

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LÍGIA GARCIA MESQUITA

**Bloqueio da fosforilação oxidativa no cultivo de
embriões bovinos**

Pirassununga

2005

LÍGIA GARCIA MESQUITA

Bloqueio da fosforilação oxidativa no cultivo de embriões bovinos

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Pirassununga

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

M582b Mesquita, Lígia Garcia
Bloqueio da fosforilação oxidativa no cultivo de embriões
bovinos / Lígia Garcia Mesquita – Pirassununga, 2005.
74 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos – Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

Unitermos: 1. Embriões bovinos 2. Potencial membrana
mitocondrial 3. Fosforilação oxidativa 4. Bloqueadores cadeia
respiratória 5. Morte celular programada I. Título.

Dedico:

Aos meus amados pais, **Carlos e Cidinha** inspirações de minha vida, meus “combustíveis” de amor com o qual me permitem fazer o impossível, pelo eterno amor, dedicação, apoio aos meus sonhos, compreensão e imensa sabedoria nos ensinamentos da vida.

Por vocês estou seguindo meus sonhos, pois posso contar com imenso amor de vocês, constante apoio, carinho, amizade e principalmente por vocês sempre me fortalecem nas horas difíceis e alegres de minha vida. Amo vocês!!!!

Aos meus amados irmãos, meus exemplos de determinação de vida e profissão, **Cíntia, Kátia e Carlos Eduardo** pelo constante apoio, dedicação, compreensão, atenção e amor.

A minha avó, **Augusta** pela crença em meu trabalho, rezas e amor infinito.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos**, por proporcionar a realização do Mestrado.

À **minha família**, pela constante preocupação com meu trabalho e comigo, ao amor incondicional e por compreenderem a distância e muitos meses de ausência, sempre me concedendo apoio emocional nos momentos difíceis em minha vida quando a saudade apertava.

À minha família pirassununguense e amigos **Alexandre (Alemão), Amaury, Felipe (Bрита), Isa, Kátia (você acha que eu ia esquecer dos puxões de orelha?), Martini, Marquinhos, Moyses, Pati, Paula, Paulo, Pedrinho, Raquel, Sancho, Sheila, Sylvia, Tiago** que sempre me consolavam naquelas horas de desespero do trabalho e momentos em que a saudade doía bastante.

Aos meus pais, **Carlos e Cidinha** que não me cansarei de agradecer pela eterna dedicação, amor, pelo apoio em todas as atitudes em minha vida, pelo respeito, pelo apoio emocional e financeiro nas épocas difíceis sem bolsa, pois sem vocês não conseguiria atingir meus ideais e sonhos. “Há pessoas que lutam um dia e são bons, Há outras que lutam um ano e são melhores, Há as que lutam muitos anos e são muito boas, Mas há as que lutam toda a vida e estas são imprescindíveis”.

À minha irmã **Kátia** por me agüentar quase todos os dias de minha vida, pelo telefone ou via computador, por chorar e rir junto com minhas conquistas e até em momentos de tristeza, por ser parte essencial de minha vida sempre, meu pedaço de mim, minha “irmã gêmea”.

Ao meu irmão **Carlos Eduardo**, meu saudoso e fiel companheiro de idéias, segredos e invenções, você sabe o quanto é especial em minha vida e sei que posso encontrar em você constante compreensão, amizade, amor, respeito e ajuda e nem sei como posso agradecer tudo o que você faz por mim.

A minha irmã **Cíntia** que apesar de termos opiniões bastante diferentes sobre muitas coisas, concordamos que nos amamos e que sempre estaremos prontas a nos ajudar e apoiar sempre.

Aos meus avós falecidos, **Lucinda, Salvador e Serafim**, meus anjos da guarda que me guiam em todos os meus caminhos.

Aos meus cunhados, **Andréa, Teo e Vado** pelo apoio e amizade.

Ao meu amado sobrinho **Thales**, que respeita e entende a minha ausência e que sempre tem um sorriso para me receber após tantos períodos de ausência.

Ao meu amado namorado **Amaury** por agüentar todas minhas preocupações, estresses, por me acompanhar em todas as minhas rotinas laboratoriais de finais de semana e noturnas, pelo companheirismo, amizade, dedicação, apoio em decisões e amor.

A minha fiel irmãzona de coração, **Pati**, que entrou em minha vida tão de repente e com um objetivo, de me fazer sorrir, de tornar nossas dificuldades em divertidas histórias. Não tenho palavras que possam retribuir e agradecer seu apoio, ajuda em meus experimentos, amizade e amor durante todo o meu mestrado.

A minha irmãzona **Isa** que folcloricamente me ensinou a frase que levarei em minha vida (eu???Eu não!!), por me ajudar a me adaptar em Pirassununga, pelas risadas proporcionadas e pela ajuda em meu trabalho de mestrado.

Aos amigos para todas as horas, **Paula e Sancho**, por me mostrarem a cada dia como são especiais e importantes em minha vida e por me fazerem acreditar que existe amizade sincera, pelo apoio em todas as etapas de meu mestrado e de minha vida aqui em Pirassununga.

As minhas eternas amigonas **Marcella Millazzoto (Maza) e Paula Lopes** pela eterna confiança em meu trabalho e em mim, pelo amor e amizade mesmo com a

distância que nos separa, além de estarem presentes em todas as fases de minha vida.

A amiga **Sylvia**, pela ajuda na correria das rotinas, pela troca de conhecimentos, ajuda nas horas difíceis, amizade, carinho e apoio.

Aos amigos e colegas, **Angélica, Fabiano, Laura, Rodrigo (Bugiu), Rodrigo, Sheilosa e tantos outros parceiros de festas.**

A todos **integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Morfo-fisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD)**, Adriana K. Tarouco, Adriana R. Oliveira, Alexandre Barreto, Aline S. M. César, Andrea B. V. José, Christina R. Ferreira, Cláudia L. V. Leal, Fabiana Bressan, Felipe C. Braga, Flávio P. Júnior, Giovana K. F. Merighe, Gisele Z. Mingotti, Helena J. Alves, Isabele P. Emanuelli, Kátia L. Schwartz, Minos E. de Carvalho, Marcos Roberto Chiaratti, Moisés S. Miranda, Nilton P. dos Santos, Paula Ripamonte Figueiredo, Paulo Adona, Patrícia M. Porciúncula, Pedro Ratto, Raquel Z. Puelker, Renata Camila Cabral, Silvia F. Carambula, Sylvia S. Cortezzi e Tiago H. C. de Bem. Agradeço pela contribuição que fizeram em minha vida científica e pessoal.

À minha colega **Silvia Carambula**, pessoa primordial em minha escolha pela vida acadêmica e pelo estímulo a ciência.

A **Giovana** por auxiliar em meu trabalho, pela ajuda, apoio na aprendizagem e execução das técnicas laboratoriais.

Ao **Prof. Dr. Júlio Balieiro**, grande exemplo de professor, sabedoria, simpatia e coleguismo, por sempre me auxiliar nos trabalhos estatísticos e pelos ensinamentos transmitidos.

À **Prof^a. Dr^a. Claudia Leal**, pelos conselhos, conhecimentos e ajuda no mestrado.

Ao **Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi** pelo exemplo de profissionalismo, de humildade, respeito e conhecimentos transmitidos.

À **Prof^a. Dr^a. Mariza Pires de Melo** pelos conhecimentos transmitidos sobre ROS e bioquímica em geral.

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de estudos.

A **todas as pessoas** que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Ao **Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles** pela orientação, ensinamentos e por ser exemplo e estímulo ao meu amor a ciência e pesquisa. Muito Obrigada!

A **Deus**, por me dar força para viver e pela vida.

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto”

(Thomas Huxley)

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”

(Chico Xavier)

“A força não está na capacidade física, mas sim em uma vontade indomável”

(Gandhi)

RESUMO

MESQUITA, L.G. **Bloqueio da fosforilação oxidativa no cultivo de embriões bovinos**. 74 f. 2006. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

Apesar da melhoria no sistema de produção e cultivo dos embriões *in vitro*, cerca de 60% dos oócitos que entram no sistema, não atingem o estágio de blastocisto e a qualidade dos embriões obtidos é bastante variável quando comparadas com embriões produzidos *in vivo*. Este bloqueio pode ser afetado por íons inorgânicos, tampões, aminoácidos e composição da atmosfera gasosa. Partindo-se da premissa que há influência da mitocôndria sobre a ativação da morte celular programada levou-nos a formular a hipótese que ausência de fragmentação nuclear nos embriões antes das 72 hpi está relacionada com a ausência do potencial de membrana mitocondrial e a inibição da OXPHOS pela utilização de bloqueadores leva a manutenção de baixos níveis de potencial de membrana mitocondrial e baixas taxas de fragmentação nuclear nos embriões. Embriões foram produzidos *in vitro* mediante maturação durante 22 horas, fecundação e cultivo 18 horas após a inseminação (hpi). Decorridas 24hpi realizou-se o cultivo com 0% de oxigênio, a fim de bloquear o processo de OXPHOS. Após 48 hpi realizou-se o *feeding* do meio de cultivo (SOF) com inibidores da OXPHOS (antimicina A e/ou oligomicina, cianeto de potássio) em diferentes doses. O número de embriões 8 células foi determinado às 80 hpi, mesmo momento em que foram realizadas as técnicas de JC-1 e TUNEL. Verificou-se as 168 hpi o efeito dos tratamentos no desenvolvimento embrionário. Os resultados obtidos com a inibição da OXPHOS após 48 hpi com oligomicina e/ou antimicina A nas doses utilizadas não alterou a capacidade do embrião atingir o estágio de 8 células. Entretanto, esta inibição inviabilizou o desenvolvimento até o estágio de blastocisto. O tratamento com KCN permitiu o desenvolvimento até o estágio de 8 células e a blastocisto em taxas semelhantes ao controle. A inibição do cultivo na ausência do O₂ inviabilizou o processo de cultivo. Já os resultados obtidos quanto ao Ψ_{mm} e TUNEL evidenciam que os tratamentos dos embriões antimicina e/ou oligomicina levaram a um aumento do Ψ_{mm} e fragmentação nuclear na maioria dos embriões testados. Portanto, não foi possível testar a hipótese de que o Ψ_{mm} é

necessário para o estabelecimento da MCP, todavia, foi observada uma correlação positiva entre Ψ_{mm} e fragmentação nuclear.

Palavras chave: embriões bovinos, potencial membrana mitocondrial, fosforilação oxidativa, bloqueadores cadeia respiratória, morte celular programada

ABSTRACT

MESQUITA, L.G. **Oxidative phosphorylation blockage of bovine culture embryos**. 74 f. 2006. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

Although *in vitro* embryo production has been improved in the last 2 decades, about 60% of the oocytes do not reach the blastocyst stage and embryo quality is very variable when compared with *in vivo* produced embryo. This developmental block can be affected by inorganic ions, buffers, aminoacids and gaseous atmosphere composition. The knowledge that there influence of mitochondria on the activation of the programmed cellular death led to formulate the hypothesis that nuclear fragmentation absence in embryos before 72 post insemination is related with absence of mitochondrial membrane potential and OXPHOS blockage by inhibiting agents, would cause the maintenance of low levels of mitochondrial membrane potential and low rates of embryo nuclear fragmentation. Embryos were cultured *in vitro* for 18 hours post insemination (hpi) and after 24 hpi, they were submitted to 0% oxygen culture, in order to block the OXPHOS process. At 48 hpi, feeding was performed with SOF medium containing OXPHOS inhibitors (antimycin A and/or oligomycin, potassium cyanide) in different concentrations. The numbers of 8 cell embryos were estimated at 80 hpi, the same moment that they were submitted to JC-1 probes and TUNEL for mitochondrial membrane potential and DNA damages evaluation, respectively. At 168 hpi the effect of the treatments was verified on embryonic development. The results obtained with the OXPHOS inhibition after 48 after hpi using oligomycin and/or antimycin A did not modify embryo capacity to reach 8 cell stage. However, this inhibition prevented development to the blastocyst stage. KCN treatment allowed development up to the 8 cell stage and blastocyst similar to controls. The absence of O₂ prevented embryo development. The Ψ_{mm} and TUNEL results showed that antimycin and/or oligomycin treatment increased Ψ_{mm} and nuclear fragmentation in the majority of the embryos tested. In conclusion, it was not possible to test the hypothesis that Ψ_{mm} is necessary to the establishment of MCP, but a positive correlation between Ψ_{mm} and nuclear fragmentation was observed.

Keywords: bovine embryos, mitochondrial membrane potential, oxidative phosphorylation, respiratory chain inhibitors, programmed cell death

sintetase, susceptível ao agente oligomicina que realiza o bloqueio a passagem de prótons através do canal deste complexo. _____ 32

Figura 4: A PIV foi realizada mediante maturação (MIV) durante 22 horas, fecundação (FIV) e cultivo (CIV) 18 horas após a inseminação (hpi). Decorridas 48 hpi foi realizado o feeding (indicado pela flecha vermelha) do meio de cultivo com inibidor da OXPHOS e após 80 hpi foi determinado o número de 8 células, e 168 horas após a inseminação foi verificada a taxa de blastocisto (% BI), com intuito de avaliar o efeito dos tratamentos no desenvolvimento embrionário. _ 39

Figura 5: Esquema da técnica de JC-1. Quando há um alto potencial ($\uparrow\Psi$) de membrana mitocondrial (membrana vermelha), o corante atravessa a membrana e sai de sua forma monomérica formando agregados que quando submetidos a luz ultravioleta emitem fluorescência vermelha. Porém, na presença de um baixo potencial ($\downarrow\Psi$) de membrana mitocondrial (membrana verde), o corante permanece em sua forma monomérica emitindo fluorescência verde quando analisado sob luz ultravioleta. _____ 47

Figura 6: Esquema da técnica de TUNEL. Quando há a quebra do DNA nas regiões internucleossômicas, evento resultante do processo de apoptose, há exposição dos radicais 3'-OH. A enzima terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) catalisa a polimerização da extremidade 3', da união das caudas poli A com o conjugado fluorescente (FITC) e cauda poli-U, o qual mostrará a fluorescência das quebras das fitas de DNA. _____ 48

Figura 7: A PIV foi realizada mediante maturação (MIV) durante 22 horas, fecundação (FIV), e cultivo (CIV) 18 horas após a inseminação (hpi). Decorridas 48 hpi foi realizado o feeding (indicado pela flecha vermelha) do meio de cultivo (SOF) com inibidores da OXPHOS e após 80 hpi, os embriões foram submetidos à técnica de JC-1 (Ψ), mesmo horário em que foram fixados em 3,7% de paraformaldeído, para a realização da técnica de TUNEL(). _____ 50

- Figura 8: Fotomicrografia em epifluorescência da técnica de coloração de JC-1 em embriões com 80 hpi: A) Blastômeros corados em verde, indicam a localização de mitocôndrias, B) Blastômeros corados em vermelho, indicam potencial de membrana mitocondrial; C) Sobreposição das imagens A e B.** _____ 51
- Figura 9: Número médio de blastômeros positivos em diferentes tempos de incubação para a técnica de JC-1 ($p < 0,05$).** _____ 54
- Figura 10: Número médio de blastômeros positivos de embriões submetidos a diferentes doses da associação dos agentes AA e oligomicina para a técnica de JC-1 ($p < 0,05$).** _____ 55
- Figura 11: Número médio de blastômeros positivos em embriões submetidos a diferentes agentes bloqueadores da OXPHOS para a técnica de JC-1. *Indica diferença em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).** _____ 56
- Figura 12: Fotomicrografia de epifluorescência de embriões com 80 hpi submetidos à técnica de TUNEL. Na coluna da esquerda coloração pelo Hoechst 33342 e na coluna da direita, coloração com FITC (nucleotídeo marcado); A) controle negativo; B) controle positivo; C) amostra controle (sem tratamento). Nas setas, as células que fluorescem verde pela incorporação do nucleotídeo marcado com o corante FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma é background.** _____ 58
- Figura 13: Fotomicrografia de epifluorescência de embriões com 80 hpi submetidos à técnica de TUNEL. Na coluna da esquerda coloração pelo Hoechst 33342 e na coluna da direita, coloração com FITC (nucleotídeo marcado); mostrando embriões positivos encontrados nos diferentes tratamentos; A) tratamento com antimicina A; B) tratamento com oligomicina; C) tratamento com ambos agentes (antimicina A e oligomicina). Nas setas, as células que fluorescem verde pela incorporação do nucleotídeo marcado com o corante FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma é background.** _____ 59

Figura 14: Fotomicrografia de epifluorescência de embriões com 80 hpi submetidos à técnica de TUNEL. Na coluna da esquerda coloração pelo Hoechst 33342 e na coluna da direita, coloração com FITC (nucleotídeo marcado); mostrando embriões negativos encontrados nos diferentes tratamentos; A) tratamento com antimicina A; B) tratamento com oligomicina; C) tratamento com ambos agentes (antimicina A e oligomicina). A coloração verde que aparece no citoplasma é background._____ 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxa de desenvolvimento a blastocisto 168hpi dos grupos controle, KCN, a partir do número total de oócitos.	40
Tabela 2: Taxa de desenvolvimento dos embriões até o estágio de 8 células, com 80hpi cultivados em meio SOF com diferentes tratamentos.	41
Tabela 3: Taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto com 168 horas após a FIV de embriões submetidos a diferentes tratamentos.	42
Tabela 4: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em embriões 8 células submetidos a diferentes tratamentos.	52
Tabela 5: Fragmentação nuclear estimada pelo TUNEL.	61
Tabela 6: Comparação da proporção de desenvolvimento a 8 células e blastocisto, embriões positivos para potencial de membrana mitocondrial e TUNEL nos diferentes tratamentos	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ψ_{mm}	potencial de membrana interna mitocondrial
μL	micro litro
μM	micro molar
AA	antimicina A
ADP	adenosina di-fosfato
AIF	fator indutor de apoptose
ATP	adenosina tri-fosfato
BCL-2	B cell leukemia/lymphoma 2
BSA	albumina sérica bovina
CCCP	carbonil cianeto m-clorofenilidrazona
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
CO_2	gás carbônico
COC	<i>complexo cumulus ooforos</i>
DCCD	diciclo-hexil-carbodiimidine
DNP	2,4 dinitrofenol
EROs	espécies reativas de oxigênio
FCCP	carbonil cianeto-p-trifluoro-metoxifenil-hidrazona
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FMN ou FAD	nucleotídeos de flavina
FSH	hormônio folículo estimulante
hpi	horas após inseminação
ITM2B	Proteína Integral de Membrana 2B
JC-1	5, 5', 6, 6'-tetracloro-1, 1', 3, 3'-tetratilbenzimidazol iodeto de carbocianina
KCN	Cianeto de potássio
LH	Hormônio Luteinizante
MCP	morte celular programada

MIV	maturação <i>in vitro</i>
NAD ⁺ ou NADP ⁺	nucleotídeos de nicotinamina
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaN ₃	azida sódica
NO	óxido nítrico
OXPHOS	fosforilação oxidativa
PIV	produção <i>in vitro</i>
PTP	poro de transição de permeabilidade mitocondrial
redox	estado de óxido-redução
SFB	soro fetal bovino
SOF	fluido sintético de oviduto
TALP	meio Tyrodes suplementado com albumina, lactato e piruvato
TCM-199	Tissue Culture Medium
TdT	terminal desoxynucleotidyl transferase
TUNEL	Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling
ηM	nano molar
Ψ _{mm}	potencial de membrana interna mitocondrial
μL	micro litro

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	2
AGRADECIMENTOS	3
EPÍGRAFE	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
CAPÍTULO I	22
1 INTRODUÇÃO	23
CAPÍTULO II	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Mitocôndria	26
2.2 Fosforilação Oxidativa	27
2.3 Bloqueadores da fosforilação oxidativa	31
2.4 Apoptose	33
CAPÍTULO III	35
3 COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO A BLASTOCISTO	36
3.1 Introdução	36
3.2 Hipótese	36
3.3 Material e Métodos	37
3.3.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	37
3.3.1.1 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	37
3.3.1.2 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	37
3.3.1.3 Agentes bloqueadores da OXPHOS	38
3.3.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões e tratamentos	38
3.4 Análise estatística	38
3.5 Desenho experimental	39

3.6	Resultados e Discussão	40
3.7	Conclusões	43
3.8	Perspectivas:	43
CAPÍTULO IV		44
4	BLOQUEIO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E APOPTOSE	45
4.1	Introdução	45
4.2	Hipótese	46
4.3	Material e Métodos	46
4.3.1	Produção in vitro de embriões bovinos	46
4.3.2	Técnicas utilizadas	46
4.3.2.1	Coloração sensitiva para potencial de membrana (JC-1)	46
4.3.2.2	TUNEL (Terminal transferase mediated Uracil Nick End Labeling)	48
4.3.3	Análise estatística	49
4.3.4	Desenho experimental	50
4.4	Resultados e Discussão	51
4.5	Conclusões	62
4.6	Perspectivas	63
CAPÍTULO V		64
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL	65
5.1	Discussão Geral	65
5.2	Conclusão Geral	66
REFERÊNCIAS		68

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões constitui-se em um instrumento auxiliar no melhoramento genético animal mediante a multiplicação dos descendentes de machos de alto mérito genético, e vem sendo desenvolvida rotineiramente em laboratórios mediante a maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) até o estágio de blastocisto. A PIV tem também o potencial de auxiliar na preservação de animais em extinção, formação de bancos de germoplasma e aproveitamento de animais com patologias da reprodução adquiridas (FARIN, 1995).

O Brasil é um dos países que mais produz embriões bovinos por FIV no mundo, contando com cinquenta mil embriões produzidos no ano de 2002 de acordo com levantamento da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (O embrião, 2002). Mesmo com todo aprimoramento da técnica de CIV, aproximadamente 60% dos oócitos submetidos ao processo de fertilização não atingem o estágio de blastocisto e a qualidade dos embriões obtidos é bastante variável quando comparada com embriões produzidos *in vivo* (THIBIER, 2004).

A seleção dos oócitos baseada na morfologia do *complexo cumulus ooforos* (COC) e o aprimoramento dos meios e das condições de cultivo incrementaram as taxas de desenvolvimento de embriões viáveis ao final da PIV (EPPIG, 1998; MADISON, 1992). Apesar da melhoria dos sistemas de PIV e CIV, tanto a maturação quanto o desenvolvimento embrionário podem ser afetados por fatores intrínsecos e extrínsecos ao oócito, como íons inorgânicos, tampões, aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas, macromoléculas e composição da atmosfera gasosa presente no sistema de cultivo (RIEGER, 1992).

A quantidade de oxigênio no meio está intimamente relacionada com o processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS), principal função da mitocôndria que produz a maioria do adenosina tri-fosfato (ATP) utilizado pelo organismo (LEHNINGER, 2002). Os embriões bovinos são dependentes deste processo, utilizando-o como fonte energética para a síntese protéica, atividade de bomba sódio-potássio que forma potencial osmótico através do trofocitoderma, produzindo a blastocela (LEESE, 1991; THOMPSON, 1996).

O aumento da demanda de ATP causa um aumento no consumo de substratos como oxigênio, piruvato (THOMPSON, 1996), aminoácidos (PARTRIDGE, 1996) e glicose (THOMPSON, 1996).

Estudos realizados com a diminuição da quantidade de oxigênio, inibição parcial de transportadores utilizando azida sódica (NaN_3) e precursores da OXPHOS (2-4 dinitrofenol), mostraram que a produção de ATP via OXPHOS é essencial para produção de embriões bovinos particularmente durante o período de pré-compactação, sendo benéfica a inibição parcial durante a peri-compactação (THOMPSON, 2000). Contrariamente, o estudo realizado por Brison (1994), utilizando embriões de ratos, não apresentou aumento na capacidade de desenvolvimento dos embriões nas mesmas condições experimentais.

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da inibição da OXPHOS sobre o potencial de membrana mitocondrial e a capacidade do embrião bovino entrar em processo de morte celular programada.

CAPÍTULO II

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mitocôndria

A mitocôndria, denominada “usina de força” celular devido ao seu papel no metabolismo oxidativo energético, é a organela sítio de produção da maior parte da energia celular na forma de ATP a partir do adenosina di-fosfato (ADP) e piruvato pelo processo de OXPHOS (CHANDEL, 1999; JANSEN, 2000).

Com o intuito de determinar a atividade mitocondrial em oócitos de ratos e humanos, têm-se utilizado mensurações diretas das quantidades de ATP produzidos. No entanto, estudos recentes mostraram que o potencial de membrana interna mitocondrial (Ψ_{mm}) pode ser um indicador para a compreensão de processos fisiológicos e patológicos no qual a função mitocondrial (movimentação de prótons) está envolvida (BARACCA, 2003; VANBLERKOM 2003).

Mudanças no Ψ_{mm} ocorrem por movimentações de prótons através da membrana mitocondrial interna durante o processo de OXPHOS. Em condições fisiológicas, há uma extrusão ativa de prótons pela respiração e consumo passivo destes pela ATP sintetase durante a síntese de ATP (BARACCA, 2003). Embriões e blastômeros que não possuem mitocôndrias com alto Ψ_{mm} podem apresentar deficiências em funções específicas destas organelas, como OXPHOS no transporte de elétrons ou integridade de membrana mitocondrial, podendo prejudicar o desenvolvimento embrionário (ACTON, 2004).

A membrana interna atua como um sistema polarizado internamente, com cargas negativas que funcionam como sítio de ligação para corantes lipofílicos utilizados para se determinar o Ψ_{mm} (MIRANDA, 2005). Corantes catiônicos podem ser distribuídos pela matriz mitocondrial em resposta a uma diferença de Ψ_{mm} , sendo o acúmulo destes, uma consequência da carga e solubilidade dos mesmos à membrana interna lipídica e ao espaço intermembrana. Entre os corantes lipofílicos mais utilizados encontram-se a rodamina 123 e 5, 5', 6, 6'-tetracloro-1, 1', 3, 3'-tetratilbenzimidazol iodeto de carbocianina (JC-1; BARACCA, 2003; REERS, 1991).

Além do papel clássico da produção de ATP, a mitocôndria é responsável por inúmeras vias de sinalizações intracelulares (CHANDEL, 1999), entre elas destaca-se a regulação do processo de apoptose, já que age como reservatório de proteínas apoptogênicas tais como citocromo c, fator indutor de apoptose (AIF), ativação das

pró-caspases 2, 3, 8 e 9 (PARONE, 2002) e o desenvolvimento embrionário (CUMMINS, 2001).

A mitocôndria comanda diversos mecanismos metabólicos essenciais, incluindo a síntese de aminoácidos, ácido fólico, nucleotídeos, pirimidinas, fosfolipídeos e ácido úrico (CUMMINS, 2001).

Em células mantidas em cultivo, a interrupção do transporte de elétrons durante o processo de OXPHOS (produção de ATP) ocasiona a liberação de proteínas que provocam a ativação da família das proteases caspases e morte celular. A alteração no potencial de óxido-redução celular pode também prejudicar o controle de sobrevivência (razão de proteínas pró e anti-apoptóticas), regulado pela mitocôndria (GREEN, 1998).

2.2 Fosforilação Oxidativa

A mitocôndria gera energia através do processo de oxidação de moléculas e produção de ATP, denominado de OXPHOS (OXPHOS). O sistema de OXPHOS está localizado na bicamada lipídica e é composta por 5 complexos enzimáticos multiprotéicos, formados pela cadeia respiratória mitocondrial (I-V) e dois carregadores elétrons, coenzima Q e citocromo c (SMEITINK, 2001).

A transferência de elétrons, pela redução da água, cria um gradiente de prótons que cruza a membrana mitocondrial interna, utilizado pelo 5º complexo ou ATPase para síntese de ATP (HEUVEL, 2001).

Os elétrons são provenientes da ação de desidrogenases que os coletam de vias catabólicas e canalizam para receptores de elétrons, sendo os nucleotídeos de flavina (FMN ou FAD) e de nicotinamida (NAD^+ ou NADP^+) produzidos pela oxidação de nutrientes, como glicose, e transportados a partir do NADH e NADPH (SARASTE, 1999).

O transporte de elétrons consiste em quatro complexos enzimáticos dispostos na membrana mitocondrial interna. A passagem dos elétrons entre estes complexos libera energia que é armazenada na forma de gradiente de prótons, utilizado pelo V complexo (ATP sintetase) para produção de ATP (SARASTE, 1999).

No complexo I (ubiquinona oxidoreductase) ocorre a desidrogenização do NADH e transporte de elétrons para a coenzima Q. O transporte de elétrons é acoplado com o deslocamento de prótons pela membrana mitocondrial interna. O complexo II ou succinato: ubiquinona oxireductase, catalisa a oxidação do succinato

para fumarato, durante o transporte de elétrons do FADH_2 para o reservatório de ubiquinona; complexo III (decilubiquinol: citocromo c oxidase) catalisa a transferência de elétrons do ubiquinol para citocromo c acoplado ao deslocamento de prótons para a membrana mitocondrial interna. O complexo IV ou citocromo oxidase está ligado com a transferência de elétrons da redução do citocromo c para oxigênio, levando a um deslocamento de prótons pela membrana mitocondrial interna. Este gradiente é então utilizado para síntese de ATP no V complexo ou $\text{F}_0\text{-F}_1$ sintetase (Figura 1; HEUVEL, 2001).

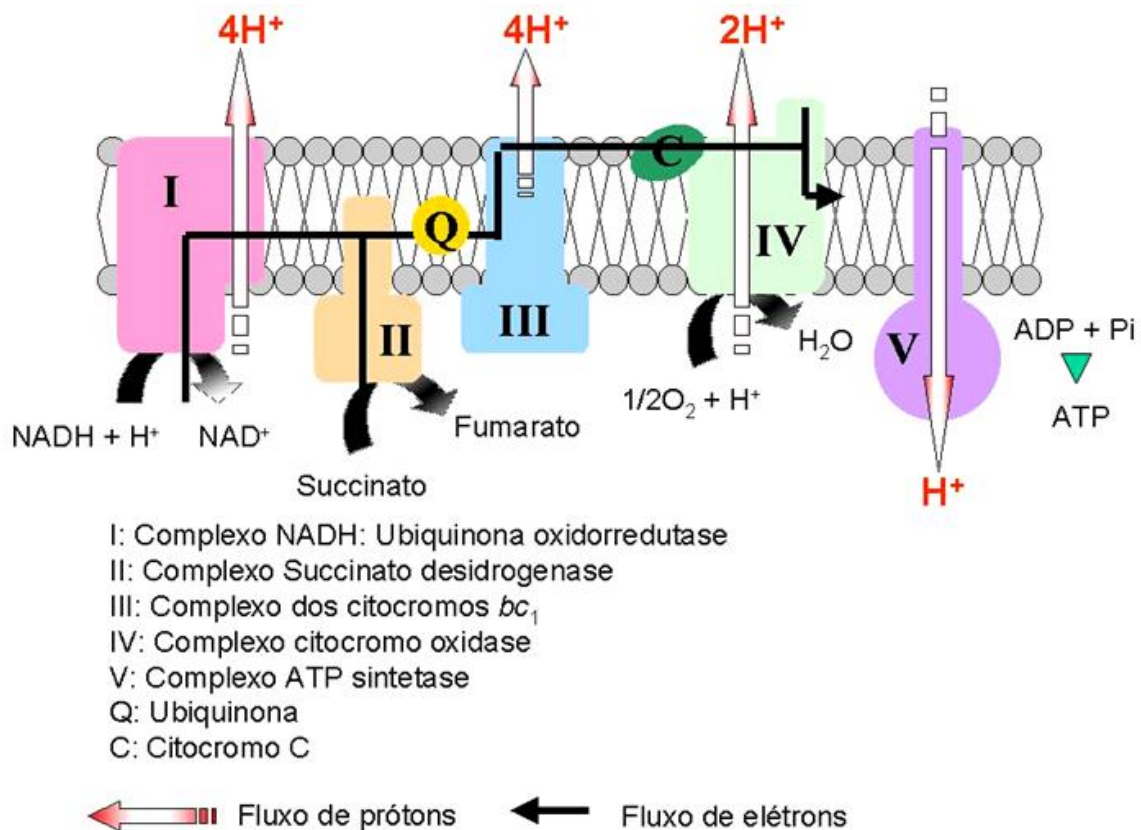


Figura 1. Esquema representativo do processo de OXPHOS. O transporte de elétrons consiste em quatro complexos enzimáticos dispostos na membrana mitocondrial interna e a passagem por estes, libera energia que é armazenada na forma de gradiente de prótons, utilizado pelo V complexo chamado de ATP sintetase para produzir ATP. No complexo I, ocorre a desidrogenação do NADH e transporte de elétrons para a coenzima Q. O transporte de elétrons é acoplado com o deslocamento de prótons pela membrana mitocondrial interna. O complexo II catalisa a oxidação do succinato para fumarato, durante o transporte de elétrons do $FADH_2$ para o reservatório de ubiquinona; complexo III catalisa a transferência de elétrons do ubiquinol para citocromo c acoplado ao deslocamento de prótons para a membrana mitocondrial interna. O complexo IV está ligado com a transferência de elétrons da redução do citocromo c para oxigênio, levando a um deslocamento de prótons pela membrana mitocondrial interna. Criando um gradiente utilizado para síntese de ATP no V complexo.

Estes complexos podem ser influenciados por três grupos de agentes químicos: desacopladores (permitem a continuidade do transporte de elétrons, mas desacoplam a produção de energia das reações que a armazenam), entre eles, está o 2,4 dinitrofenol (DNP), carbonil cianeto-p-trifluoro-metoxifenil-hidrazona (FCCP); inibidores (evitam tanto o estímulo do consumo de oxigênio pelo ADP quanto a fosforilação do ADP e ATP), como a oligomicina, antimicina A (AA) e cianeto de

potássio (KCN); e ionóforos (permitem que íons orgânicos passem através das membranas, dissipando o gradiente eletroquímico), por exemplo, a valinomicina (LEHNINGER, 2002).

Os embriões bovinos apresentam particularidades nas mudanças do metabolismo energético e oxidativo durante seu desenvolvimento embrionário (THOMPSON, 2000). Processos fermentativos e de OXPHOS são importantes para gerar ATP para blastocistos bovinos, já que a demanda energética aumenta significativamente, durante a blastulação a fim de manter e estabelecer a polaridade celular e o gradiente de íons. Este processo é essencial para a formação da blastocela (DONNAY, 1999; ECKERT, 1998). O metabolismo oxidativo está relacionado com a demanda energética durante o desenvolvimento, apresentando uma diminuição no estágio de 2 células até mórula compacta e um aumento nos processos de expansão de blastocistos e desenvolvimento embrionário (RIEGER, 2002).

Trimarchi (2000) observou que 70% do oxigênio consumido pelos blastocistos de camundongos são sensíveis ao tratamento com cianeto de potássio, confirmando que o oxigênio utilizado foi oriundo do processo de OXPHOS, e que 20 a 30% do oxigênio consumido pelo embrião em estágio de clivagem foram sensíveis ao cianeto de potássio, mostrando a independência do processo de OXPHOS nos períodos iniciais de desenvolvimento.

O bloqueio parcial do processo de OXPHOS durante o período de pré-compactação de embriões bovinos é benéfico para a produção de ATP por mecanismo glicolítico, estimula o aumento do metabolismo de glicose e estabelece um estado de óxido-redução (redox), já que há diminuição das espécies reativas de oxigênio (EROs), particularmente do ânion superóxido, envolvidos em funções celulares como eventos mitogênicos e apoptóticos (Figura 2; RIEGER, 2002; TRIMARCHI 2000).

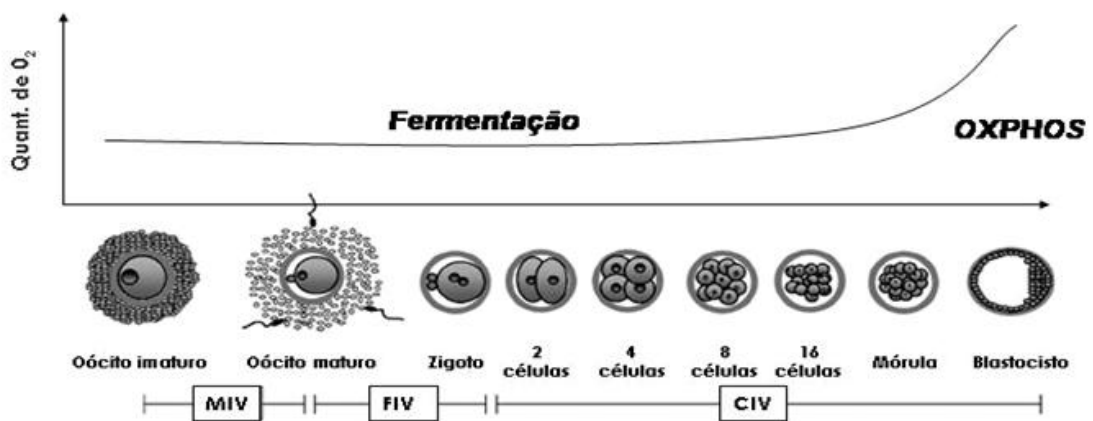


Figura 2. Hipótese do consumo de oxigênio durante o desenvolvimento embrionário bovino. Inicialmente, os embriões clivados são independentes da OXPHOS. Já em estágio de blastocisto, os embriões consomem mais oxigênio e este é dependente do processo de OXPHOS.

2.3 Bloqueadores da fosforilação oxidativa

Alguns agentes podem interferir no processo de OXPHOS inibindo a transferência de elétrons, ATP sintetase e trocas de ATP-ADP, além de possibilitarem o desacoplamento da fosforilação da transferência de elétrons, sendo que cada bloqueador possui um determinado modo de ação (LEHNINGER, 2002).

Entre os inibidores de transporte de elétrons encontra-se a antimicina A, cianeto de potássio, rotenona, monóxido de carbono, entre outros. A antimicina A é um inibidor do III complexo respiratório, complexo dos citocromos bc^1 e bloqueia a transferência de elétrons do citocromo b para o citocromo c^1 , o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna e conseqüentemente interrompe a síntese de ATP e reduz o consumo de oxigênio e Ψ_{mm} (TZUNG, 2001). O cianeto inibe o IV complexo respiratório (citocromo c oxidase), agindo no citocromo oxidase e, conseqüentemente, bloqueia o transporte de elétrons da OXPHOS, resultando em uma insuficiente utilização do oxigênio (JENSEN, 2002, TRIMARCHI, 2000).

Existem agentes que inibem a ATP sintetase como DCCD, venturicidina e oligomicina. Este último não interage diretamente com carregadores de elétrons, mas inibe a OXPHOS ligando-se a ATP sintetase (porção F_0 e CF_0) e bloqueia a condutância de prótons no complexo V, F_1F_0 -ATPase (KIM, 1999; VAN BLERKOM,

2003). Esta inibição leva ao aumento do Ψ_{mm} devido acúmulo de prótons na matriz mitocondrial (Figura 3; BARACCA, 2003).

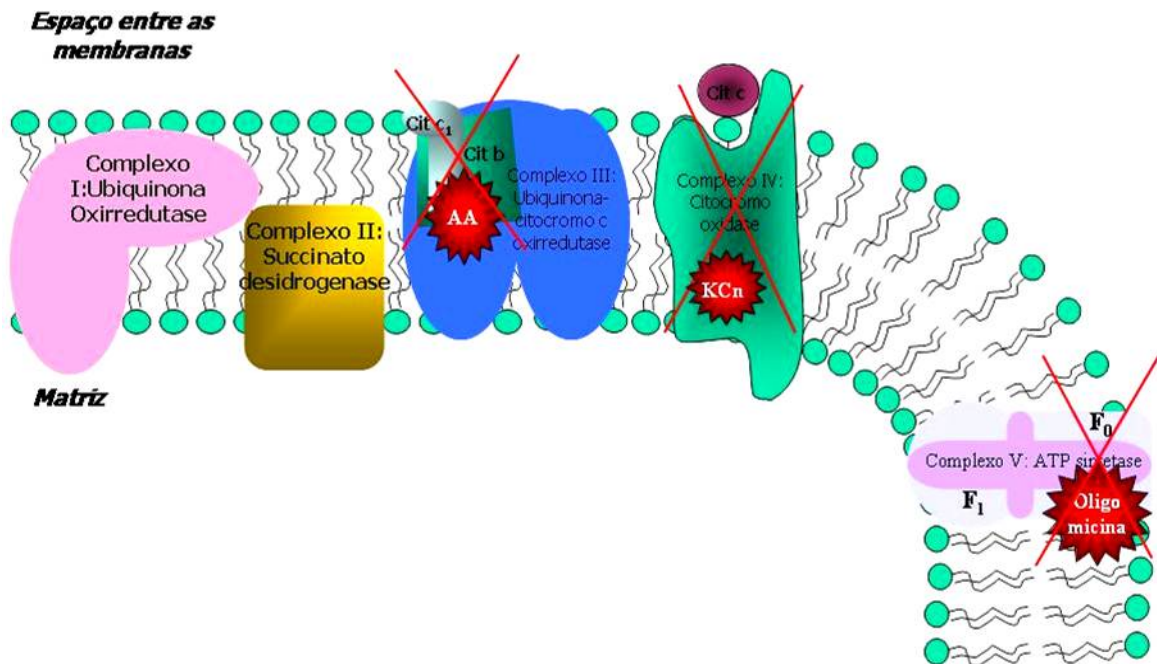


Figura 3. Esquema representando a membrana mitocondrial interna, os complexos respiratórios relacionados a OXPHOS e o local de ação dos inibidores. Complexo I: Ubiquinona Oxirredutase; Complexo II: Succinato desidrogenase; Complexo III: Ubiquinona citocromo c oxirredutase susceptível ao agente antimicina A (AA), na transferência de elétrons do citocromo b ao citocromo c_1 ; Complexo IV: Citocromo oxidase susceptível ao agente cianeto de potássio (KCN), na transferência de elétrons do citocromo c até oxigênio; Complexo V: ATP sintetase, susceptível ao agente oligomicina que realiza o bloqueia a passagem de prótons através do canal deste complexo.

Alguns agentes permitem o transporte de elétrons sem síntese de ATP, ocasionando um aumento da atividade do ciclo do ácido tricarboxílico e consumo de oxigênio, através do desacoplamento do gradiente de prótons do processo de OXPHOS, denominados desacopladores (THOMPSON, 2000). Carbonil cianeto P-trifluoro-metoxifenil-hidrazona (FCCP ou CCCP) são ácidos lipossolúveis fracos que podem transpor a barreira lipídica da membrana mitocondrial na forma protonada, sem transitar pela ATP sintetase. Depois de entrar na matriz mitocondrial, provoca dissipação do gradiente prótônico, eliminando o gradiente de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons e, assim, reduz o Ψ_{mm} (GRAAF, 2004, MIRANDA, 2005).

2.4 Apoptose

O êxito do desenvolvimento embrionário depende de um adequado funcionamento de genes. A qualidade de oócitos, por exemplo, tem grande impacto na competência do desenvolvimento e contribui para altas incidências de perdas embrionárias durante os processos de PIV (HARDY, 2001). A sobrevivência do oócito é controlada por várias moléculas regulatórias da morte celular responsáveis pela ativação ou supressão da morte celular programada (MCP; JURISCOVA, 2004).

A palavra apoptose (do grego *apo* = separação, *ptôsis* = queda), adotada pela primeira vez na década de 70, designa a forma fisiológica de morte celular (KERR et al., 1972 apud TILLY, 1996). Este termo foi designado em analogia ao fenômeno natural das folhas caírem das árvores ou das pétalas caírem das flores. Há controvérsias na utilização de apoptose e de MCP como sinônimos ou termos permutáveis (MAJNO; 1995). O termo apoptose define todos os mecanismos e processos envolvidos antes, durante e depois da morte celular: (1) indução da morte celular – estímulos externos; (2) morte celular propriamente dita - desencadeamento de mecanismos morfológicos e bioquímicos; e (3) absorção dos corpos apoptóticos por células vizinhas. Já o uso da terminologia MCP envolve apenas os mecanismos morfológicos e bioquímicos específicos que a própria célula desencadeia para induzir a sua morte (KERR et al., 1972 apud TILLY, 1996).

A MCP é um processo fundamental para embriogênese, homeostase tecidual, desenvolvimento de animais, morfogênese de órgãos, remoção de células infectadas ou danificadas em todos os organismos multicelulares (JOZA, 2001). Entre as características deste processo estão o enrugamento celular, condensação da cromatina, fragmentação de DNA, formação de corpos apoptóticos e fragmentação da membrana nuclear (MIGNOTTE, 1998).

O aparecimento da fragmentação celular durante o desenvolvimento dos embriões foi observado em diversas espécies (JURISCOVA, 1995; LONG, 1998; MATWEE, 2000). Os embriões fragmentados apresentam blastômeros de tamanhos diferentes, retardo no desenvolvimento, seguido de degeneração. A fragmentação dos blastômeros e de seu DNA foi associada à morte celular programada (MCP; apoptose; HARDY, 1989).

O processo de apoptose pode ocorrer basicamente por duas vias. A via “extrínseca” da MCP é caracterizada pela sua ocorrência através da ativação de receptores presentes na membrana plasmática das células como ligante-Fas (Fas-L) e seu receptor Fas (SHARMA, 2000). A via intrínseca da MCP é dependente da mitocôndria que apresenta papel central no processo de apoptose, já que age como reservatório de várias proteínas apoptogênicas como o citocromo c que promove a liberação de fatores ativadores de caspase, mudanças no transporte de elétrons, perda do potencial de membrana mitocondrial, alteração no redox celular e participação na família proteínas BCL-2 pro e anti-apoptóticas (GREEN, 1998; PARONE, 2002).

Existem duas principais famílias de proteínas que estão envolvidas na regulação do processo de apoptose, aquelas que mediam processos proteolíticos, a família das caspases, e aquelas que regulam a atividade das caspases, a família da B cell leukemia/lymphoma 2 (*BCL-2*), que pode estar presente no citosol bem como em organelas como as mitocôndrias. Esta família de proteínas é composta 15 genes, caracterizados em dois subgrupos, os anti-apoptóticos (*BCL-2*, *BCL-X_L*, *BCL-W*, *MCL-1*, *Al*) e pró-apoptóticos (*BAX*, *BAK*, *BOK*, *BIK*, *BLK*, *HRK*, *BNIP₃*, *BIM*, *BAD*, *BID*, *BCL-X_S*) além de proteínas pró-apoptóticas que contém o domínio BH3 da família *BCL-2* que são responsáveis pela indução do apoptose (*ITM2B*) que possuem papel crucial no processo de apoptose dentro dos mecanismos de morte celular mais comuns (DHARAP, 2005; YANG, 2002).

O destino de uma célula é determinado pela habilidade dos supressores da MCP em seqüestrarem ou neutralizarem a ação dos indutores do processo. Portanto, a concentração relativa das proteínas pró e anti-apoptóticas determinará a sobrevivência ou morte da célula. Vários membros da família *BCL-2* localizam-se permanentemente ou provisoriamente nas membranas mitocondriais, onde podem apenas regular ou formar poros mitocondriais. A abertura destes poros causa mudanças no Ψ_{mm} , acompanhado da liberação de fatores indutores da MCP para o citoplasma (JURISICOVA, 2004).

CAPÍTULO III

COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO

3 COMPETÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO A BLASTOCISTO

3.1 Introdução

A produção de ATP via OXPHOS em todos os estádios é essencial para o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos. Esta pode ser verificada pela diminuição da quantidade de oxigênio no meio, inibição parcial de transportadores usando NaN_3 (bloqueador de elétrons semelhante ao cianeto de potássio) e pela utilização de precursores da OXPHOS (THOMPSON, 2000). No entanto, a inibição parcial da OXPHOS durante o período de peri-compactação é benéfica, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), estresse oxidativo e danos no DNA (HARVEY, 2004; THOMPSON, 2000).

Durante a compactação e a abertura da blastocele, o aumento da produção de ATP pela mitocôndria favorece a síntese protéica e a atividade da bomba sódio e potássio formando um potencial osmótico essencial para a formação da cavidade da blastocele. Este aumento é decorrente do crescimento da demanda energética nestes estádios, o que provoca maior exigência de oxigênio, piruvato, aminoácidos e glicose, embora a maioria da glicose metabolizada por embriões de ruminantes no estádio de blastocisto ocorra pelo processo de glicólise (HARVEY, 2002).

O objetivo deste trabalho foi comparar o desenvolvimento dos embriões submetidos a diferentes grupos de agentes bloqueadores da OXPHOS e atmosfera livre de oxigênio.

3.2 Hipótese

A inibição da OXPHOS durante a fase de clivagem em embriões bovinos não altera a taxa de desenvolvimento até o estádio do bloqueio embrionário (8 células), no entanto inviabiliza a produção de blastocisto.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos

3.3.1.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Os COCs foram obtidos de ovários de vacas zebus ou mestiças de zebu oriundos de abatedouros comerciais localizados em Piracicaba, SP. Foram utilizados neste experimento COCs de qualidade 1 com *cumulus* completo e compacto e citoplasma límpido e homogêneo (finas granulações). Após a seleção, foram maturados *in vitro* em meio de cultivo TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃ suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato (22µg/mL), gentamicina (50µg/mL) e 0,5 µg de hormônio folículo estimulante (FSH)/mL, 50µg de hormônio luteinizante (LH)/mL e 1µg de estradiol/mL. A maturação ocorreu em microgotas contendo 90µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral e levados à incubadora a 38,5°C, com 5% CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 22 horas.

3.3.1.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Após o período de maturação, os oócitos foram submetidos à FIV em microgotas contendo 90µL de meio tyrodes suplementado com albumina, lactato e piruvato (TALP) suplementado com heparina (10µg/mL), piruvato (22µg/mL), gentamicina (50µg/mL), albumina sérica bovina (BSA) sem ácidos graxos (6mg/mL) e solução de PHE (2 µM de penicilamina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina). As palhetas de sêmen de touros da raça Nelore foram descongeladas em banho-maria a 35°C, durante 30 segundos e seu conteúdo foi centrifugado em gradiente de Percoll (45 e 90%) para obtenção dos espermatozóides móveis, além da remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração espermática utilizada foi de 2x10⁶ células/mL e após 30 minutos de incubação dos espermatozóides, os oócitos foram transferidos para as microgotas (20 oócitos/gota), onde permaneceram sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ em ar a 38,5°C durante 18 horas.

3.3.1.3 Agentes bloqueadores da OXPHOS

Foram utilizados 3 agentes com o intuito de interferir na transferência de elétrons na membrana mitocondrial. O cianeto de potássio (KCN; 250 η M e 500 η M), antimicina A (250 η M e 500 η M) e oligomicina, um inibidor da ATP sintetase e trocas de ATP-ADP (500 η M e 1 μ M).

3.3.1.4 Cultivo *in vitro* dos embriões e tratamentos

Após o processo de MIV e FIV, os zigotos foram co-cultivados *in vitro* em meio SOF (fluido sintético de oviduto) com células da granulosa. Decorridas 48 horas pós-inseminação (hpi), estes foram avaliadas as taxas de clivagem e de embriões 8 células. Posteriormente, foi realizado o *feeding* com a substituição de 45 μ L do meio SOF pelo mesmo volume do meio acrescido de um bloqueador da OXPHOS (antimicina e/ou oligomicina ou KCN). Os embriões permaneceram sob cultivo até 168 hpi, quando foi realizada a avaliação do desenvolvimento embrionário.

Para os grupos de embriões submetidos aos tratamentos com oligomicina e/ou antimicina A foi realizada uma avaliação de 8 células às 80hpi, a fim de observar-se o efeito dos agentes sobre o desenvolvimento.

Um grupo de embriões foi submetido ao cultivo sob atmosfera livre de oxigênio (95% de nitrogênio e 5% de gás carbônico) 24 hpi e foram realizadas as mesmas análises que as utilizadas para os agentes.

3.4 Análise estatística

Os dados foram avaliados utilizando metodologia de Modelos Lineares Generalizados (NELDER, 1972), por meio do procedimento PROC GENMOD do programa computacional *Statistical Analysis System* (SAS, 1995). Assumiu-se que as variáveis dependentes (taxas de blastocistos e embriões de 8 células) seguem distribuição binomial e, neste caso, a função de ligação utilizada foi a logística. A parte sistemática do modelo de análise de variância considerou como preditor linear os efeitos de tratamentos.

3.5 Desenho experimental

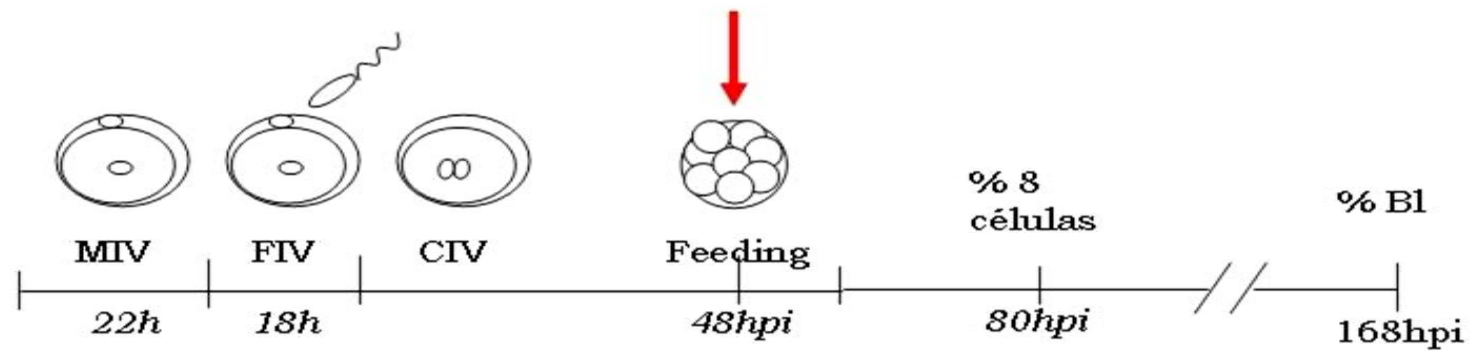


Figura 4: A PIV foi realizada mediante maturação (MIV) durante 22 horas, fecundação (FIV) e cultivo (CIV) 18 horas após a inseminação (hpi). Decorridas 48 hpi foi realizado o *feeding* (indicado pela flecha vermelha) do meio de cultivo com inibidor da OXPPOS e após 80 hpi foi determinado o número de 8 células, e 168 horas após a inseminação foi verificada a taxa de blastocisto (% B1), com intuito de avaliar o efeito dos tratamentos no desenvolvimento embrionário.

3.6 Resultados e Discussão

Os resultados relativos à competência de desenvolvimento a blastocisto com o tratamento com KCN em diferentes concentrações estão representados na tabela 1.

Tabela 1: Taxa de desenvolvimento a blastocisto 168hpi dos grupos controle, KCN, a partir do número total de oócitos.

Grupos	Número de oócitos	Número de 8 células (%)*	Número de blastocistos(%)*
Controle	226	26%	17%
KCN (250ηM)	119	23%	12%
KCN (500ηM)	20	25%	15%

* Porcentagem calculada em relação ao número de oócitos totais, não houve diferença nos dados

Os resultados apresentados permitem observar que a inibição da OXPHOS após 48hpi mediante ao tratamento com cianeto de potássio sob a concentração de 250 η M e 500 η M não apresentou efeito na taxa de blastocisto em relação ao controle (12%, 15% e 17%, respectivamente; $p < 0,05$).

Há de se ponderar que embora efetivo o tratamento com KCN já que se trata de um “veneno” mitocondrial (BHATTACHARYA, 1997), não há na literatura descrição de protocolos de tratamento tão prolongados. Tendo em vista que o KCN é um ácido fraco volátil (TSUGE, 2001) foi realizada, como mostrado posteriormente, a inibição da OXPHOS aplicando-se outras drogas.

Os embriões foram tratados com os agentes antimicina A e/ou oligomicina conforme descrito no item 3.3.1.4. Além destes agentes, os embriões foram submetidos ao cultivo sob atmosfera livre de oxigênio, mimetizando o processo *in vivo* no qual embriões sofrem reduções da disponibilidade de oxigênio, na transição do oviduto para o útero. Além disso, esta redução diminui a produção EROS, que em grandes quantidades provocam apoptose (HARVEY, 2004; YUAN, 2003).

Segundo os resultados demonstrados na tabela 2, a inibição da OXPHOS com oligomicina e/ou antimicina A em diferentes concentrações não altera a capacidade do embrião atingir o estágio de 8 células. Entretanto, a ausência de oxigênio não permite o desenvolvimento de embriões durante as primeiras horas de cultivo ($p < 0,05$).

Tabela 2: Taxa de desenvolvimento dos embriões até o estágio de 8 células, com 80hpi cultivados em meio SOF com diferentes tratamentos.

Tratamentos	Número de oócitos	Embriões 8 células	
		Número (N)	%*
Controle	442	199	45,02
Oligomicina 500ηM	41	20	48,78
Oligomicina 1μM	391	134	34,27
Antimicina 250ηM	97	31	31,96
Antimicina 500ηM	308	118	38,31
Oligo e AA (1μM e 500ηM)	40	18	45,00
Oligo e AA(500ηM e 250ηM)	46	17	36,95
0% Oxigênio	80	0	0,00 ^B

* Porcentagem calculada em relação ao número de oócitos totais.

** Indica diferença significativa ($p < 0,05$).

Estes resultados podem ser decorrentes de um mecanismo de resistência à inibição parcial da OXPHOS dos embriões entre 48 e 80 hpi, já que os tratamentos com antimicina A e/ou oligomicina não alteraram a capacidade do embrião em atingir o estágio de 8 células. Acredita-se que a energia utilizada nesta fase de desenvolvimento pode advir da fermentação ou dos estoques maternos de ATP.

As mitocôndrias, em sua grande maioria são organelas herdadas maternamente e apresentam variação de número em oócitos bovinos. Esta discrepância pode estar associada à capacidade de desenvolvimento a blastocistos *in vitro*, pois afeta a habilidade de produzir ATP. A quantidade de ATP é um ponto crítico para os embriões pois esse é responsável pela síntese de ácidos nucléicos e proteínas (TAMASSIA, 2004).

A inibição da clivagem obtida pela redução da atmosfera de oxigênio (0% de O₂) é indicativa de que o embrião necessita de uma quantidade mínima de oxigênio no início do desenvolvimento para fins de OXPHOS, ou seja, o embrião pode ser dependente de oxigênio no período de tratamento entre as 24 e 48 hpi, quando a ausência de O₂ inibiu a clivagem. Thompson (2000) descreveu que a produção de ATP via OXPHOS é essencial para produção de embriões bovinos em todos

estádios de desenvolvimento e a utilização do O₂ é estágio dependente (HARVEY, 2004).

Com intuito de estudar esta dependência, realizou-se um bloqueio da OXPHOS com antimicina A e oligomicina às 48 hpi, 0% de oxigênio em 24 hpi e controle (ausência de tratamento) em embriões. Os resultados do desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto no 168 hpi estão representados na tabela 3.

Tabela 3: Taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto com 168 horas após a FIV de embriões submetidos a diferentes tratamentos.

<i>Tratamentos</i>	<i>Número de oócitos</i>	<i>Blastocistos</i>	
		<i>Número (N)</i>	<i>%**</i>
<i>Controle</i>	104	18	17,31
<i>Oligomicina 1μM</i>	41	0	0,00*
<i>Antimicina 500ηM</i>	53	0	0,00*
<i>Oligo e AA (1μM e 500ηM)</i>	40	0	0,00*
<i>0% Oxigênio</i>	80	0	0,00*

* Indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

** Taxa de blastocisto calculada em relação ao número de oócitos totais

Os resultados apresentados permitem observar que a inibição realizada pela utilização de antimicina e/ou oligomicina, em diferentes doses, inviabiliza o desenvolvimento até o estágio de blastocisto ($p < 0,05$).

A ausência de desenvolvimento embrionário a blastocisto obtida com as diferentes formas de bloqueio da OXPHOS (antimicina A e/ou oligomicina e 0% de oxigênio) pode ser justificada pela necessidade do embrião de ativar a OXPHOS para atingir o estágio de blastocisto. Sabe-se que o processo de OXPHOS é primordial para o desenvolvimento de embriões bovinos (THOMPSON, 2000) e que, uma vez bloqueado antes da compactação, provoca efeitos inibitórios no desenvolvimento embrionário (HARVEY 2002).

A OXPHOS é essencial para o desenvolvimento nos processos de produção de energia para síntese protéica, atividade de bomba sódio-potássio que forma

potencial osmótico através do trofocotoferma, produzindo a blastocela (THOMPSON, 2000). Sendo assim, a ausência de OXPHOS provocada pelo bloqueio durante o desenvolvimento embrionário pode provocar a diminuição da disponibilidade energética e, conseqüentemente, o bloqueio do desenvolvimento embrionário.

Confrontando com os resultados obtidos com o tratamento com o KCN no qual a inibição da OXPHOS após as 48 hpi permite o desenvolvimento a blastocisto em taxas semelhantes ao controle e na hipótese do KCN manter sua atividade após uma manutenção em cultivo por longo prazo, é possível ter ocorrido um mecanismo de escape, ou seja, outro agente pode competir pelo mesmo receptor do KCN e com isso, reduz seus efeitos. Estudos realizados com pericárdio bovino mostraram que o óxido nítrico (NO), envolvido nos processos de controle da morte celular programada, regulação de glicólise, controle da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e síntese de DNA, pode ser considerado um antídoto para o KCN, já que reverte a ação do mesmo em presença de excesso de ferrocitocromo (PEARCE, 2003).

3.7 Conclusões

Com estes resultados obtidos podemos concluir que:

- Confirmando a hipótese do trabalho, a inibição da OXPHOS após 48 hpi com oligomicina e /ou antimicina A nas doses utilizadas não altera a capacidade do embrião atingir o estágio de 8 células. Entretanto, esta inibição inviabiliza o desenvolvimento até o estágio de blastocisto.
- Uma inibição em fase anterior (24hpi) mediante cultivo na ausência do O₂ inviabiliza inclusive o processo de clivagem.

3.8 Perspectivas:

O tratamento com KCN permitiu o desenvolvimento até o estágio de 8 células e a blastocisto em taxas semelhantes ao controle. A droga aparentemente permite um bloqueio parcial da OXPHOS, e devido a sua volatilidade/ competição com outros agentes poderá ser utilizado em estudos quando se deseja apenas um efeito transitório da inibição da OXPHOS.

CAPÍTULO IV

BLOQUEIO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E APOPTOSE

4 BLOQUEIO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E APOPTOSE

4.1 Introdução

A mitocôndria tem papel fundamental no processo de morte celular programada (MCP) mediante liberação do citocromo c e fator indutor de apoptose (AIF), que ativam pró-caspases 2, 3 e 9 (SHCHEPINA, 2002). A diferença de potencial da membrana mitocondrial interna (Ψ_{mm}) é um parâmetro de controle central da respiração mitocondrial, síntese de ATP, acúmulo de cálcio e geração de espécies reativas de oxigênio (EROS; WARD, 2000).

Acredita-se que o Ψ_{mm} possa estar ligado ao aparecimento da fragmentação nuclear, já que ambos processos têm início no mesmo período, embora ainda não se possa determinar se mudanças no Ψ_{mm} são causa ou a consequência do processo de fragmentação (ACTON, 2004).

Estudos realizados em osteossarcomas mostraram que a diminuição da OXPHOS e/ou diminuição do Ψ_{mm} estão associadas com inibição da apoptose nas células (DEY, 2000).

Galitovsky (1998) mostrou em timócitos que o uso de inibidores da cadeia respiratória como a antimicina A e rotenona e desacopladores da OXPHOS como carbonil cianeto m-clorofenilidrazona (CCCP) reduziram o Ψ_{mm} e também a fragmentação internucleosomal. Esta redução parece estar associada à habilidade dos inibidores de prevenir a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, evento chave na indução do apoptose.

Os resultados do capítulo anterior mostram que não há necessidade de fosforilação na fase de clivagem após 48 hpi até o estágio de 8 células. No entanto, foi visto que embriões bloqueiam com 8 células na presença de inibidores da OXPHOS.

Sabendo-se que entre 72 e 90 hpi surgem mitocôndrias com Ψ_{mm} estimado com o corante JC-1 e que o processo de MCP está intimamente relacionado com a organela, o objetivo do presente capítulo foi de testar o efeito do tratamento das

drogas inibidoras da OXPHOS sobre o Ψ_{mm} e fragmentação nuclear no momento do bloqueio embrionário.

A estratégia para este fim foi utilizar bloqueadores da OXPHOS a fim de manter o baixo Ψ_{mm} observado antes das 72 hpi e avaliar fragmentação nuclear nos embriões do grupo controle e submetidos a diferentes agentes bloqueadores da OXPHOS.

4.2 Hipótese

A ausência de fragmentação nuclear nos embriões antes das 72 hpi está relacionada com a ausência do Ψ_{mm} . A inibição da OXPHOS mediante tratamentos com antimicina A e/ou oligomicina leva a manutenção de baixos níveis de Ψ_{mm} e baixas taxas de fragmentação nuclear nos embriões.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Produção in vitro de embriões bovinos

A PIV de embriões (maturação, fecundação) foi realizada conforme descrito no item 3.3.1 e o cultivo foi semelhante, diferindo apenas nas doses e agentes utilizados. O cianeto de potássio foi utilizado na concentração de 500 μ M, antimicina A (250 e 500 η M), oligomicina (500 η M e 1 μ M) e associação de antimicina e oligomicina (500 η M e 1 μ M; 250 η M e 500 η M, respectivamente). Além das drogas já utilizadas no capítulo 3, acrescentou-se um desacoplador de membrana (CCCP), com o intuito de provocar uma diminuição do Ψ_{mm} (controle negativo). Parte dos embriões foi utilizada em análises de potencial de membrana estimado com JC-1 às 80 hpi. Parte dos embriões foi fixada em solução de paraformaldeído 4% e submetida à técnica de TUNEL para observar fragmentação nuclear.

4.3.2 Técnicas utilizadas

4.3.2.1 Coloração sensitiva para potencial de membrana (JC-1)

JC-1 é um corante catiônico lipofílico que entra na membrana interna da matriz em forma monomérica quando a mesma está polarizada (REERS, 1995). Quando há um alto potencial de membrana mitocondrial, o corante atravessa a

membrana e formam agregados que excitam-se com comprimento de onda de 535 nm e emitem fluorescência vermelha sob a exposição a luz UV (590 nm). Se o potencial for baixo, o corante permanece em sua forma monomérica e apresenta excitação sob 485 nm, emitindo fluorescência verde (525 nm, Figura 5). A coloração sensível para potencial de membrana (JC-1#Molecular Probes#MP03168) foi realizada em embriões com 80 hpi. Estes foram incubados no escuro por 30 minutos à temperatura de 37°C em meio SOF aquecido, contendo o corante JC-1 (concentração de 1,2 µg/ml). A avaliação foi realizada em microscópio de epifluorescência com aumento de 400x.

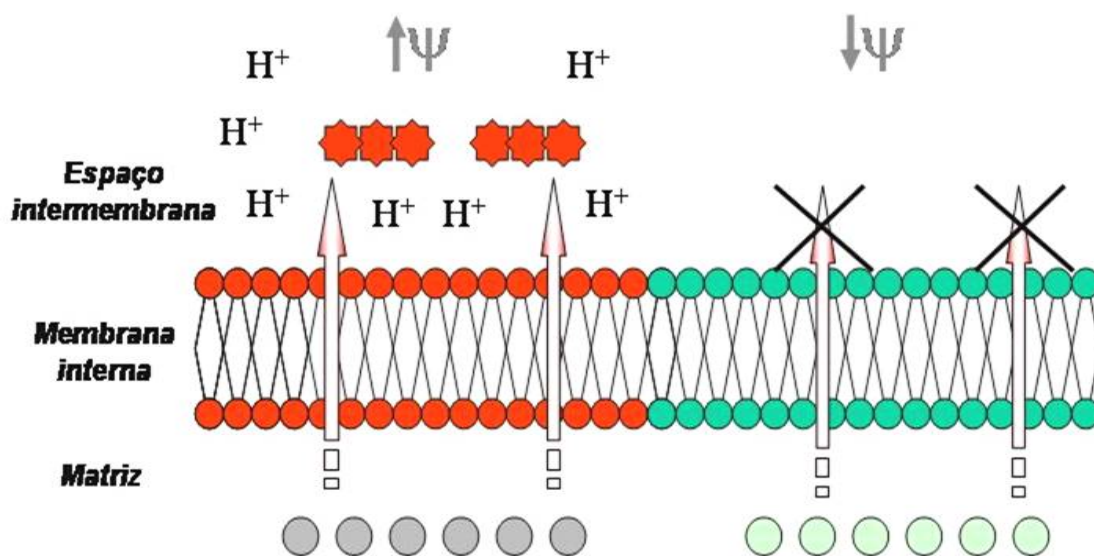


Figura 5: Esquema da técnica de JC-1. Quando há um alto potencial ($\uparrow\Psi$) de membrana mitocondrial (membrana vermelha), o corante atravessa a membrana forma agregados que quando submetidos a luz ultravioleta emitem fluorescência vermelha. Porém, na presença de um baixo potencial ($\downarrow\Psi$) de membrana mitocondrial (membrana verde), o corante permanece em sua forma monomérica emitindo fluorescência verde quando analisado sob luz ultravioleta.

As colorações com JC-1 permitem comparar variações na distribuição das mitocôndrias e no potencial de membrana mitocondrial.

4.3.2.2 TUNEL (Terminal transferase mediated Uracil Nick End Labeling)

A técnica de TUNEL (do inglês, *Terminal deoxynucleotil transferase Uracil Nick End Labeling*) identifica *in situ*, a fragmentação internucleossômica do DNA (Figura 6).

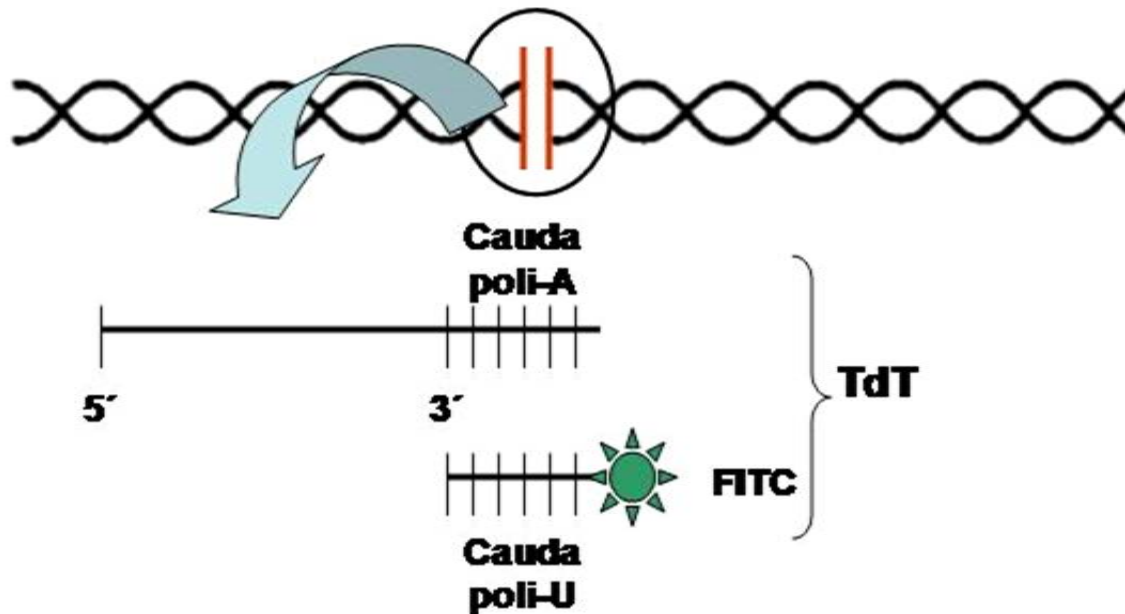


Figura 6: Esquema da técnica de TUNEL. Quando há a quebra do DNA nas regiões internucleossômicas, evento resultante do processo de apoptose, há exposição dos radicais 3'-OH. A enzima terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) catalisa a polimerização da extremidade 3', da união das caudas poli A com o conjugado fluorescente (FITC) e cauda poli-U, o qual mostrará a fluorescência das quebras das fitas de DNA.

Esta avaliação foi realizada com o *Kit "In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein"* (Roche®, Alemanha) conforme descrito abaixo:

Os embriões foram lavados em PBS acrescido de 1mg/ml de polivinil-pirolidona (PVP) e fixados em paraformaldeído 3,7% durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a lavagem em PBS/PVP, os embriões foram permeabilizados em solução 0,5% de triton X-100 e 0,1% citrato de sódio em PBS durante 1 hora em temperatura ambiente e lavados em PBS acrescido de PVP. Grupos de embriões fixados e permeabilizados foram subdivididos em 3 grupos: controles positivos, negativos e amostras experimentais. O controle positivo foi tratado com 3U/mL DNase (FPLC*pure*TM, Amersham Biosciences) em solução com 400mM de TRIS-HCl, 50mM de MgCl₂ e água ultrapura por 1 hora a 37⁰C. Após lavagem, o controle

positivo e as amostras foram incubadas em microgotas da mistura de reagentes de TUNEL do *kit*, contendo a proporção de 10% de solução enzimática (enzima terminal deoxinucleotídeo transferase) com 90% de solução marcadora (conjugado fluorescente de dUTP) por 1 hora a 37⁰C no escuro, em câmara úmida. Controle negativo foi incubado em microgotas apenas com solução marcadora na ausência da solução enzimática para conferir a marcação. Após a lavagem em PBS/PVP, controles e amostras foram submetidos a um contraste para visualização do DNA com solução Hoechst 33342 (concentração final 1µg/ml) em glicerol e em uma lâmina histológica com lamínula e foram analisados em microscópio de fluorescência. As células que apresentaram o núcleo com coloração verde (FITC) foram consideradas as células TUNEL positivas, ou seja, apresentam o DNA fragmentado. As células que apresentaram coloração azul (hoechst 33342) indicam a presença e a localização do núcleo das células.

4.3.3 Análise estatística

Os dados foram avaliados utilizando metodologia de Modelos Lineares Generalizados (NELDER, 1972), por meio do procedimento PROC GENMOD do programa *Statistical Analysis System*, versão 8.02 (SAS, 1995). Assumiu-se que variável resposta (número de embriões negativos) segue distribuição binomial e, neste caso, a função de ligação utilizada foi a logística. A parte sistemática do modelo de análise de variância considerou como preditor linear os efeitos dos tratamentos.

4.3.4 Desenho experimental

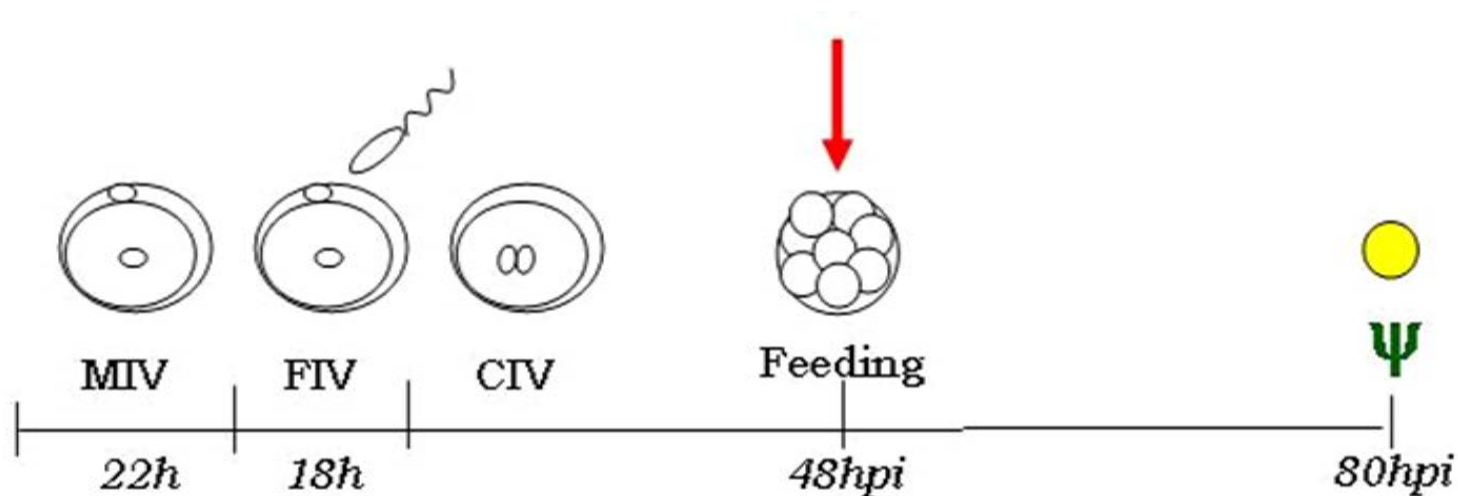


Figura 7: A PIV foi realizada mediante maturação (MIV) durante 22 horas, fecundação (FIV), e cultivo (CIV) 18 horas após a inseminação (hpi). Decorridas 48 hpi foi realizado o *feeding* (indicado pela flecha vermelha) do meio de cultivo (SOF) com inibidores da OXPPOS e após 80 hpi, os embriões foram submetidos à técnica de JC-1 (Ψ), mesmo horário em que foram fixados em 3,7% de paraformaldeído, para a realização da técnica de TUNEL(●).

4.4 Resultados e Discussão

Os embriões foram submetidos a um bloqueio do Ψ_{mm} por 32 h, durante o cultivo *in vitro*, em diferentes locais da cadeia respiratória, com cianeto de potássio, potente inibidor do quarto complexo respiratório agindo no bloqueio da transferência de elétrons entre o citocromo c oxidase e oxigênio; antimicina A que age no complexo III bloqueando a transferência de elétrons do citocromo b para o citocromo c_1 e a oligomicina que interage apenas com a ATP sintetase bloqueando fluxo de prótons para o interior da matriz (LENHINGER, 2002).

Após o bloqueio, realizou-se a estimativa do Ψ_{mm} pela técnica de JC-1. Os blastômeros foram avaliados individualmente e as informações armazenadas por embrião (número de blastômeros JC-1 positivos), com base na proporção de fluorescência vermelha pela verde a fim de averiguar uma possível alteração da OXPHOS e sua relação com a fragmentação do DNA (Figura 8).

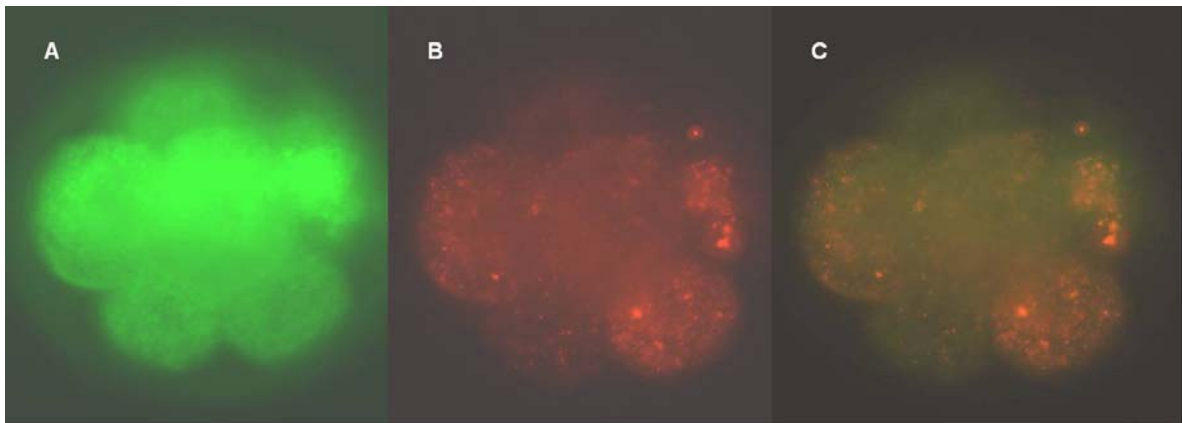


Figura 8: Fotomicrografia em epifluorescência da técnica de coloração de JC-1 em embriões com 80 hpi: A) Blastômeros corados em verde, indicam a localização de mitocôndrias, B) Blastômeros corados em vermelho, indicam potencial de membrana mitocondrial; C) Sobreposição das imagens A e B.

Os resultados da estimativa do potencial de membrana mitocondrial são indicativos de que a antimicina A e a associação com oligomicina não foram capazes de bloquear o Ψ_{mm} (ambos apresentaram 100% de embriões positivos para JC-1). O cianeto de potássio, no entanto, apresentou um bloqueio do Ψ_{mm} quando

comparado ao grupo controle (78,35% dos embriões apresentaram bloqueio, $p < 0,05$; tabela 4).

Tabela 4: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em embriões 8 células submetidos a diferentes tratamentos.

<i>Tratamento</i>	<i>Número de 8 células</i>	<i>Embriões JC-1 negativos</i>	
		<i>Número (N)</i>	<i>%</i>
Controle	201	31	15,42 ^B
Oligomicina 500ηM	163	0	0,00 ^A
Oligomicina 1μM	30	0	0,00 ^A
Antimicina 250ηM	34	11	32,35 ^C
Antimicina 500ηM	118	0	0,00 ^A
Oligo e AA (1μM e 500ηM)	21	0	0,00 ^A
Oligo e AA(500ηM e 250ηM)	23	0	0,00 ^A
KCN 500μM	97	76	78,35 ^D

^{A-B-C-D} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A inibição do transporte de elétrons utilizando-se antimicina A causa despolarização da membrana mitocondrial e diminuição do Ψ_{mm} . Em contraste, a inibição do complexo F_0F_1 mitocondrial pela oligomicina aumenta o Ψ_{mm} (KALBACOVA, 2003). Em teoria a associação de ambas as drogas deveria manter um baixo Ψ_{mm} (informação verbal)*. Estes dados corroboram parcialmente com os resultados encontrados no presente trabalho, no qual todos os embriões do grupo tratado com oligomicina apresentaram potencial de membrana mitocondrial. Entretanto, a antimicina A (500 η M) não apresentou diminuição do Ψ_{mm} nos embriões em comparação com o grupo controle.

Este efeito pode estar vinculado com respostas distintas do embrião à droga, o que pode levar à persistência do Ψ_{mm} . Tzung (2001) mostrou com a utilização de células transfectadas superexpressando BCL-xL que a antimicina A e peptídeos pró-apoptóticos de domínio BH3 ocupam o mesmo local na fenda hidrofóbica e competem pelo mesmo local de ligação nas proteínas da família BCL₂. Quando há competição da ligação de ambos, há uma falha no mecanismo anti-apoptótico do BCL-xL e a célula entra no processo de apoptose. Confrontando com os dados

* Informação fornecida por Aníbal Eugênio Vercesi na Universidade de Campinas, em Campinas, São Paulo, em outubro de 2005.

obtidos, acredita-se que o modelo embrião possa ter pouca expressão de BCL-xL e com isso, a antimicina apesar de causar o bloqueio da OXPHOS, não possui mecanismos para diminuir o potencial de membrana mitocondrial. Neste caso, a associação antimicina e oligomicina levaria a um aumento do potencial pela presença de competidores BCL-xL (antimicina) que poderiam levar a um desbalanço de fatores pró e anti apoptóticos.

Os embriões avaliados no presente trabalho apresentaram oscilações de Ψ_{mm} quando tratados com KCN e antimicina A. Estas podem ter ligação com a qualidade dos embriões, que apresenta uma variação sazonal devido à competência de desenvolvimento dos oócitos coletados e condição do animal no abate (THOMPSON, 2000).

Como os embriões foram submetidos a um tratamento prolongado (32 horas), há possibilidade de que tenha havido uma compensação da perda de ATP via OXPHOS com o aumento da taxa de glicólise, adaptando-se às mudanças do meio e com isso, os embriões tratados com drogas que deveriam diminuir o Ψ_{mm} (como antimicina A e associação de oligomicina e antimicina A) apresentavam alto Ψ_{mm} . Embriões *in vivo* apresentam mudanças metabólicas no oviduto caracterizada por transições de ambiente aeróbico para anaeróbico no útero, levando a um alto consumo de piruvato (BRISON, 1994).

Com o intuito de se observar o efeito do tempo durante o cultivo embrionário, foi realizado o cultivo com a associação dos agentes oligomicina e antimicina A e utilizou-se um desacoplador (CCCP) que dissipa o gradiente de prótons aumentando a permeabilidade da membrana interna mitocondrial (BARACCA, 2003), em diferentes tempos de incubação (30 minutos, 1 hora e 12 horas) e diferentes concentrações. Os dados obtidos indicam que não houve efeito de tempo e dose (Figuras 9, 10), apenas efeito de tratamento com a associação dos agentes em relação ao controle como mostrado na figura 11 ($p < 0,05$).

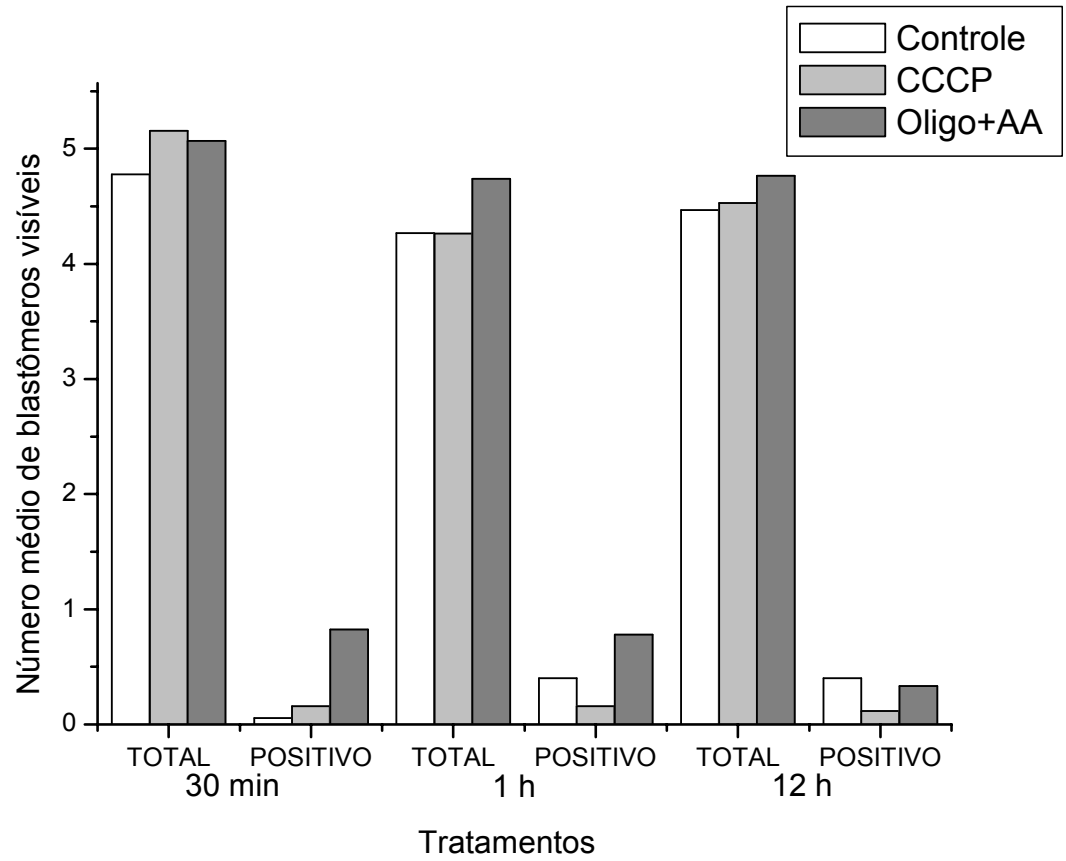


Figura 9: Número médio de blastômeros positivos em diferentes tempos de incubação para a técnica de JC-1 ($p < 0,05$).

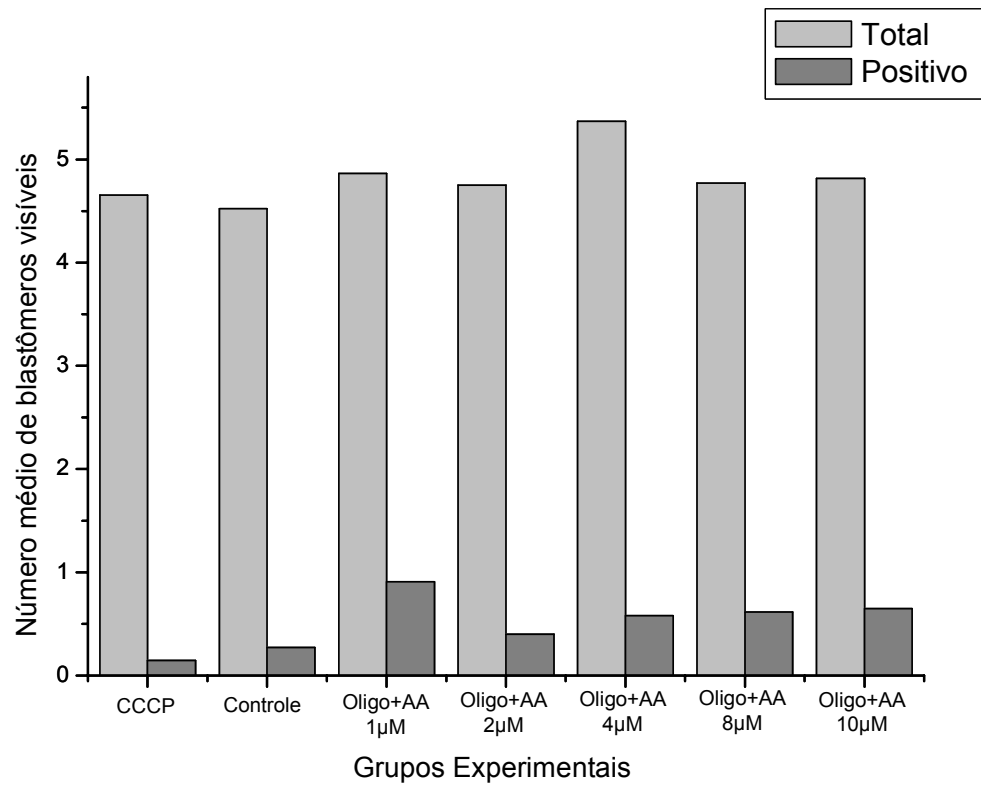


Figura 10: Número médio de blastômeros positivos de embriões submetidos a diferentes doses (1µM, 2µM, 4µM, 8µM e 10µM) da associação dos agentes AA e oligomicina para a técnica de JC-1 ($p < 0,05$).

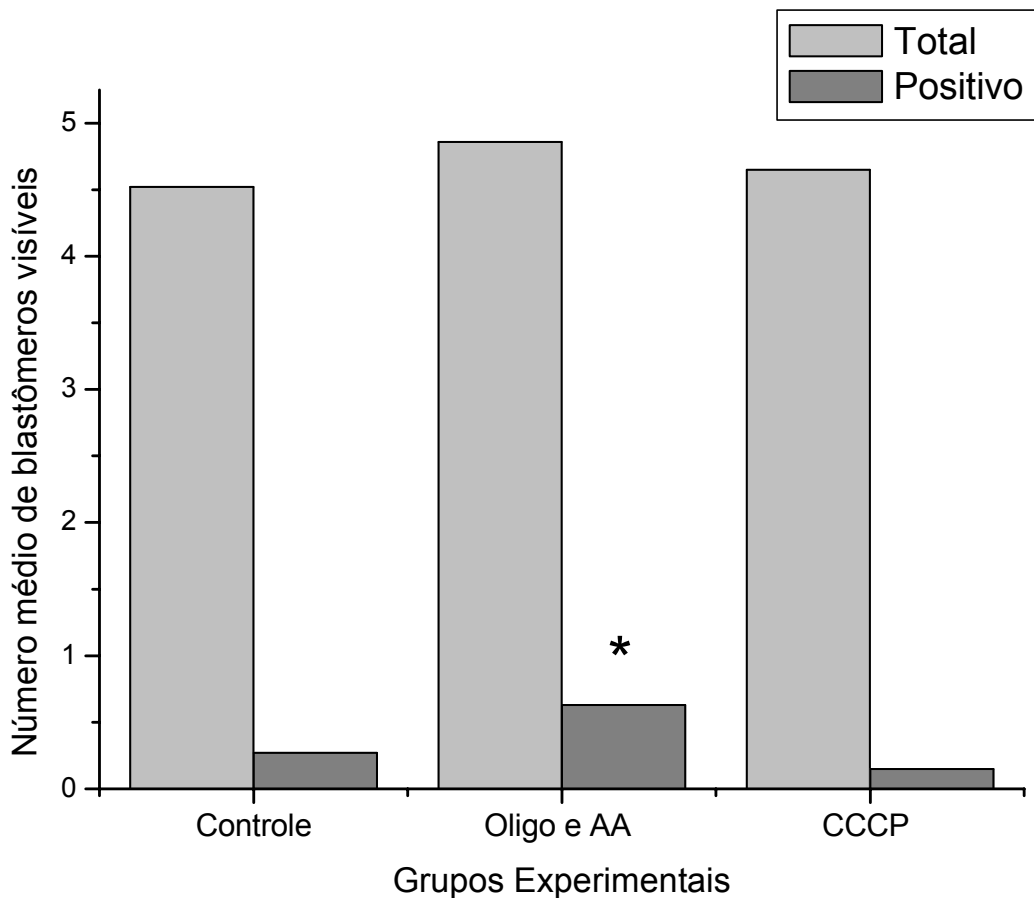


Figura 11: Número médio de blastômeros positivos em embriões submetidos a diferentes agentes bloqueadores da OXPHOS para a técnica de JC-1. *Indica diferença em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

Dey (2000) avaliando células de osteossarcomas utilizando estaurosporina (STP), um agente inibidor de proteínas cinases e pró-apoptótico, durante 6 horas, encontrou um aumento no Ψ_{mm} . ao contrário do esperado. Acredita-se que com o bloqueio, possa ter ocorrido um aumento do ATP no citosol e com isso, ocorreu uma inversão da troca ADP/ATP, movendo o ATP para dentro da célula, aumentando assim, as cargas negativas dentro da matriz mitocondrial a fim de manter um nível basal do Ψ_{mm} . Este efeito pode ter ocorrido quando se utilizou a associação dos agentes antimicina A e oligomicina que promoveu aumento do Ψ_{mm} comparado ao controle. No entanto, não justifica a manutenção do Ψ_{mm} quando da associação com a oligomicina.

Acton (2004) observou em embriões humanos que o aumento do Ψ_{mm} era acompanhado do aumento do grau de fragmentação do embrião embora ainda não se saiba se os eventos estão associados. Porém, Kalbacova (2003) afirmou que o Ψ_{mm} pode ser acompanhado de ou mesmo causar alguns processos fisiológicos e patológicos dentro das células, como apoptose, defeitos mitocondriais e mudanças metabólicas.

Com intuito de testar-se a relação dos processos de Ψ_{mm} e apoptose, embriões foram submetidos a avaliação da fragmentação internucleossômica *do DNA* pela técnica de TUNEL (Figuras 12, 13 e 14).

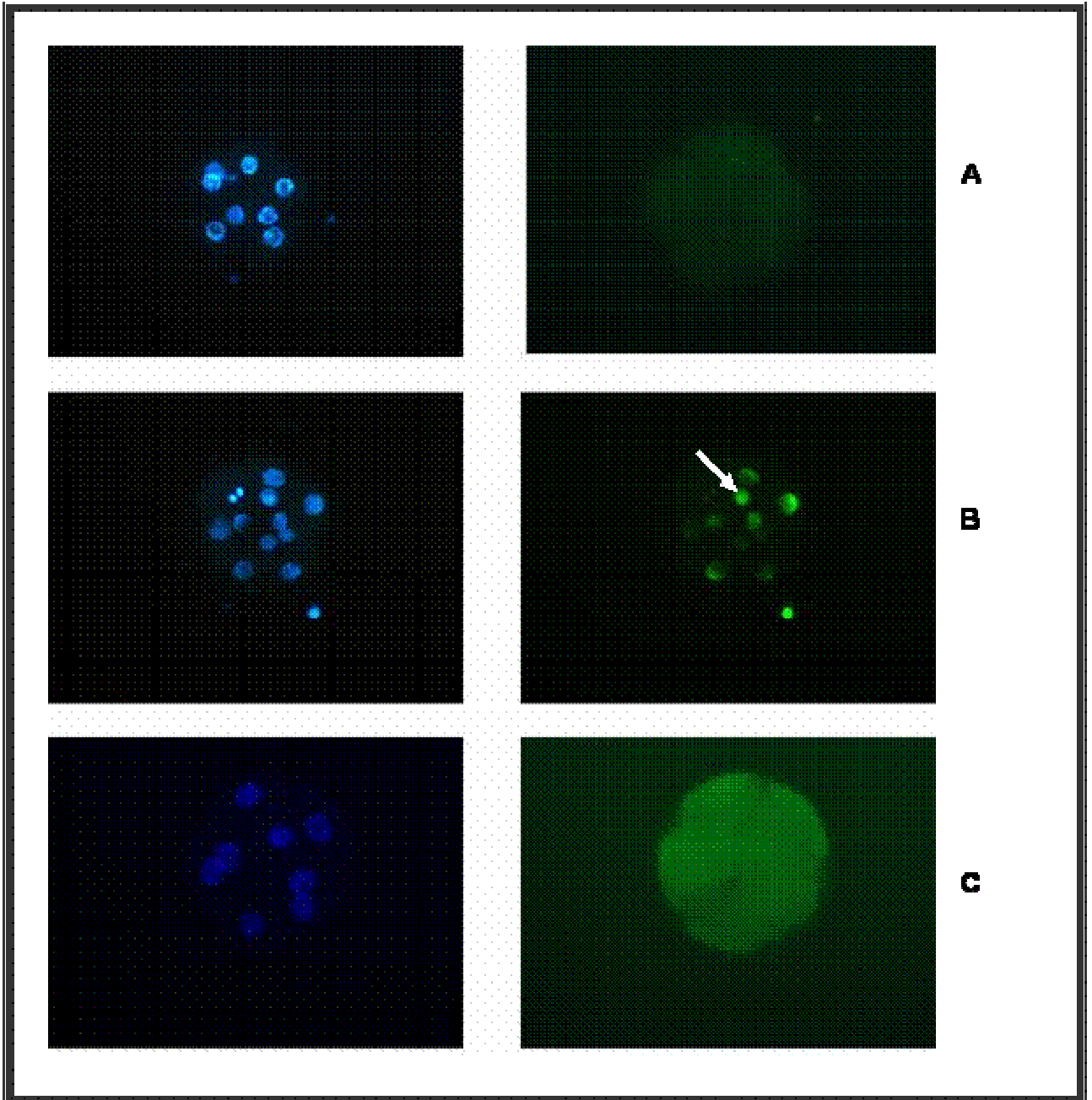


Figura 12: Fotomicrografia de epifluorescência de embriões com 80 hpi submetidos à técnica de TUNEL. Na coluna da esquerda coloração pelo Hoechst 33342 e na coluna da direita, coloração com FITC (nucleotídeo marcado); A) controle negativo; B) controle positivo; C) amostra controle (sem tratamento). Nas setas, as células que fluorescem verde pela incorporação do nucleotídeo marcado com o corante FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma é *background*.

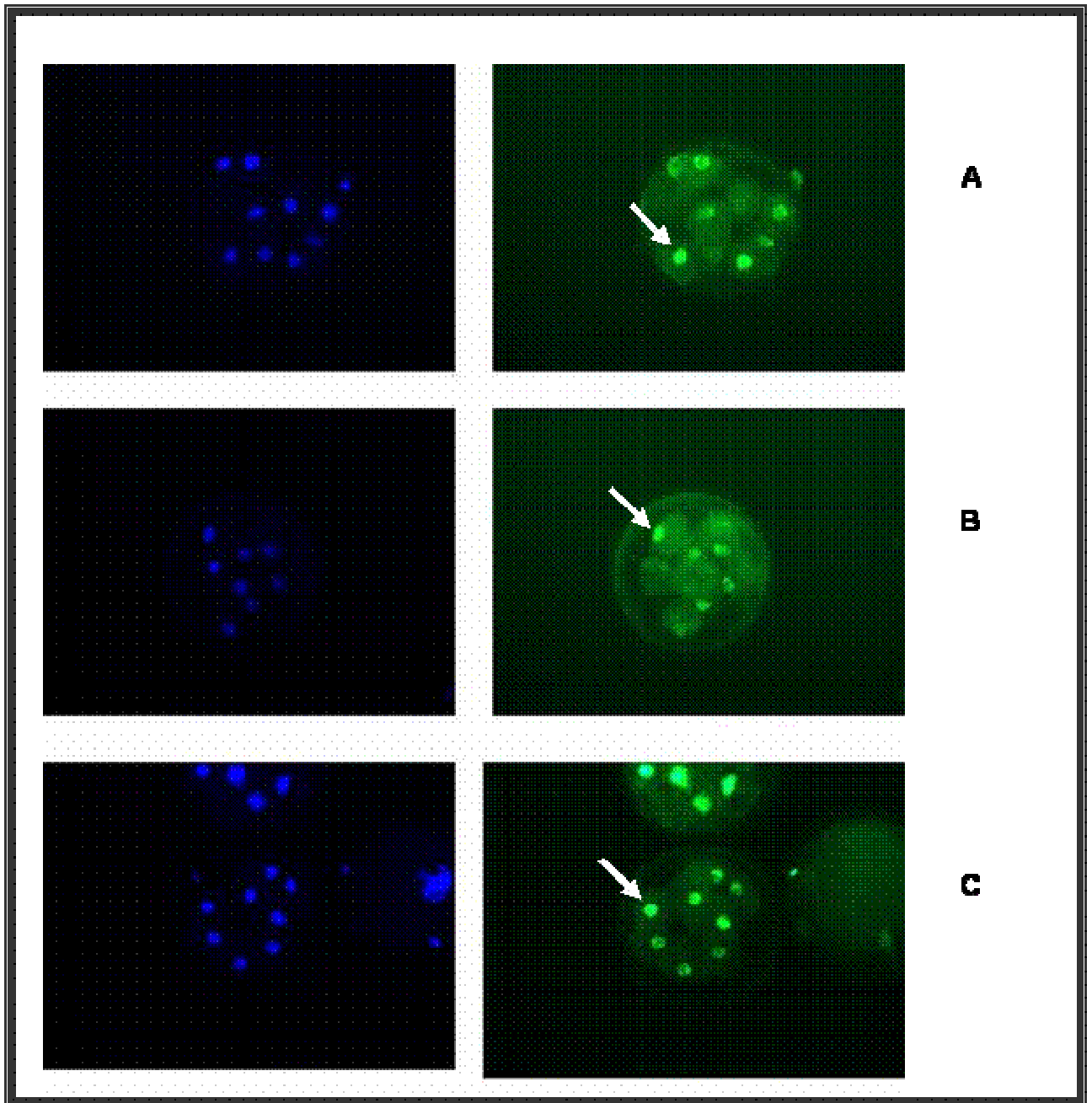


Figura 13: Fotomicrografia de epifluorescência de embriões com 80 hpi submetidos à técnica de TUNEL. Na coluna da esquerda coloração pelo Hoechst 33342 e na coluna da direita, coloração com FITC (nucleotídeo marcado); mostrando embriões positivos encontrados nos diferentes tratamentos; A) tratamento com antimicina A; B) tratamento com oligomicina; C) tratamento com ambos agentes (antimicina A e oligomicina). Nas setas, as células que fluorescem verde pela incorporação do nucleotídeo marcado com o corante FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma é *background*.

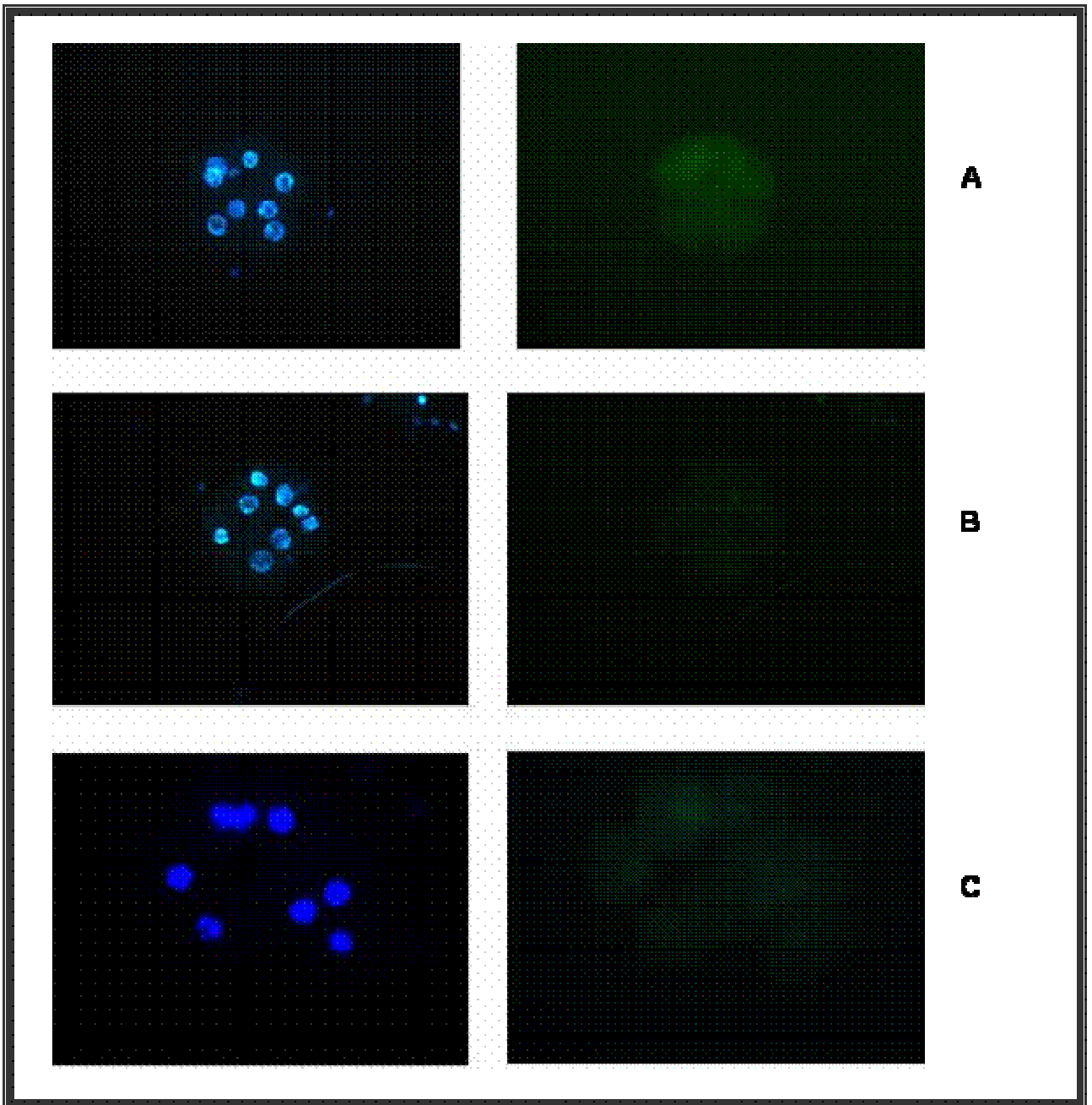


Figura 14: Fotomicrografia de epifluorescência de embriões com 80 hpi submetidos à técnica de TUNEL. Na coluna da esquerda coloração pelo Hoechst 33342 e na coluna da direita, coloração com FITC (nucleotídeo marcado); mostrando embriões negativos encontrados nos diferentes tratamentos; A) tratamento com antimicina A; B) tratamento com oligomicina; C) tratamento com ambos agentes (antimicina A e oligomicina). A coloração verde que aparece no citoplasma é *background*.

Foram avaliadas a taxa de embriões com pelo menos um núcleo positivo e a média de células positivas por embrião às 80 hpi (Tabela 5).

Tabela 5: Fragmentação nuclear estimada pelo TUNEL.

Grupo	Porcentagem de embriões com pelo menos um núcleo TUNEL positivo*	Porcentagem média de células positivas por embrião*
Controle	5,77%± 0,02 ^A	1,48 ± 0,04 ^A
Oligomicina (500 ηM)	31,25%± 0,05 ^B	29,08 ± 0,05 ^B
Antimicina (500 ηM)	28,24%± 0,05 ^B	28,56 ± 0,05 ^B
Oligomicina+antimicina	66,67%± 0,10 ^C	79,46 ± 0,09 ^C

* Erro padrão. Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (p<0,05).

A associação dos dois agentes (antimicina A e oligomicina) apresentou maior fragmentação nuclear quando comparada aos tratamentos com antimicina A e oligomicina (67, 28 e 31%, respectivamente). Estes, por sua vez, apresentaram maior taxa de fragmentação quando comparados ao grupo controle (6%, p<0,05).

Há uma relação direta entre Ψ_{mm} , transporte de íons e poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP; ACTON, 2004). A abertura do PTP está envolvida com a queda do Ψ_{mm} e liberação de citocromo c, por meio da indução da turgência mitocondrial e ruptura da membrana externa. Outros estudos mostram que há um aumento do Ψ_{mm} após o estímulo apoptótico, acompanhado de uma diminuição no decorrer do processo de morte (DEY, 2000).

Há relatos de que o uso de agentes bloqueadores leva a um aumento na quantidade de EROS levando ao processo de apoptose (DEY, 2000). Entretanto, estudos realizados com células epiteliais de ratos mostraram que os bloqueadores da OXPPOS, oligomicina e antimicina A, previnem a indução do apoptose pelo óxido nítrico, inibindo a liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol (DAIRAKU, 2004).

Com os resultados encontrados no presente trabalho, os tratamentos com inibidores da OXPPOS aumentaram o Ψ_{mm} e taxa de fragmentação nuclear. Há de se ressaltar que a utilização de inibidores da OXPPOS provoca uma interferência no metabolismo do embrião e tal injúria metabólica aguda pode levar a um desbalanço

do potencial de óxido-redução, aumento de radicais de oxigênio culminando com o processo de morte celular programada.

Alternativamente, um processo intrínseco no embrião pode levar a ativação da cascata de MCP mediante abertura de PTP, se houver deficiência de fatores como o ATP. O aparecimento de proteínas pró-apoptóticas da família BCL₂ como BAX (MEIRELLES, 2004) é relatado justamente nesta fase do desenvolvimento (80 hpi). Um alto potencial de Ψ_{mm} aliado à presença de competidores BCL-xL (antimicina) poderia levar a um aumento da taxa de fragmentação nuclear.

4.5 Conclusões

Com estes resultados obtidos podemos concluir que:

- O tratamento dos embriões com antimicina A não resultou na diminuição do potencial de membrana mitocondrial e esta resposta parece estar ligada a uma resistência dos embriões.
- O tratamento dos embriões com oligomicina levou a um aumento do Ψ_{mm} em todos os embriões testados.
- O tratamento dos embriões com oligomicina e antimicina A levou a um aumento do Ψ_{mm} .
- Embriões tratados com antimicina A e oligomicina apresentaram maior fragmentação nuclear quando comparada aos tratamentos com antimicina A e oligomicina .
- O tratamento dos embriões com oligomicina e/ou antimicina A não leva a uma diminuição do Ψ_{mm} no modelo estudado, portanto, não foi possível testar a hipótese de que o Ψ_{mm} é necessário para o estabelecimento da MCP.

4.6 *Perspectivas*

Apesar de não ter sido possível confirmar a relação da diminuição do Ψ_{mm} com a perda da capacidade do processo de morte celular programada em embriões bovinos, foi observada uma correlação positiva entre Ψ_{mm} e fragmentação nuclear.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL

5.1 *Discussão Geral*

Neste trabalho, nossa proposição foi determinar se os processos de morte celular programa e potencial de membrana mitocondrial em embriões bovinos estão correlacionados. A estratégia para este fim foi realizar o bloqueio da OXPHOS as 48hpi e observar o potencial de membrana mitocondrial e capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

Foram utilizados antimicina A e cianeto de potássio como bloqueadores de elétrons, oligomicina como bloqueador do complexo ATPase e atmosfera livre de oxigênio a fim de inibir o processo de OXPHOS e conseqüentemente, o potencial de membrana mitocondrial. No modelo proposto neste trabalho, os tratamentos foram avaliados quanto ao número de 8 células e blastocisto, análise sensitiva de membrana (JC-1) para potencial de membrana mitocondrial e análise de fragmentação nuclear (TUNEL).

O tratamento com cianeto de potássio permitiu um efeito temporário no bloqueio da OXPHOS, podendo ser utilizado apenas quando se deseja uma inibição transitória.

O grupo de tratamento oligomicina e antimicina A nas doses utilizadas não alterou a capacidade do embrião atingir o estágio de 8 células. Entretanto, esta inibição inviabilizou a capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto possivelmente mediante diminuição das reservas embrionárias.

A associação dos agentes não levou a uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial e, aparentemente, o modelo embrionário tem um comportamento distinto de outros modelos celulares descritos. Conforme mostrado na tabela 6, o Ψ_{mm} mostra uma correlação positiva com a fragmentação nuclear e negativa com o potencial de desenvolvimento a blastocisto. Sendo assim, pode-se sugerir que o bloqueio embrionário neste modelo foi causa/conseqüência da MCP. A análise de TUNEL mostrou alta taxa de fragmentação nos grupos tratados com os inibidores da OXPHOS, possivelmente pela presença de competidores BCL-xL (antimicina) que poderiam levar a um desbalanço de fatores pró e anti apoptóticos e aumento da taxa de fragmentação nuclear.

A condição de privação de oxigênio nos embriões não permitiu o desenvolvimento durante as primeiras horas de cultivo sendo aparentemente as clivagens iniciais dependentes de oxigênio/OXPHOS.

Tabela 6: Resumo geral dos resultados comparando a proporção de desenvolvimento a 8 células e blastocisto, embriões positivos para potencial de membrana mitocondrial e TUNEL nos diferentes tratamentos

<i>Grupo</i>	<i>8 células</i>	<i>Ψmm</i>	<i>TUNEL</i>	<i>Blastocisto</i>
<i>Controle</i>	+	+	+	+
<i>Oligomicina+antimicina</i>	+	+++	+++	-
<i>0% de oxigênio</i>	-	NA*	NA	NA

* NA: não avaliado

5.2 Conclusão Geral

Não foi possível testar a hipótese de que o Ψ mm é necessário para o estabelecimento da MCP, uma vez que os tratamentos utilizados neste trabalho não levaram a uma diminuição do Ψ mm nos embriões. Todavia, foi observada uma correlação positiva entre Ψ mm e fragmentação nuclear.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACTON, B.M. et al. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.10, n.1, p.23-32, 2004.
- BARACCA, A. et al. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F_0 during ATP synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1606, p.137-146, 2003.
- BHATTACHARYA, R.; LAKSHMANA RAO, P.VG. Cyanide induced DNA fragmentation in mammalian cell cultures. **Toxicology**, Amsterdam, v. 123, p. 207-215, 1997.
- BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Blastocoel cavity formation by preimplantation rat embryos in the presence of cyanide and other inhibitors of oxidative phosphorylation. **Journal Of Reproduction And Fertility**, Cambridge, v. 101, p. 305-309, 1994.
- CHANDEL, N.S.; SCHUMACKER, P.T. Cells depleted of mitochondrial DNA (p^0) yield insight into physiological mechanisms. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.454, p.173-176, 1999.
- CUMMINS, J.M. Mitochondria: potential roles in embryogenesis and nucleocytoplasmic transfer. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.7, n.2, p.217-228, 2001.
- DAIRAKU, N. et al. Oligomycin and antimycin A prevent nitric oxide-induced apoptosis by blocking cytochrome C leakage. **Journal Of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 143, n.3, p.143-51, 2004.
- DEY, R.; MORAES, C.T. Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of BCL-xL in osteosarcoma cells. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 275, n.10, p.7087-7094, 2000.

- DHARAP, S.S. et al. Molecular targeting of BCL-2 and BCL-XL proteins by synthetic BH3 peptide enhances the efficacy of chemotherapy. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, Bethesda, v.15, p.1-37, 2005.
- DONNAY, I.; LEESE, H.J. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.53, p.171-178, 1999.
- ECKERT, J. et al. Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine pre implantation embryos *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**, Victoria, Collingwood, v.10, p.327-332, 1998.
- EPPIG, J.J. et al. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown *in vivo*: follicle-stimulating hormone and insulin. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.59, n.6, p.1445-53, 1998.
- FARIN, P.W. et al. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Theriogenology**, Los Altos, v.44, n.3, p.339-349, 1995.
- GALITOVSKY, V.E.; GOGVADZE, V.G. Inhibitors of mitochondrial energy production prevent DNA internucleosomal fragmentation in thymocytes. **Biochemistry (Moscow)**, Moscow, v.63, n.12, p.1374-1377, 1998.
- GRAAF, A.O. et al. Bcl-2 prevents loss of mitochondria in CCCP-induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, New York, v.299, p.533-540, 2004.
- GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, Stanford, v.281, p.1039-1312, 1998.
- HARDY, K. et al. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v.98, p.1655-1660, 2001.
- HARDY, K.; HANDYSIDE, A.H.; WINSTON, R.M. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late pre-implantation development in vitro. **Development**, Washington, v.107, p.597-604, 1989.

HARVEY, A.J. et al. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.71, p.1108-1119, 2004.

_____. Regulation of early development. **Reproduction**, Cambridge, v.123, p.479-486, 2002.

HEUVEL, L.V.; SMEITINK, J. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. **BioEssays**, Cambridge, v.23, p.518-525, 2001.

JANSEN, R.P.S. Origin and persistence of the mitochondrial genome. **Human Reproduction**, Cambridge, v.15, p.1-10, 2000.

JENSEN, M.A. et al. Preconditioning-induced protection against cyanide-induced neurotoxicity is mediated by preserving mitochondrial function. **Neurochemistry International**, Oxford, v.40, p.285-293, 2002.

JOZA, N. et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, London, v.410, p.549-554, 2001.

JURISICOVA, A.; ACTON, B.M. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. **Reproduction**, Cambridge, v.128, p.281-291, 2004.

JURISICOVA, A.; VARMUZA, S.; CASPER, R.F. Involvement of programmed cell death in pre-implantation embryo demise. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.1, p.558-566, 1995.

KALBACOVA, M. *et al.* Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. **Cytometry**, New York, v. 52, n.2, p.110-116, 2003.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.R.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v.26, p.239-257, 1972.

- KIM, S.B.; BERDANIER, C.D. Oligomycin sensitivity of mitochondrial F1F0- ATPase in diabetes-prone BHE/Cdb rats. **American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.29, p.E702-707, 2005.
- LEESE, H.J. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. In: MILLIGAN, S.R. **Oxford reviews of reproductive biology**. 13. ed.: Oxford, UK: Oxford University, 1991, p. 35-72.
- LEHNINGER, A.L. Fosforilação oxidativa, estrutura mitocondrial e compartimentação do metabolismo respiratório. In: LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1984. p.333-361.
- LONG, C.R. et al. Dual labeling of the cytoskeleton and DNA strand breaks in porcine embryos produced in vivo and in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.51, p.59-65, 1998.
- MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.27, p.1-11, 1992.
- MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.146, n.1, p.3-15, 1995.
- MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, Cambridge, v.8, p.57-68, 2000.
- MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K.; GARCIA, S. M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam v. 82-83, p.13-20, 2004.
- MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J.L. Mitochondria and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.252, p.1-15, 1998.
- MIRANDA, L.E.C. et al. A atividade respiratória mitocondrial é um bom parâmetro para a lesão por esquia e reperfusão hepática? **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.42, n.2, p.89-94, 2005.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society A**, London, v.135, n.3, p.370-384, 1972.

p.299-306, 1996.

p.945-950, 1996.

PARONE, P.A.; JAMES, D.; MARTINOU, J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochimie**, Paris, v.84, p.105-111, 2002.

PARTRIDGE, R.J.; LEESE, H.J. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. **Reproduction Fertility Development**, Victoria, v.8,

PEARCE, L.L. et al. Reversal of cyanide inhibition of cytochrome c oxidase by the auxiliary substrate nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, n.52, p.52139-52145, 2003.

REERS, M.; SMILEY, S.T.; MOTTOLA-HARTSHORN, C.; CHEN, A.; LIN, M.; CHEN, L.B. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. **Methods in Enzymology**, New York, v.260; p.406-417, 1995.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, Washington, v.30, p.4480-4486, 1991.

RIEGER, D. et al. Effect of 2,4-dinitrophenol on the energy metabolism of cattle embryos produced by *in vitro* fertilization and culture. **Reproduction, Fertility and Development**, Callingwood, v.14, p.339-343, 2002.

RIEGER, D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.37, p.75-93, 1992.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. **Science**, Stanford, v.283, p.1488-1493, 1999.

SAS INSTITUTE INC. **User's guide**: basic and statistic. Cary, NC, 1995. 1.686p.

SHARMA, K. et al. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. **Pharmacology and Therapeutics**, New York, v.88, n.3, p.333-347, 2000.

SHCHEPINA, L.A. et al. Repiration and mitochondrial membrane potential are not required for apoptosis and anti-apoptotic action of BCL-2 in hela cells. **Biochemistry (Moscow)**, Moscow, v.67, n.2, p.222-226, 2002.

SMEITINK, J.; VAN DEN HEUVEL, L.; DIMAURO, S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. **Nature**, London, v.2, p.342-352, 2001.

TAMASSIA, M. et al. In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. **Biology of Reproduction**, Champaing, v.71, p.697-704, 2004.

THIBIER, C.M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. *Savoy*, v..6, 2004. Disponível em: http://www.iets.org/pdf/data_retrieval/december2004.pdf. Acesso em: 19 dez. 2005.

THOMPSON, J.G. et al. Effect of inhibitors and uncouples of oxidative phosphorylation during compactation and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v.118, p.47-55, 2000.

THOMPSON, J.G. et al. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v.106,

TILLY, J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, London, v.1, p.162-172, 1996.

TRIMARCHI, J.R. et al. Oxidative phosphorylation-dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. **Biology of Reproduction**, Champaing, v.62, p.1866-1874, 2000.

TSUGE, K.; KATAOKA, M.; SETO, Y. Rapid determination of cyanide and azide in beverages by microdiffusion spectrophotometric method. **Journal of Analytical Toxicology**, Niles, v.25, p.228-236, 2001.

TZUNG, S.P. et al. Antimycin A mimics a cell-death-inducing BCl₂ homology domain 3. **Nature Cell Biology**, London, v.3, p.183-191, 2001.

VAN BLERKOM, J.V.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. Inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_{mm}$), cytoplasmic ATP content and free Ca^{2+} levels in metaphase II mouse oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v.18, n.11, p.2429-2440, 2003.

WARD, M.W. et al. Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **The Journal of neuroscience**, Baltimore, v. 20, n.19, p.7208-7219, 2000.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of BCL-2 and BAX proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.70, p.159-169, 2002.

YUAN, Y.Q. et al. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, v.59, p.1585-1596, 2003.