COX-2 expressions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 451, n. May, 2022.

PENG, Z. et al. Melatonin attenuates airway inflammation via SIRT1 dependent inhibition of NLRP3 inflammasome and IL-1β in rats with COPD. **International Immunopharmacology**, v. 62, n. April, p. 23–28, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.033>>.

PFEFFER, M.; KORF, H. W.; WICHT, H. Synchronizing effects of melatonin on diurnal and circadian rhythms. **General and Comparative Endocrinology**, v. 258, p. 215–221, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.05.013>>.

RIDDLE, W. T.; LEBLANC, M. M.; STROMBERG, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 395–402, 2007.

SHARKEY, J. T. et al. Melatonin synergizes with oxytocin to enhance contractility of human myometrial smooth muscle cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 2, p. 421–427, 2009.

SHIU, S. Y. W. et al. Melatonin MT1 receptor-induced transcriptional up-regulation of p27Kip1 in prostate cancer antiproliferation is mediated via inhibition of constitutively active nuclear factor kappa B (NF-κB): Potential implications on prostate cancer chemoprevention and . **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 69–79, 2013.

TILG, H. et al. Interleukin-6 (IL-6) as an Anti-inflammatory Cytokine: Induction of Circulating IL-1 Receptor Antagonist and Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor p55. **Blood**, v. 83, n. 1, p. 113–118, 1994.

TROEDSSON, M. H. T. et al. Interaction between equine semen and the endometrium: The inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3–4, p. 273–278, 2001.

TROEDSSON, M. H. T. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1- 4 SPEC. ISS., p. 171–186, 2005.

TROEDSSON, M. H. T. Breeding-Induced Endometritis in Mares. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 705–712, 2006.

TROEDSSON, M. H. T.; WOODWARD, E. M. Our current understanding of the

pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 1, p. 8–12, 2016.

VENEROSO, C. et al. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. **Journal of Pineal Research**, v. 47, n. 2, p. 184–191, 2009.

WADDELL, B. J. et al. A rhythmic placenta? Circadian variation, clock genes and placental function. **Placenta**, v. 33, n. 7, p. 533–539, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.03.008>>.

WICHMANN, M. W. et al. Melatonin administration attenuates depressed immune functions trauma-hemorrhage. **The Journal of surgical research**, v. 63, n. 1, p. 256–262, 1996.

WOODWARD, E. M. et al. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 495–501, 2012.

WOODWARD, E. M. et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Reproduction**, v. 145, n. 3, p. 289–296, 2013.

WU, H. M. et al. TLR2-Melatonin Feedback Loop Regulates the Activation of NLRP3 Inflammasome in Murine Allergic Airway Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–13, 2020.

YANG, M. et al. Exogenous melatonin reduces somatic cell count of milk in Holstein cows. **Scientific Reports**, v. 7, n. November 2016, p. 1–7, 2017a.

YANG, W. et al. Melatonin protects chondrocytes from impairment induced by glucocorticoids via NAD⁺-dependent SIRT1. **Steroids**, v. 126, n. April, p. 24–29, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.08.005>>.

ZHANG, Y. et al. Improved development by melatonin treatment after vitrification of mouse metaphase II oocytes. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 335–342, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.09.171>>.

ZHAO, J. et al. Melatonin protect the development of preimplantation mouse embryos from sodium fluoride-induced oxidative injury. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. March, p. 133–141, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.014>>.

8 APÊNDICES

Apêndice A. Concentração (ng/ μ L) de ácido RNA dos explantes utilizados (Artigo 2 Experimento 2).**Tab. 3.** Concentração de RNA (ng/ μ L), e relação A260/280 e 260/230 dos explantes derivados de três peças uterinas, cultivados em Solução de William's por 6, 12 e 24 horas, suplementada com melatonina e adicionada com uma suspensão espermática 10 milhões de espermatozoides vivos e mortos/mL (MEL +) ou sem espermatozoides (MEL -) nas concentrações de 0,0 mmol.L⁻¹ (MEL + 0 e MEL - 0), 0,5 mmol.L⁻¹ (MEL + 0,5 e MEL - 0,5) e 1 mmol.L⁻¹ (MEL + 1,0 e MEL - 1,0). Medição Fotométrica realizada em Nanodrop® (Thermocientific, modelo 840274100).

Tratamentos	Peça uterina	Período	ng/ μ L	A260/A280	A260/A230
MEL - 0	U1	6 horas	478,50	2,11	2,16
MEL - 0,5	U1	6 horas	300,50	2,06	2,13
MEL - 1	U1	6 horas	126,70	2,04	1,85
MEL - 0	U2	6 horas	406,80	2,09	1,36
MEL - 0,5	U2	6 horas	137,00	2,04	0,14
MEL - 1	U2	6 horas	122,40	2,13	0,78
MEL - 0	U3	6 horas	236,40	2,06	1,24
MEL - 0,5	U3	6 horas	156,10	2,08	0,95
MEL - 1	U3	6 horas	226,10	2,09	1,35
MEL + 0	U1	6 horas	165,60	1,97	1,59
MEL + 0,5	U1	6 horas	459,30	2,01	1,83
MEL + 1	U1	6 horas	57,50	2,08	0,42
MEL + 0	U2	6 horas	197,70	2,07	1,09
MEL + 0,5	U2	6 horas	162,80	2,01	1,30
MEL + 1	U2	6 horas	289,10	2,04	1,62
MEL + 0	U3	6 horas	268,00	2,04	1,94
MEL + 0,5	U3	6 horas	223,00	2,06	1,59
MEL + 1	U3	6 horas	673,90	2,06	2,18
MEL - 0	U1	12 horas	749,40	1,99	1,43
MEL - 0,5	U1	12 horas	131,60	1,92	1,68
MEL - 1	U1	12 horas	292,90	1,99	0,68
MEL - 0	U2	12 horas	349,90	2,06	1,74
MEL - 0,5	U2	12 horas	386,10	2,05	1,74
MEL - 1	U2	12 horas	488,30	1,05	1,44
MEL - 0	U3	12 horas	199,50	2,03	0,57
MEL - 0,5	U3	12 horas	314,40	2,00	1,45
MEL - 1	U3	12 horas	297,90	2,02	0,83
MEL + 0	U1	12 horas	159,30	1,98	0,61
MEL + 0,5	U1	12 horas	279,40	1,99	1,25

MEL + 1	U1	12 horas	204,00	1,95	1,94
MEL + 0	U2	12 horas	276,70	1,97	2,17
MEL + 0,5	U2	12 horas	443,10	2,02	2,07
MEL + 1	U2	12 horas	167,70	2,04	1,95
MEL + 0	U3	12 horas	113,50	1,99	1,72
MEL + 0,5	U3	12 horas	246,10	2,02	2,00
MEL + 1	U3	12 horas	134,50	1,99	2,05
MEL - 0	U1	24 horas	261,10	1,96	1,35
MEL - 0,5	U1	24 horas	88,60	2,02	0,67
MEL - 1	U1	24 horas	105,90	1,98	0,45
MEL - 0	U2	24 horas	192,10	2,00	1,6
MEL - 0,5	U2	24 horas	376,20	1,99	1,04
MEL - 1	U2	24 horas	159,10	2,04	1,87
MEL - 0	U3	24 horas	121,50	2,04	1,87
MEL - 0,5	U3	24 horas	327,60	1,98	2,21
MEL - 1	U3	24 horas	315,90	1,94	2,22
MEL + 0	U1	24 horas	212,70	1,98	2,00
MEL + 0,5	U1	24 horas	176,20	1,99	2,00
MEL + 1	U1	24 horas	109,30	1,97	0,91
MEL + 0	U2	24 horas	222,00	2,05	1,74
MEL + 0,5	U2	24 horas	120,80	1,98	1,64
MEL + 1	U2	24 horas	238,80	1,98	1,96
MEL + 0	U3	24 horas	207,20	1,93	2,24
MEL + 0,5	U3	24 horas	200,20	1,99	2,18
MEL + 1	U3	24 horas	153,00	2,00	1,69

Fonte: Autor, 2023.

Apêndice B. Concentração (ng/μL) de cDNA dos explantes utilizados (Artigo 2 – Experimento 2).

Tab. 4. Concentração de DNA (ng/μL), e relação A260/280 e 260/230 dos explantes derivados de três peças uterinas, cultivados em Solução de William's por 6, 12 e 24 horas, suplementada com melatonina e adicionada com uma suspensão espermática 10 milhões de espermatozoides vivos e mortos/mL (MEL +) ou sem espermatozoides (MEL -) nas concentrações de 0,0 mmol.L⁻¹ (MEL + 0 e MEL - 0), 0,5 mmol.L⁻¹ (MEL + 0,5 e MEL - 0,5) e 1 mmol.L⁻¹ (MEL + 1,0 e MEL - 1,0). Medição Fotométrica realizada em Nanodrop® (Thermocientific, modelo 840274100).

Tratamentos	Peça uterina	Período	ng/μL	A260/A280	A260/A230
MEL - 0	U1	6 horas	267,48	1,90	2,40
MEL - 0,5	U1	6 horas	221,17	1,88	2,36
MEL - 1	U1	6 horas	131,44	1,85	2,37
MEL - 0	U2	6 horas	234,29	1,88	2,21
MEL - 0,5	U2	6 horas	226,28	1,87	0,91
MEL - 1	U2	6 horas	173,06	1,86	2,20
MEL - 0	U3	6 horas	213,30	1,87	2,24
MEL - 0,5	U3	6 horas	231,40	1,87	2,23
MEL - 1	U3	6 horas	288,80	1,88	2,31
MEL + 0	U1	6 horas	296,55	1,89	2,35
MEL + 0,5	U1	6 horas	273,21	1,87	2,33
MEL + 1	U1	6 horas	235,43	1,87	2,43
MEL + 0	U2	6 horas	266,73	1,87	2,25
MEL + 0,5	U2	6 horas	198,32	1,86	2,28
MEL + 1	U2	6 horas	67,85	1,40	1,60
MEL + 0	U3	6 horas	271,58	1,88	2,36
MEL + 0,5	U3	6 horas	236,45	1,87	2,31
MEL + 1	U3	6 horas	254,41	1,88	2,36
MEL - 0	U1	12 horas	253,54	1,89	2,13
MEL - 0,5	U1	12 horas	224,11	1,88	2,37
MEL - 1	U1	12 horas	186,39	1,87	2,01
MEL - 0	U2	12 horas	225,64	1,88	2,32
MEL - 0,5	U2	12 horas	257,12	1,88	2,32
MEL - 1	U2	12 horas	225,38	1,87	2,10
MEL - 0	U3	12 horas	255,01	1,87	2,10
MEL - 0,5	U3	12 horas	273,14	1,88	2,28
MEL - 1	U3	12 horas	205,07	1,87	2,06
MEL + 0	U1	12 horas	257,00	1,87	2,15
MEL + 0,5	U1	12 horas	231,34	1,87	2,25
MEL + 1	U1	12 horas	244,09	1,87	2,38
MEL + 0	U2	12 horas	170,49	1,86	2,36
MEL + 0,5	U2	12 horas	226,98	1,87	2,34
MEL + 1	U2	12 horas	223,55	1,87	2,37

MEL + 0	U3	12 horas	213,38	1,96	2,37
MEL + 0,5	U3	12 horas	262,23	1,88	2,36
MEL + 1	U3	12 horas	137,54	1,85	2,36
MEL - 0	U1	24 horas	117,23	1,85	2,19
MEL - 0,5	U1	24 horas	189,30	1,86	2,24
MEL - 1	U1	24 horas	155,16	1,86	1,96
MEL - 0	U2	24 horas	139,06	1,86	2,32
MEL - 0,5	U2	24 horas	115,87	1,86	2,05
MEL - 1	U2	24 horas	57,24	1,86	2,45
MEL - 0	U3	24 horas	96,16	1,85	2,41
MEL - 0,5	U3	24 horas	103,85	1,84	2,41
MEL - 1	U3	24 horas	81,29	1,84	2,39
MEL + 0	U1	24 horas	140,42	1,85	2,34
MEL + 0,5	U1	24 horas	299,43	1,88	2,34
MEL + 1	U1	24 horas	108,66	1,84	2,21
MEL + 0	U2	24 horas	146,50	1,86	2,34
MEL + 0,5	U2	24 horas	140,08	1,87	2,40
MEL + 1	U2	24 horas	135,13	1,88	2,39
MEL + 0	U3	24 horas	145,42	1,88	2,39
MEL + 0,5	U3	24 horas	111,86	1,87	2,45
MEL + 1	U3	24 horas	171,49	1,88	2,14

Fonte: Autor, 2023.

Apêndice C: Composição dos meios:

Apêndice C1: Fator de crescimento epidermal (EGF) – Solução estoque.

O volume de 50 µG de Fator de crescimento epidermal (SRP3196, Sigma Aldrich®) foi reconstituído em 1000 µL de água ultrapura estéril, resultando no volume final de 50 µG/mL. A solução foi estocada em alíquotas de 100 µL a – 20 °C.

Apêndice C2: Meio de William's suplementado:

O meio de William's (livre de fenol vermelho, 500 mL, A1217601, ThermoFischer Cientific®) foi adicionado com 0,01 µG/mL de fator de crescimento epidermal (EGF) (SRP3196, Sigma Aldrich®) (Apêndice C), 0,1 mg/mL de

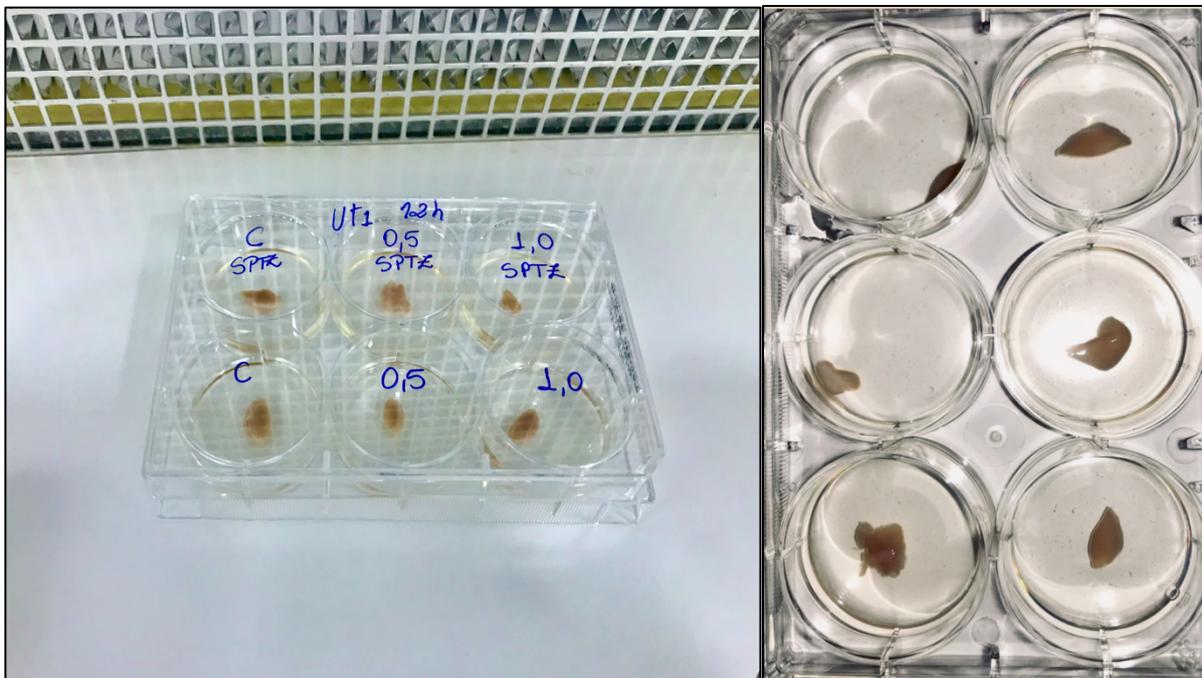
antibiótico+antimicótico 100 X ((Penicilina: 100UI/mL + Estreptomicina: 100µg/mL + Anfotericina B: 0,25µg/mL), 15240096, ThermoFischer Cientific®), 2 mM de L-glutamina (25030081, ThermoFischer Cientific®), 5 mL de insulina-transferina-selênio (ITS, Gibco, 100 X, 105242233, ThermoFischer Cientific®) e 50 mL, de soro fetal bovino (Invitrogen SFB, inativado em banho maria 500 mL, 10695023, ThermoFischer Cientific®). Abaixo, segue a composição resumida do exposto acima:

9 ANEXOS

Anexo A: Coleta de explante com *punch* dermatológico de 8 mm de diâmetro de uma das peças uterinas pelo acesso dorsal da curvatura maior.



Anexo B: Explantes em 4,25 mililitros de Solução de William's prontos para o cultivo em estufa com 5 % de CO₂, 5 % de O₂, 38 ° C sob umidade saturada.



Anexo C: Fatiamento do explante congelado com lâmina de bisturi (A) e deposição dos fragmentos e degradação com seringa de 3 mililitros acoplado a uma agulha de 18 G de diâmetro (B, C e D).

