

ANA RITA SOUSA COUTINHO

**Presença da Caspase-3 ativa e das proteínas de reparo de lesões  
do DNA em embriões suínos ativados partenogeneticamente com  
alta ou baixa capacidade de desenvolvimento**

São Paulo

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA RITA SOUSA COUTINHO

**Presença da Caspase-3 ativa e das proteínas de reparo de lesões  
do DNA em embriões suínos ativados partenogeneticamente com  
alta ou baixa capacidade de desenvolvimento**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de Concentração:**

Reprodução Animal

**Orientadora:**

Profa Dra. Mayra Elena Ortiz D`Ávila Assumpção

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Vilceu Bordignon

São Paulo

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1890  
FMVZ

Coutinho, Ana Rita Sousa

Presença da Caspase-3 ativa e das proteínas de reparo de lesões do DNA em embriões suínos ativados partenogeneticamente com alta ou baixa capacidade de desenvolvimento / Ana Rita Sousa Coutinho. -- São Paulo: A. R. S. Coutinho, 2007.

114 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.

1. Apoptose. 2. Caspase-3. 3. Suínos. 4. Embriões. 5. Ativação partenogenética. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

*Comissão de Bioética*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da apoptose em embriões *in vivo*, *in vitro* e clonados em suínos", protocolo nº645/2005, utilizando 40 marrãs, sob a responsabilidade da Profª Drª Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Apoptosis evaluation in swine embryos *in vivo*, *in vitro* and cloning", protocol number 645/2005, utilizing 40 swine's, under the responsibility of Prof. Dr. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 31 de março de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: COUTINHO, Ana Rita Sousa

Título: **Presença da Caspase-3 ativa e das proteínas de reparo de lesões do DNA em embriões suínos ativados partenogeneticamente com alta ou baixa capacidade de desenvolvimento**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### **Banca Examinadora**

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

**"You can do anything if  
you put your focus on  
how to do it rather than  
on why I can't"**

**Bob Proctor**

Dedico este trabalho a toda  
minha família Coutinho e Sousa,  
em especial aos meus pais  
Urubatan e Rita e meus irmãos  
Cesar e Pique, pela confiança e  
paciência durante esses anos  
longe e juntos. Amo Vocês!!!!

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, por mais uma vez ter orientado-me numa das fases mais importantes da minha vida. Espero sempre poder seguir seu exemplo de dedicação e amor pelo trabalho, bem como espelhar-me em sua personalidade forte, sincera e guerreira diante da vida. Por mais longe que estiver, sempre guardarei seus ensinamentos em meu coração com amor e respeito.

Ao meu Co-orientador Dr. Vilceu Bordignon, ao permitir que um dos meus maiores sonhos se tornasse realidade. Não há palavras para agradecer seus ensinamentos, suas idéias brilhantes, sua paciência e principalmente atenção e carinho recebidos de você e toda a sua família, durante minha estadia no Canadá. Mais uma vez muito obrigada, pelas condições de trabalho oferecidas e por ter contribuído neste aprendizado científico e de vida, mostrando-me novas oportunidades e indagações, que assim como este trabalho vão gerar bons frutos. Sem tudo isso, não seria possível a execução deste trabalho...

Ao mais novo e nobre Diretor desta Faculdade maravilhosa (FMVZ-USP), Dr. Visintin, mais uma vez muito obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório oferecendo-me condições excelentes de trabalho, aprendizado e principalmente proporcionando-me a oportunidade de participar desta equipe maravilhosa de "Cientistas e Pesquisadores" do seu laboratório e da Profa Mayra. Vou sentir muitas saudades de todos vocês e desta Faculdade.

A todos os meus velhos amigos "Cientistas" do laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal; Ale, Alezinha, Renata, Camilla, Mariana, Aníbal, Maran, Marcela, Flávia, Weber, Febem, Zequinha e

Leydson. Foi um prazer enorme trabalhar com vocês durante estes anos. Muito obrigada pelas sugestões, discussões de grupos, festas, viagens, congressos, churrascos, choros, risadas e principalmente muito obrigada pelo apoio de todos vocês nesses últimos 6 meses. Vocês foram e são maravilhosos, sem ajuda de vocês eu não chegaria até aqui.

Aos meus novos amigos que conheci em Montreal: Marcelinho, Marcelão, Naylinha, Laurinha, Eugenie, Maren, Marie Claude, Chris, Frederico, Márcia, Marcela, Pedro, Jean, Fábio, Lívia, André, Claudia, Adalberto, Adelina e toda sua enorme família. Sempre vou agradecer a Deus por terem cruzado meu caminho, principalmente num lugar tão maravilhoso como Ste Anne de Bellevue. Espero ainda vivermos momentos alegres, como aqueles de outubro de 2005 a abril de 2007.

A todos meus primos, cunhadas e amigos: Luciana, Aline, João, Adriana, Renata, Pricila, Mariana, Fabiana, Fefita, Mônica, Aninha, Vivi, Bobo, Paulo, Doug... Vocês sempre foram e sempre serão meus eternos irmãos. Obrigada por terem participado dos meus momentos felizes e tristes.

A todos meus amigos do Departamento de Reprodução Animal de São Paulo e Pirassununga: Alexandre, Vanessa, Zé Rodrigo, Cristina, Liegi, Marcílio, Paola, Rodriguinho, Zé Nélio, Gabriel, Fefita, Sheyla, Marquinhos, Moises, Ligia, Claudinha e Gutinho. Adorei todos os momentos que passamos juntos.

Aos Professores Dr. Flávio Meirelles, Dr. Mario Binelli, Dra Maria Lucia Zaindan, Dra Sarah Kimmins, Dra Annelize Traldi e Dra Camila Vannuchi.

A todos os funcionários da USP e da McGill, em especial Harumi, Thais, Bel, Elza e Cinthia.

Às duas mais maravilhosas e grandiosas Universidades do mundo, USP e McGill, por todas as oportunidades de aprendizado que obtive, e pelas pessoas maravilhosas que conheci nestes estabelecimentos.

As Instituições financiadoras FAPESP, CAPES e NSERC, que acreditaram no sucesso deste trabalho.

## RESUMO

COUTINHO, A. R. S. **Presença da Caspase-3 ativa e das proteínas de reparo de lesão do DNA em embriões suínos ativados partenogeneticamente com alta ou baixa capacidade de desenvolvimento.** [Presence of active Caspase-3 and DNA damage and repair proteins in parthenogenetically activated swines embryos of high and low developmental capacity]. 2007. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Apoptose é uma forma de morte celular extremamente conservada que tem papel primordial no desenvolvimento animal e na homeostasia celular, agindo como mecanismo de controle de qualidade com a função de remover células danificadas, em excesso ou não-funcionais. Este processo tem papel importante no desenvolvimento embrionário pré-implantacional, pois as células embrionárias estão sujeitas aos danos no DNA que podem ativar mecanismos de reparo de DNA ou induzir apoptose, que culmina com a ativação da enzima caspase-3 responsável pela clivagem de vários substratos celulares. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivos determinar a presença da Caspase-3 ativa (+casp-3) e sua influência no desenvolvimento de embriões suínos no estágio de pré-implantação, bem como investigar a detecção de proteínas que atuam no mecanismo de lesão e reparo do DNA. Foram realizados 4 experimentos com oócitos imaturos de fêmeas pré-púberes, obtidos de ovários oriundos de abatedouro, maturados *in vitro* (MIV) por 44-46 horas. Oócitos em metáfase II (MII) foram ativados partenogeneticamente (AP) com ionomicina e cloreto de estrôncio e cultivados *in vitro* em PZM3 a 38°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar e alta umidade. No primeiro experimento os embriões foram classificados em 4 grupos de acordo com o tempo de clivagem e o número de células: R4 – clivado às 24 horas e com  $\geq 4$  células às 48 horas; R2 – clivado às 24 horas e com 2 ou 3 células às 48 horas; L4 – não clivado às 24 horas e com  $\geq 4$  células às 48 horas; L2 – não clivado às 24 horas e com 2 ou 3 células às 48 horas. Os embriões foram então avaliados no D-6 do CIV para determinação do índice de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Os embriões do grupo R apresentaram maiores índices de blastocisto, R4 - 66,1 (174/263) e R2 - 59,6 (62/104) e maior número de núcleos por blastocisto, R4 - 40,1 e R2 - 37,8, quando comparados ao grupo L, L4 - 15,4 (6/39) e L2-16,8 (13/77); L4-18,5 e L2-18,3 (Qui-quadrado e Tukey-Kramer, respectivamente,  $P < 0,05$ ); entretanto, não houve diferença entre os grupos R4 e R2 e L4 e L2. Para o segundo experimento utilizou-se apenas embriões R e L, classificados às 24hs do início do CIV. Ambos os grupos (R e L) foram destinados à análise de imunocitoquímica para +casp-3 fixados nos D2, D4 e D6, sendo cada um destes dias considerado um sub-experimento e realizado em manipulações diferentes. Foi observada

localização citoplasmática da +casp-3 do D2 ao D6 e nuclear a partir do D5 de cultivo. A quantificação relativa da +casp-3 nos grupos R e L de cultivo foi de 2,4 vs 1,4; 1,1 vs 1,0 e 1,1 vs 1,2 para o D2, D4 e D6, respectivamente. Para avaliar a influência da +casp-3 no desenvolvimento de embriões suínos foi realizado o terceiro experimento utilizando o inibidor de caspase z-DEVD-fmk (100uM) durante a MIV, no início (D0 ao D2) ou no final (D4 ao D6) do cultivo. Embriões produzidos sem inibidor foram usados como controle. A presença do inibidor durante a MIV e no final do cultivo não afetou os índices de blastocistos. No entanto, a presença do inibidor durante as primeiras 48 horas de cultivo resultou em maior índice de blastocisto do que o grupo controle, 55,1 (59/107) e 37,5 (39/104) (Qui-quadrado,  $P < 0,05$ ). O último experimento foi realizado para investigar a presença das proteínas de reparo de lesão de DNA,  $\gamma$ H2AX, 53BP1, NSB1 e RAD52, em embriões desenvolvimento R e L. Não foi detectada 53BP1 em embriões suínos AP durante o desenvolvimento inicial. Embriões do grupo L apresentaram maior quantidade de  $\gamma$ H2AX no D-5 quando comparado ao grupo R; entretanto, não houve diferença de marcação para NSB1 e RAD52. Estes dados indicam que o mecanismo de apoptose interfere no desenvolvimento embrionário inicial com efeito positivo do inibidor de caspase, na taxa de blastocisto de embriões suínos AP. Embriões de desenvolvimento L apresentaram um aumento da sinalização às injúrias do DNA, entretanto, as diferenças quanto ao potencial de reparo do DNA lesado em embriões de diferentes potenciais de desenvolvimentos, ainda precisam ser melhor investigadas.

Palavras-chave: Apoptose. Caspase-3. Suínos. Embriões. Ativação partenogenética.

## ABSTRACT

COUTINHO, A. R. S. **Presence of active Caspase-3 and DNA damage and repair proteins in parthenogenetically activated swines embryos of high and low developmental capacity.** [Presença de Caspase-3 ativa e proteínas de reparo de lesão do DNA em embriões suínos ativados partenogeneticamente com alta ou baixa capacidade de desenvolvimento]. 2007. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Apoptosis is a highly conserved form of cell death that plays a major role in animal development and cellular homeostasis by acting as a quality control mechanism to remove cells that are damaged, nonfunctional, misplaced or supranumerary. This form of cell death plays a major role on preimplantation embryonic development since embryonic cells are often subject to DNA damage, triggering either DNA damage and repair mechanisms or apoptosis. Once initiated the apoptotic process leads to caspase activation and cleavage of cellular substrates. The aim of the present study was to quantify active Caspase-3 (+casp-3) and to determine the role of this pro-apoptotic enzyme on the development of preimplantation porcine embryos, as well as to investigate the presence and localization of DNA damage and repair proteins. Four experiments were conducted using slaughterhouse immature oocytes collected from pre-pubertal gilt ovaries and *in vitro* matured (IVM) for 44-46 h. Metaphase II (MII) oocytes were parthenogenetically activated (PA) using ionomycin and strontium chloride and cultured in PZM-3 at 38°C, 5% CO<sub>2</sub> in air and high humidity. In the first study embryos were distributed into 4 groups according to cleavage time and cell number: R4 – cleaved at 24 h with  $\geq$  4-cells at 48 h; R2 – cleaved at 24 h with 2-3 cells at 48 h; L4 – non-cleaved at 24 h with  $\geq$  4-cells at 48 h; L2 – non-cleaved at 24 h with 2-3 cells at 48 h. Group R embryos showed higher blastocyst rates R4-66.1 (174/263) and R2-59.6 (62/104) and more nuclei per blastocyst, R4-40.1 and R2-38.9, when compared to group L L4-15.4 (6/39) and L2-16.8 (13/77); L4-18.5 and L2-18.3 (Chi-square and Tukey-Kramer, P<0.05); however, there were no differences between R4 and R2 or L4 and L2. The second experiment used only early-(R) and late-cleaved embryos (L), classified at 24 h of IVC, fixed at D-2, D-4 and D-6 and then stained for +casp-3 immunofluorescence. In this embryos fixed at D-2, D-4 and D-6 were considered as sub-experiments conducted in different replicates. Active Caspase-3 cytoplasmic signal was detected in cultured embryos from D2 to D6 and nuclear signal was detected from D5 to D6. The relative amount of immunofluorescence signal for +casp-3 for groups R and L at D2, D4 and D6 of culture was 2.4 vs. 1.4; 1.1 vs. 1.0 and 1.1 vs. 1.2, respectively. A third experiment was conducted to evaluate the role of +casp-3 on porcine

preimplantation embryos. In this study the Caspase inhibitor Z-DEVD-fmk (100 uM) was supplemented during maturation of porcine oocytes or embryo culture (D0 to D2 or D4 to D6). Addition of the caspase inhibitor during IVM or D4 to D6 of culture did not affect blastocyst rate. However, caspase inhibition from D0 to D2 increased development of porcine embryos to the blastocyst stage [55.1 (59/107) and 37.5 (39/104) for control and Z-DEVD-fmk, respectively; Chi-square,  $P < 0.05$ ). The last experiment investigated the presence of DNA damage and repair proteins  $\gamma$ H2AX, 52BP1, NSB1, and Rad52 in early- and late-cleaved embryos by immunofluorescence. There was no 53BP1 signal in PA porcine embryos at beginning of IVC. Late-cleaved embryos showed higher  $\gamma$ H2AX signal than early-cleaved embryos; however, there was no difference between NSB1 and Rad52 staining between these embryos. In conclusion, apoptosis and DNA damage and repair mechanisms play a role on development of porcine embryos. Active caspase-3 is present in porcine embryos throughout the preimplantation period and inhibition of this enzyme at early stages of in vitro culture can increase blastocyst rate of PA embryos. Moreover, late-cleaved embryos carry higher DNA damage than early-cleaved embryos. Therefore, the relationship between DNA repair mechanism and developmental potential of porcine embryos need to be further investigated.

**Key words:** Apoptosis. Caspase-3. Swine. Embryos. Parthenogenetic activation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Vias de ativação da apoptose.....	37
Figura 2 -	Representação gráfica da cascata do mecanismo de reparo do DNA, em células somáticas .....	49
Figura 3 -	Esquema representativo gráfico do delineamento experimental do experimento prévio .....	53
Figura 4 -	Esquema representativo gráfico do delineamento do experimento 1 .....	57
Figura 5 -	Índice de blastocisto e número médio de núcleos por blastocisto no D-6 de cultivo nos diferentes grupos experimentais. Barras brancas – grupo R4; barras pretas - grupos R2; barras pontilhadas - grupos L4; barras com linhas horizontais - grupo L2. Os números acima das colunas representam os números de blastocistos avaliados. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os grupos no mesmo dia ( $p < 0,05$ ) .....	58
Figura 6 -	Esquema representativo gráfico do delineamento experimental 2 .....	62
Figura 7 -	Quantificação relativa de Caspase 3 ativa por densitometria (média $\pm$ EP) em embriões de desenvolvimento rápido (R) e lento (L). Barras brancas - controle negativo; barras pretas - grupo L; barras pontilhadas - grupo R. Os números acima das colunas representam os números de embriões analisados. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os grupos tratados no mesmo dia ( $p < 0,05$ ) .....	64
Figura 8 -	Imunodeteção de Caspase 3 ativa no D4 (A), D5 (B) e D6 (C). Marcação nuclear com Hoechst 33342 (1), Caspase 3 ativa (2) e sobreposição das imagens da 1 e 2 (3) em microscopia de Epifluorescência, aumento 200X.....	68
Figura 9 -	Esquema representativo gráfico do delineamento experimental 3, 1º etapa (+) presença do z-DEVD-fmk, (-) ausência do z-DEVD-fmk .....	67
Figura 10 -	Esquema representativo gráfico da 2º etapa do delineamento experimental 3 (+) presença do z-DEVD-fmk, (-) ausência do z-DEVD-fmk .....	69
Figura 11 -	Esquema representativo gráfico do delineamento experimental 3, 3º etapa.....	71
Figura 12 -	Índices de blastocisto e número médio de núcleos por blastocistos no D6 em embriões suínos AP, tratados com o inibidor z-DEVD-fmk no início do cultivo <i>in vitro</i> . Barras brancas – grupo controle; barras pretas - grupo 0-24hs; barras pontilhadas - grupo 0-48hs; barras com linhas horizontais - grupo 24-48hs. Os números acima das colunas representam os números de blastocistos. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os grupos tratados ( $p < 0,05$ ) .....	73

Figura 13 -	Quantificação relativa de Caspase 3 ativa em embriões suínos AP tratados e não tratados com z-DEVD-fmk. Barras brancas - controle negativo; barras pretas - grupos não tratados; barras pontilhadas - grupos tratados com inibidor do D4 ao D5; barras com linhas horizontais - grupo tratado com inibidor do D5 ao D6 e barras com linhas oblíquas - grupo tratado com inibidor do D4 ao D6. Os números acima das colunas representam os números de embriões analisados. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os grupos tratados no mesmo dia ( $p < 0,05$ ) .....	75
Figura 14 –	Esquema representativo gráfico do delineamento experimental 4 .....	78
Figura 15 -	Imunodeteccção de $\gamma$ H2AX em embriões suínos AP. Diferentes marcações no núcleo: pontos isolados >10 (1), pontos isolados <10 (2), marcação difusa característico de mitose (3). Microscopia de Epifluorescência, aumento 200X.....	79
Figura 16 -	Imunodeteccção de 53BP1 em embriões suínos AP no grupo R no D-2. Marcação do DNA com Hoechst33342 e ausência de marcação da 53BP1. Microscopia de Epifluorescência, aumento 200X.....	82
Figura 17 -	Imunodeteccção de proteínas de reparo do DNA em fibroblasto fetal de suíno radiados com UV. Marcação do DNA com Hoechst33342 (1), pontos isolados >10 ( $\gamma$ H2AX) (2), marcação para 53BP1 (3) e sobreposição das imagens da 1 e 2 e 3 (4). Microscopia Confocal, aumento 400X .....	82
Figura 18 -	Imunodeteccção de NSB1 em embriões suínos AP do grupo R no D-5. Marcação do DNA com Hoechst33342 e marcação nuclear da NSB1. Microscopia de Epifluorescência, aumento 200X .....	84
Figura 19 -	Imunodeteccção de Rad52 em embriões suínos AP no D-6. Marcação do DNA com Hoechst33342 e marcação nuclear da Rad52. Microscopia de Epifluorescência, aumento 200X.....	85
Figura 20 -	Modelo hipotético da cascata de ativação do mecanismo de reparo do DNA em embriões suínos AP.....	97

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Médias ( $\pm$ EP) dos índices de clivagem de embriões suínos AP no D-2 de cultivo nos diferentes grupos experimentais - São Paulo – 2007 ..... 54
- Tabela 2 – Médias ( $\pm$ EP) de núcleos positivos para caspase 3 ativa ao longo do cultivo *in vitro* - São Paulo – 2007 ..... 64
- Tabela 3 – Médias ( $\pm$ EP) dos índices de maturação, clivagem e desenvolvimento embrionário após a maturação de oócitos suínos na presença ou ausência de inibidor de capases (z-DEVD-fmk) - São Paulo – 2007..... 72
- Tabela 4 – Número médio de núcleos e índice de blastocistos Médias ( $\pm$ EP) de embriões suínos AP tratados com o inibidor z-DEVD-fmk no final do cultivo *in vitro* - São Paulo – 2007 ..... 74
- Tabela 5 – Média ( $\pm$  EP) de núcleos marcados para  $\gamma$ H2AX em embriões suínos AP de desenvolvimento rápido e lento, nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro* - São Paulo – 2007 ..... 80
- Tabela 6 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) do número de pontos de  $\gamma$ H2AX pelo número total de células nos D-4, D-5 e D-6 de CIV – São Paulo – 2007 ..... 81
- Tabela 7 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) das diferentes proteínas de reparo de DNA no núcleo e índice de marcação citoplasmática em embriões suínos AP nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro* - São Paulo- 2007 ..... 83
- Tabela 8 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) da NSB1 no núcleo e o índice de marcação citoplasmática em embriões suínos AP de desenvolvimento rápido e lento nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro* - São Paulo – 2007..... 84
- Tabela 9 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) da Rad52 no núcleo e o índice de marcação citoplasmática em embriões suínos AP de clivagem lenta e rápida nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro* - São Paulo -2007..... 85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC = Anticorpo

AIF = Fator indutor de apoptose

AP = Ativação Partenogenética

BSA = Albumina Sérica Bovina

CAD = caspase ativa pela DNase

CB = Citocalasina B

CHX = Ciclohexemide

CIV = Cultivo *in vitro*

CP = Corpúsculo Polar

D = Dia de cultivo

DFF / DFF40/DFF45= Fator de fragmentação do DNA em humanos

DMSO = Dimetilsulfóxido

DSBs = Quebra da fita dupla de DNA

EGF = Fator de crescimento epitelial

EthD-1 = Brometo de Etídio

FIV = fecundação *in vitro*

FSH = Hormônio Folículo Estimulante

H = Hoeschst 33342

HE = Hematoxilina e Eosina

IA= Inseminação Artificial

ICAD = inibidor do CAD

IP = Iodeto de Propídeo

LH = Hormônio Luteinizante

M I = Metáfase I

M II = Metáfase II

MCI = Massa Celular interna

MIV = Maturação *in vitro*

PARP = Poli ADP ribose polimerase

PBS = Solução tamponada de fosfato

PIV = Produção *in vitro*

PVA = Álcool polivinílico

PZM3 = Porcine Zygote Médium

RH = Recombinação Homóloga

SFB = Soro Fetal Bovino

TE = Trofotoderma

TLP = Tyroses Lactato Piruvat

TN = Tranferência nuclear

z-DEVD-fmk = Inibidor de Caspase 3 e 7

+ Casp-3 = Caspase 3 ativa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	26
2.1	BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS .....	26
<b>2.1.1</b>	<b>Produção <i>in vitro</i></b> .....	26
<b>2.1.2</b>	<b>Tempo de clivagem</b> .....	28
2.2	MORTE EMBRIONÁRIA .....	28
2.3	TIPOS DE MORTE CELULAR .....	29
<b>2.3.1</b>	<b>Apoptose</b> .....	31
<b>2.3.2</b>	<b>Vias de ativação da apoptose</b> .....	34
2.3.2.1	Mecanismos de ativação .....	35
2.3.2.1.1	<i>Bcl-2</i> .....	35
2.3.2.1.2	<i>Caspases</i> .....	36
2.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA APOPTOSE .....	38
<b>2.4.1</b>	<b>Morfologia</b> .....	39
<b>2.4.2</b>	<b>Sondas fluorescentes</b> .....	39
<b>2.4.3</b>	<b>Ensaio molecular – Túnel</b> .....	40
<b>2.4.4</b>	<b>Ensaio molecular – Caspases/ inibidores de Caspases</b> .....	41
2.5	TIPOS DE REPARO DO DNA .....	42
2.6	REPARO X APOPTOSE (SOBREVIVÊNCIA CELULAR) .....	43
2.7	PROTEÍNA DE REPARO DO DNA .....	44
<b>2.7.1</b>	<b>Proteína quinase ATM</b> .....	45
<b>2.7.2</b>	<b>Histona <math>\gamma</math>H2AX</b> .....	45
<b>2.7.3</b>	<b>P53</b> .....	46
2.7.3.1	53BP1 .....	47
2.7.4	<b>2.7.4 NSB1/ P95</b> .....	47

2.7.5	<b>RAD52</b> .....	48
2.7.6	<b>Fatores epigenéticos</b> .....	48
3	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	51
3.1	<b>MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV) DE OÓCITOS SUÍNOS</b> .....	51
3.2	<b>ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA (AP)</b> .....	52
4	<b>EXPERIMENTO PRÉVIO</b> .....	53
4.1	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	53
4.2	<b>OBJETIVO</b> .....	53
4.3	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	53
4.3.1	<b>Delineamento Experimental</b> .....	54
4.3.2	<b>Análise Estatística</b> .....	54
4.4	<b>RESULTADOS</b> .....	55
4.5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	56
5	<b>EXPERIMENTO 1: RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE CLIVAGEM E O POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO ATÉ BLASTOCISTO</b> .....	57
5.1	<b>HIPÓTESE</b> .....	57
5.2	<b>OBJETIVO</b> .....	57
5.3	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	57
5.3.1	<b>Delineamento Experimental</b> .....	58
5.3.2	<b>Análise Estatística</b> .....	58
5.4	<b>RESULTADO</b> .....	59
5.5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
6	<b>EXPERIMENTO 2: IMUNODETECÇÃO DE CASPASE-3 ATIVA DURANTE DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES SUÍNOS AP</b> .....	61
6.1	<b>HIPÓTESE</b> .....	61
6.2	<b>OBJETIVOS</b> .....	61
6.3	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	61
6.3.1	<b>Imunocitoquímica para Caspase-3 ativa</b> .....	62

6.3.2	<b>Quantificação relativa do sinal de fluorescência para Caspase-3 ativa .....</b>	63
6.3.3	<b>Delineamento Experimental.....</b>	63
6.3.4	<b>Análise Estatística .....</b>	64
6.4	RESULTADOS .....	64
6.5	CONCLUSÃO .....	66
7	<b>EXPERIMENTO 3: EFEITO DO INIBIDOR DE CASPASE-3 (z-DEVD-fmk) NA MATURAÇÃO E CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES SUÍNOS AP.....</b>	67
7.1	HIPÓTESE.....	67
7.2	OBJETIVO.....	67
7.3	MATERIAL E MÉTODO.....	67
7.3.1	<b>1º Etapa - Efeito da inibição da Caspase-3 ativa na MIV .....</b>	68
7.3.1.1	Delineamento Experimental.....	68
7.3.1.2	Análise Estatística .....	68
7.3.2	<b>2º Etapa: Efeito da inibição da Caspase-3 ativa no Início do CIV .....</b>	69
7.3.2.1	Delineamento Experimental.....	70
7.3.2.2	Análise Estatística .....	70
7.3.3	<b>3º Etapa - Efeito da inibição da Caspase-3 ativa no final do CIV .....</b>	70
7.3.3.1	Delineamento Experimental.....	72
7.3.3.2	Análise Estatística .....	72
7.4	RESULTADOS .....	73
7.4.1	<b>1ª Etapa - Efeito da inibição da Caspase-3 na MIV .....</b>	73
7.4.2	<b>2ª Etapa: Efeito da inibição da Caspase-3 ativa no início do CIV.....</b>	74
7.4.3	<b>3ª Etapa: Efeito da inibição da Caspase-3 ativa no final do CIV .....</b>	75
7.5	CONCLUSÃO FINAL DO EXPERIMENTO 3.....	76
8	<b>EXPERIMENTO 4: IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS DE LESÃO E REPARO DO DNA NO DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES SUÍNOS AP.....</b>	77
8.1	HIPÓTESE.....	77
8.2	OBJETIVO.....	77

8.3	MATERIAL E MÉTODO.....	77
8.3.1	<b>Imunocitoquímica para <math>\gamma</math>H2AX, 53BP1, NSB1 e RAD52.....</b>	78
8.3.2	<b>Delineamento Experimental.....</b>	79
8.3.3	<b>Análise Estatística .....</b>	80
8.4	RESULTADOS: IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS DE LESÃO E REPARO DO DNA NO DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES SUÍNOS AP .....	81
8.4.1	<b>Imunodeteção de <math>\gamma</math>H2AX durante o desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões suínos AP.....</b>	81
8.4.2	<b>Presença de fatores de reparo do DNA durante o desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões suínos AP .....</b>	82
8.4.2.1	Imunodeteção de 53BP1 durante o desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões suínos AP.....	82
8.4.2.2	Imunodeteção de NSB1 e RAD52 durante o desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões suínos AP .....	83
8.4.2.2.	<i>Imunodeteção de NSB1 durante o desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões suínos AP.....</i>	84
8.4.2.2.2	<i>Imunodeteção da RAD52 durante o desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões suínos AP.....</i>	85
8.5	<b>CONCLUSÃO .....</b>	86
9	<b>DISCUSSÃO.....</b>	88
10	CONCLUSÕES GERAIS (MODELO HIPOTÉTICO).....	97
	REFERÊNCIAS .....	99
	ANEXOS.....	107

## 1 INTRODUÇÃO

Biotécnicas reprodutivas como inseminação artificial, transferência de embriões, fecundação *in vitro* (FIV), ativação partenogenética (AP), transferência nuclear (TN) e transgenia animal têm sido utilizadas em diferentes espécies animais com o propósito de aumentar a produtividade animal (HARDY et al., 1989; DEVREKER; HARDY, 1997; MATWEE; BETTS; KING, 2000; PAMPFER, 2000; GJORRET et al., 2003; HAO et al., 2003). Entretanto, a PIV de embriões suínos ainda não atingiu padrões satisfatórios de produtividade quando comparado aos embriões produzidos *in vivo*, devido às taxas de bloqueio ou problemas na implantação embrionária.

Estudos mostram que o tempo da primeira clivagem está altamente associado à habilidade do embrião em alcançar o estágio de blastocisto (Dode et al., 2006). Esta relação pode ser atribuída a diversos fatores como qualidade do oócito, condições de CIV e diferenças entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, em que maiores índices de apoptose e atraso no desenvolvimento foram observadas em embriões produzidos *in vitro* quando comparado aos produzidos *in vivo* (Dode et al., 2006, Pomar et al., 2005). Deste modo, é possível que diferenças no potencial de desenvolvimento embrionário em embriões de clivagem rápida e lenta estejam relacionados ao mecanismo de apoptose.

A apoptose é um mecanismo ativo de regulação gênica feita por sinalizações intracelulares que levam em última análise a morte celular (WILLINGHAM et al., 1999). Há vários ensaios que podem ser usados na detecção da apoptose, como a detecção de corpos apoptóticos por HE, técnica de TUNEL e uso de sondas fluorescentes (HAO et al., 2004; ALBIERE et al., 2005; POMAR et al., 2005; COUTINHO et al., 2007).

Adicionalmente, pesquisas com apoptose estabeleceram um papel central para as Caspases, o que possibilitou o uso de ensaios de Caspase-3 com alta especificidade na detecção de apoptose (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002).

Caspases são proteases do tipo cisteína que desempenham um papel fundamental nas clivagens proteolíticas do processo apoptótico (CHANG; YANG, 2000; GRUTTER et al., 2000). Estas proteínas são sintetizadas na sua forma inativa (Pró-Caspases) e são ativadas (Caspases) após sinais de morte celular (SPANOS et al., 2002).

Há 14 tipos de Caspases em mamíferos classificadas em dois principais grupos: Caspases iniciadoras e Caspases efetoras. O último grupo, que compreende as Caspases 3, 6 e 7 é o mais importante, uma vez que após a ativação destas proteínas o mecanismo de ativação da apoptose torna-se irreversível. A Caspase-3 ativa participa também da clivagem de várias proteínas envolvidas no reparo do DNA (PARP), ciclo celular (cdc 27), citoesqueleto (Gelsolina, PAK2) e organização nuclear (ICAD/CAD) (CHANG; YANG, 2000; GRUTTER, 2000).

Estudos mostram relação entre os mecanismos de apoptose e reparo do DNA. O aumento na detecção de lesões do DNA está diretamente relacionado com a taxa de apoptose (PEREZ et al., 2007). Porém, a ativação dos mecanismos de reparo leva a inibição do processo apoptótico devido ao alto requerimento energético de ambos os processos (CHANG; YANG, 2000).

As sinalizações para as lesões e reparo do DNA é um mecanismo complexo que envolve a participação de várias enzimas e complexo protéicos. A  $\gamma$ H2AX tem função inicial na identificação das quebras nas fitas duplas de DNA (DSBs) recrutando outras proteínas envolvidas no mecanismo de reparo (MCMANUS; HENDZEL, 2005). A 53BP1 estabiliza a P53, que regula o ciclo celular através da ativação de apoptose ou reparo do DNA (LOWE; RULEY; JACKS, 1993; WARD et al., 2003). A NSB1 faz parte do complexo nuclease MRN,

atuando na fosforilação das proteínas do reparo do DNA e a RAD52 tem função fundamental nas recombinações homólogas (ZHAO et al., 2000; VERDUN; KARLSEDER, 2007).

A seleção de embriões ativados partenogeneticamente com alto potencial de desenvolvimento embrionário oferece um interessante modelo para o estudo da competência embrionária. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi investigar se embriões de desenvolvimento lento e rápido apresentam diferenças na localização e quantidade de Caspase-3 ativa, bem como investigar o papel desta proteína durante o desenvolvimento embrionário. Ainda, verificar a marcação de proteínas de reparo do DNA, relacionando-as aos mecanismos de apoptose para poder melhor compreender estes eventos fisiológicos no desenvolvimento pré-implantacional de embriões suínos ativados partenogeneticamente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS

Com o advento de biotecnologias como a transferência de embriões criopreservados, FIV e TN, a perda embrionária tornou-se mais evidente (KEEFE; LIU; TRIMARCHI, 1999). Após a transferência destes embriões há maior incidência de bloqueio e retardo do desenvolvimento embrionário, morte das células e conseqüentemente menor taxa de implantação (XU et al., 2003).

#### 2.1.1 Produção de embriões *in vitro* (PIV)

A PIV de embriões é uma biotécnica que pode ser usada na pesquisa e na produção de animais geneticamente superiores, com aplicabilidade em diversas espécies como bovinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos, camundongos, ratos e humanos (HARDY et al., 1989; DEVREKER; HARDY, 1997; MATWEE; BETTS; KING, 2000; PAMPFER, 2000; GJORRET et al., 2003; HAO et al., 2003; POMAR et al., 2005). Esta técnica permite o melhor entendimento dos fenômenos de crescimento, maturação e fecundação de oócitos, de capacitação espermática, bem como do desenvolvimento embrionário precoce e dos mecanismos de regulação envolvidos nestes processos (GONÇALVES et al., 2002).

Embriões suínos fecundado *in vitro* (FIV) apresentam menor taxa de nascimento (32%) após a transferência de embriões, quando comparado aos produzidos *in vivo* (60%) (PAPADOPOULOS et al., 2002). Estes resultados podem ser explicados pelo menor número de células da massa celular interna (MCI) e do trofotoderma (TE) (MACHÁTY; CAY; PRATER, 1998) e na maior incidência de apoptose quando comparados aos embriões *in vivo*

(POMAR et al., 2005). Miyoshi et al. (2002) relataram que a técnica de FIV é dificultada pelas altas taxas de polispermia e pela baixa competência no desenvolvimento de zigotos em sistemas artificiais de cultivo ou co-cultivo.

Além da FIV, a TN acelerou os avanços biotecnológicos para a produção de animais geneticamente superiores. Nesta técnica, células doadoras de núcleo são inseridas no interior de oócitos enucleados para a produção de embriões (BORDIGNON; SMITH, 2002). Apesar do nascimento de animais clonados (BAGUISI et al., 1999; POLEJAEVA et al., 2000; MELLO, 2003), muitas dúvidas quanto ao sucesso da técnica ainda necessitam ser esclarecidas. Atenção especial deve ser dada para o entendimento das altas taxas de mortalidade embrionária, fetal e peri-natal, bem como para as causas da alta incidência de anomalias e a baixa viabilidade dos animais clonados (BORDIGNON; SMITH, 2002).

Embriões ativados partenogeneticamente (AP) têm sido utilizados como um modelo de estudo na produção de embriões *in vitro* possibilitando melhor compreensão das mudanças celulares e dos mecanismos fisiológicos que ocorrem no estágio inicial de desenvolvimento embrionário. Com a utilização de meios químicos ou elétricos é possível a produção *in vitro* de embriões AP à partir de oócitos maduros. Deste modo, a escolha do método de ativação tem significativo impacto na qualidade e eficiência dos embriões produzidos (OZIL, 1990). Os ionóforos de cálcio, como a ionomicina, podem ser utilizados para a reativação do ciclo meiótico do oócito (saída do estágio de MII), pois promove a liberação dos estoques de cálcio intra e extracelular. A associação da ionomicina com o estrôncio (Sr) garante maior frequência dos picos de cálcio intracelular; simulando os mecanismos observados na fecundação *in vivo* (OTAEGUI; O'NEILL; WILMUT, 1999). Pode-se também utilizar a citocalasina B (CB), que inibe a polimerização dos microtúbulos e conseqüentemente impede a extrusão do 2º CP, formando embriões diplóides, que segundo Jeong et al. (2005) apresentam melhor desenvolvimento embrionário que embriões haplóides.

### 2.1.2 Tempo de clivagem

Com relação ao tempo de clivagem embrionária, já foi descrito que embriões PIV apresentam clivagem tardia, quando comparado aos embriões produzidos *in vivo* (RIZOS et al., 2002). Em um mesmo sistema de produção embrionária, embriões que clivam mais cedo apresentam maiores índices de blastocisto comparados aos embriões de clivagem tardiamente (BLODIN et al., 2002; LEQUARRE et al., 2005).

Meirelles (2004) observou que embriões bovinos que demoram mais tempo para atingir o estágio de 8 células apresentam maior susceptibilidade de bloquear, ou seja parar o desenvolvimento embrionário, evento que pode estar relacionado com a ativação da apoptose.

## 2.2 MORTE EMBRIONÁRIA

O sistema de PIV apresenta portanto, maior número de embriões na fase de bloqueio, com retardo do desenvolvimento, morte celular e menor taxa de implantação quando comparados aos embriões produzidos *in vivo* (XU et al., 2003). O estágio de 2 células em embriões de camundongos, de 4 células em suínos (MACHÁTY; CAY; PRATER, 1998) e humanos (MEMILI; FIRST, 2000), e de 8 células em bovinos (MEMILI; FIRST, 2000) é marcado pela ativação do genoma embrionário. A parada no desenvolvimento coincidentemente com a ativação do genoma embrionário é denominada de fase de bloqueio.

A passagem por esta fase em condições ótimas (*in vivo*), provavelmente não resulta em ativação da apoptose, ou ocorre em baixa proporção. Entretanto, embriões PIV podem apresentar apoptose antecipada devido ao aumento de estresse, decorrentes do uso de sistemas artificiais de cultivo, que devido a um déficit de nutrientes ou excesso de oxigênio podem levar a alterações de expressão gênica, denaturação de proteínas, lesões de DNA ou

aberrações cromossômicas (HAANEN; VERMES, 1996; HEERDE et al., 2000; BETTS; KING, 2001). Quanto a antecipação da apoptose em sistemas artificiais de CIV, Gjorret et al. (2003) detectaram apoptose em estágio de 6 e 21 células para embriões bovinos oriundos de FIV e *in vivo*, respectivamente.

A morte celular não está restrita somente à apoptose, podendo também existir diferentes tipos de mortes, como por exemplo a oncose da célula em função do grau de injúria (BETTS; KING, 2001). Deste modo é de grande importância a diferenciação entre estes mecanismos.

### 2.3 TIPOS DE MORTE CELULAR

A caracterização do tipo de morte celular não é simples, visto que as células nem sempre apresentam características clássicas de apoptose ou oncose. Assim como a caracterização do tipo de morte, a denominação destes mecanismos também é um fator polêmico. Manjo e Joris (1995) salientam que morte celular e necrose são dois eventos distintos. De acordo com estes autores, morte celular é o ponto de não retorno e passando deste ponto ocorrem mudanças pós morte (necrose). Estes autores propuseram o termo “morte acidental” para definir necrose celular, e oncose para retratar os estágios iniciais que antecedem à “morte acidental”. Seguindo este raciocínio, a morte celular inicial pode ocorrer por dois diferentes mecanismos, apoptose ou oncose, e após a morte da célula ocorre a necrose. Porém, é importante lembrar que a maioria dos casos de apoptose há fagocitose pelas células vizinhas dos corpos apoptóticos, não havendo necrose. Outro fator importante e que a necrose por apoptose é morfologicamente diferente da necrose por oncose (DARZYNKIEWICZ et al., 1997).

A oncose, morte patológica ou acidental é um processo passivo, catabólico e degenerativo. A célula é impedida de manter os processos vitais devido às lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, como temperaturas extremas, radiações, traumas, produtos tóxicos e falta de O<sub>2</sub>. As lesões podem ainda ter origem biológica, como nas infecções por bactérias ou vírus (HORTA; YONG, 1999).

O primeiro sinal de oncose é a turbidez da mitocôndria, seguido pela turgidez da célula com rompimento da membrana plasmática e liberação dos constituintes do citoplasma (enzimas proteolíticas), levando a uma resposta inflamatória local (HUPPERTS; FRANK; KAUFMANN, 1999; FLORES-PERÉZ, 2002). Áreas de condensação da cromatina com dissolução lenta do núcleo (cariólise) e degradação aleatória do DNA, embora não tão intensa quando comparada à apoptose, também estão presente na oncose com produtos de degradação, heterogêneos em tamanho (DARZYNKIEWICZ et al., 1997). O potencial transmembrânico mitocondrial é elevado (embora transitório) durante a oncose, antes do rompimento da membrana plasmática. Entretanto, em contraste com a apoptose, o qual tem sido estudada intensivamente, pouco é conhecido sobre a oncose (DARZYNKIEWICZ et al., 1997).

A literatura ainda descreve a morte celular mitótica ou catástrofe mitótica, que ocorre no ciclo celular subsequente a exposição ao agente tóxico, amplificando a injúria e tornando-a letal. A divisão celular ocorre sem completar a fase S, formando células imaturas, com condensação do DNA, quebra do envelope nuclear e eventual morte celular durante a transição dos mecanismos de “check-point”. Há alterações na morfologia e no metabolismo celular que dificultam a caracterização do tipo de morte. Estas células podem apresentar características morfológicas e bioquímicas atípicas para apoptose; entretanto, fusos mitóticos podem estar presentes durante este mecanismo, distinguindo a morte celular mitótica da apoptose (DARZYNKIEWICZ et al., 1997; CHANG; YANG, 2000).

Injúrias não letais podem ativar outros mecanismo de defesa celular, como por exemplo a autofagia, que pode ser confundida com apoptose por apresentar os mesmos sinais morfológicos e em alguns casos pode até ocorrer simultaneamente. Porém, a autofagia é melhor compreendida como um mecanismo de recuperação a estímulos nocivos, do que propriamente um estágio do mecanismo de morte celular. A autofagia inicia com a formação do autofagossomo, seguido por um período de maturação (acidificação dos vacúolos) e finaliza com a fusão dos lisossomos ou elementos do complexo de Golgi, responsáveis pela inserção de hidrolases ao autofagossomo (GUIMARÃES; LINDEN, 2004).

### **2.3.1 Apoptose**

O termo apoptose foi empregado em 1972 com o propósito de descrever a morte que se observa durante o desenvolvimento embrionário (KERR; WYLLIE; CURRIE KERR, 1972). A apoptose ocorre não só durante o desenvolvimento embrionário ou fetal, mas também em organismos maduros ao longo da vida (HORTA; YONG, 1999).

A apoptose pode ser considerada como o suicídio da célula. É um mecanismo ativo de regulação genética, feita por sinalizações intracelulares (WILLINGHAM, 1999). O termo “morte celular programada” é frequentemente usado como sinônimo de apoptose, porém nem toda apoptose ocorre de modo programado (DARZYNKIEWICZ et al., 1997), sendo que outros mecanismos de degeneração celular, como a necrose e a autofagia, também podem ocorrer de modo programado (GUIMARÃES; LINDEN, 2004).

Morfologicamente ocorre alteração da permeabilidade de membrana, mas sem alteração de integridade, redução do volume celular, alteração da permeabilidade mitocondrial, fragmentação do DNA em regiões específicas (nucleossomos), condensação da cromatina, modificações no citoesqueleto com formação de bolhas (“blebbings”) e

fragmentação de núcleos e organelas envoltos por membrana que formam os corpos apoptóticos (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1994; AMEISEN, 2002).

A ativação das nucleases é uma característica da apoptose, responsável pela clivagem do DNA entre os nucleossomos gerando fragmentos de 200 pares de bases ou múltiplos deles, o que permite que o DNA de uma célula apoptótica tenha forma de “escada” quando analisado em gel de eletroforese (HORTA; YONG, 1999).

Uma das mais importantes características da apoptose é a condensação da cromatina (picnose). A condensação inicia-se na região periférica do núcleo, se assemelhando à meia lua ou ferradura de cavalo. O DNA picnótico exibe uma hipercromasia corando-se intensamente com sondas fluorescentes. O envelope nuclear desintegra, lamininas sofrem degradação proteolítica, seguida pela fragmentação do núcleo (cariorex) (DARZYNKIEWICZ et al., 1997).

Além da preservação da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática na fase inicial da apoptose há também preservação das organelas celulares (mitocôndrias e lisossomos), embora o potencial transmembrânico da mitocôndria esteja diminuído. Ocorre também mobilização do íon cálcio intracelular, diminuição de microtúbulos e desorganização de fosfolípidos na membrana plasmática, permitindo a translocação da fosfatidilserina (PS) da superfície interna da membrana para a superfície externa (DARZYNKIEWICZ et al., 1997).

A detecção da apoptose em células embrionárias tem sido utilizada como um critério adicional na avaliação morfológica, com objetivo de assegurar a qualidade e viabilidade embrionária (POMAR et al., 2005; COUTINHO et al., 2007). Deste modo, a apoptose, na fase de pré-implantação embrionária, pode representar um risco para o desenvolvimento; visto que o aumento da atividade deste mecanismo está relacionado a uma diminuição do desenvolvimento embrionário (GJORRET et al., 2003).

Com a finalidade de se obter melhor avaliação molecular das diferentes biotécnicas na PIV, Hao et al. (2003) e Pomar et al. (2005) verificaram aumento de núcleos positivos para o teste de Tunel (teste que detecta apoptose) em embriões bovinos e suínos produzidos *in vitro*. Estes autores detectaram, em blastocistos bovinos, fixados no D6 de cultivo, uma média de 5,3 e 0,4 núcleos positivos para apoptose em embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* respectivamente, e em blastocistos de suínos uma média de 6,7 e 16,6 em embriões FIV e clonados, respectivamente. A apoptose foi detectada só a partir do D5 de cultivo, com aumento progressivo de resposta positiva ao teste Tunel das células dos blastocistos do dia 6 ao dia 8, tanto nos embriões produzidos *in vivo* quanto nos *in vitro*. Entretanto, não se pode descartar a hipótese da ativação de apoptose em estágios precedentes, visto que o teste de Tunel identifica apenas a fase tardia deste evento (HAO et al., 2003).

Da mesma forma, Jeong et al. (2005) mostraram que embriões diplóides (2N), produzidos por AP, apresentavam melhor potencial de desenvolvimento embrionário, blastocistos com maior número de células e baixa taxa de fragmentação do DNA (Tunel) quando comparados aos embriões haplóides (N) AP. Quanto à expressão de genes relacionados às vias de apoptose, embriões diplóides apresentaram um padrão similar aos embriões produzidos *in vivo* com aumento na expressão do Bcl-x1 e diminuição do Bak, quando comparados aos embriões haplóides.

Embriões PIV de bovinos (MATWEE; BETTS; KING, 2000; POMAR et al., 2005), de camundongos (DEVREKER; HARDY, 1997) e de ratos (PAMPFER, 2000) apresentaram maior incidência de apoptose na MCI do que no TE, quando comparados aos embriões produzidos *in vivo*. As células da MCI são responsáveis pela formação do embrião, assim, o aumento de injúrias neste compartimento pode resultar em embriões aparentemente normais (analisados por esteriomicroscópio), porém com alterações subcelulares que podem impedir a competência do desenvolvimento embrionário (GJORRET et al., 2003).

Paula-Lopes e Hansen (2002) demonstraram que em situações de estresse térmico a atividade apoptótica auxilia no desenvolvimento embrionário, contribuindo na resposta adaptativa da célula, demonstrando um possível papel benéfico desta via em situações adversas do desenvolvimento.

### **2.3.2 Vias de ativação da apoptose**

Para melhor compreensão pode-se dividir a ativação da apoptose em duas vias: a extracelular (extrínseca) e a intracelular (intrínseca).

A via extrínseca é iniciada por sinais externos à célula como radicais livres, agentes químicos ou físicos que vão estimular os receptores da superfície celular (Fas ligante, TNF). As Caspases apicais (8 e 10) são ativadas por um mecanismo universal conhecido como oligomerização, realizado pela auto ativação das Pró-Caspases pela ligação com receptores da superfície celular (CHANG; YANG, 2000; GRUTTER, 2000). Estas Caspases iniciais irão atuar na ativação da Caspase-3 que levará a execução da apoptose (Figura 1).

A via intrínseca pode ser decorrente do estresse celular com ou sem lesões do DNA, que levará a alterações morfofuncionais da mitocôndria com liberação do citocromo C que acoplado à molécula adaptadora (Apaf) irá ativar a Pró-Caspase 9, formando o complexo apoptossômico, responsável pela ativação da Caspase 9 que ativará a Pró-Caspase-3 (CHANG; YANG, 2000; GRUTTER, 2000) (Figura 1). O fator de indução da apoptose (AIF) e a proteína Diablo são outros fatores mitocôndrias que também vão levar a ativação da apoptose (SCHULTZ et al., 2000).

Após a ativação da Caspase-3 há interação com substratos que podem agir na morfologia e no metabolismo celular: nos mecanismos de reparo do DNA, na regulação do ciclo celular, na organização do citoesqueleto e do núcleo; podendo ainda atuar como

moléculas sinalizadoras e amplificadoras de estímulos fisiológicos ou patológicos (CHANG; YANG, 2000).

### 2.3.2.1 Mecanismos de ativação

Para melhor compreensão da apoptose é importante entender o mecanismo de ativação deste processo bem como a cascata de proteínas específicas a ele relacionado. A regulação e execução da apoptose é atribuída principalmente a duas grandes famílias: a Bcl-2 e as Caspases (HAANEN; VERMES, 1996; SPANOS et al., 2002).

#### 2.3.2.1.1 *Bcl-2*

Esta família está subdivididas em dois grupos: Proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Box, Bik, Blk, Bim, HrK, BNIP3), localizadas principalmente na membrana externa da mitocôndria e proteína anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, A1, Mcl-1), localizadas no envelope nuclear e no retículo endoplasmático (SPANOS et al., 2002; JEONG et al., 2005). O balanço de proteínas pró e anti-apoptóticas é o que determina se a célula entrará ou não em apoptose (BETTS; KING, 2001; SPANOS et al., 2002).

Estas proteínas estão ligadas às mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial, porém também podem estar envolvidas na ativação das Caspases. A proteína Bcl-2 inibe a apoptose diretamente (bloqueando as Caspases) e indiretamente (impedindo a liberação do citocromo C) (HAANEN; VERMES, 1996; SPANOS et al., 2002). O citocromo C é uma importante proteína que participa da ativação da apoptose via alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (PEREZ et al., 2007).

O mecanismo de liberação do citocromo C pela mitocôndria ainda não está esclarecido, entretanto, sabe-se que é desencadeado por fatores de estresse como os agentes citotóxicos, por privação de fatores de crescimento, por injúrias do DNA e por alterações nas concentrações de proteínas pró e anti-apoptóticas. O AIF (fator de indução apoptótico) também é liberado pela mitocôndria, translocando-se para o núcleo induzindo a condensação e a fragmentação nuclear (CHANG; YANG, 2000).

#### *2.3.2.1.2 Caspases*

As Caspases são proteases que utilizam a cisteína como grupo nucleofílico na clivagem de substratos, desencadeando a apoptose (CHANG; YANG, 2000; GRUTTER, 2000). Estas proteases são sintetizadas como precursores inativos (Pró-Caspases) e são ativadas (Caspases) somente quando a célula recebe sinal de morte (HAANEN; VERMES, 1996; SPANOS et al., 2002).

Até o momento foram caracterizadas 14 tipos de Caspases que podem ser agrupadas de acordo com a especificidade ou a atividade biológica (GRUTTER, 2000). Em relação à especificidade, em humanos as Caspases foram classificadas em 3 distintos grupos: Grupo I (Caspases 1, 4, 5 e 13) com preferência pela sequência de aminoácidos WEHD; grupo II (Caspases 2, 3 e 7) com alta seletividade pelo aspartato na posição P4 e preferência pela região DEXD, na qual o X pode ser substituído pelo V, T ou H e o grupo III (Caspases 6, 8, 9 e 10) com preferência na região I, V, L e EXD (CHANG; YANG, 2000). Quanto à atividade, as Caspases podem ser agrupadas em inflamatórias ou ativadoras de citocinas (Caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14), em iniciadoras (Caspases 2, 8, 9 e 10) e efetoras ou executoras (Caspases 3, 7 e 6) (CHANG; YANG, 2000).

Dentre as Caspases efetoras, a Caspase-3 foi identificada como sendo uma protease que inativa a poli ADP ribose polimerase (PARP). A PARP atua no núcleo catalizando a ribosilação do ADP de histonas e de outras proteínas envolvidas no reparo do DNA. Uma das hipóteses é que a clivagem e a inativação desta proteína levam a uma injúria letal do DNA, contribuindo para o mecanismo de apoptose. Entretanto, foi demonstrado que células enucleadas, bem como células deficientes em PARP e outras proteínas de reparo, são capazes de sofrer morte celular programada apresentando sinais morfológicos clássicos de apoptose (CHANG; YANG, 2000).

A fragmentação do DNA também é realizada por intermédio do complexo Fator de Fragmentação do DNA ou complexo DNase regulado pela Caspase (DFF/ DFF40 ou CPAN). O DFF está presente na célula na forma inativa, formado pela subunidade inibitória (ICAD) e ativa (CAD). A Pró-Caspase-3, ativada pelo apoptossomo (Apaf-1 + Citocromo C + Caspase 9) é responsável pela degradação do ICAD liberando a porção ativa do DFF, o qual, no núcleo, realiza a degradação e a condensação do DNA (CHANG; YANG, 2000; ZHANG et al., 2004) (Figura 1).

Proteínas do citoesqueleto como a Gelsolina e a PAK2 também são clivadas pela Caspase-3, produzindo alterações celulares típicas da apoptose, como a formação de “blebbing” e corpos apoptóticos (CHANG; YANG, 2000).

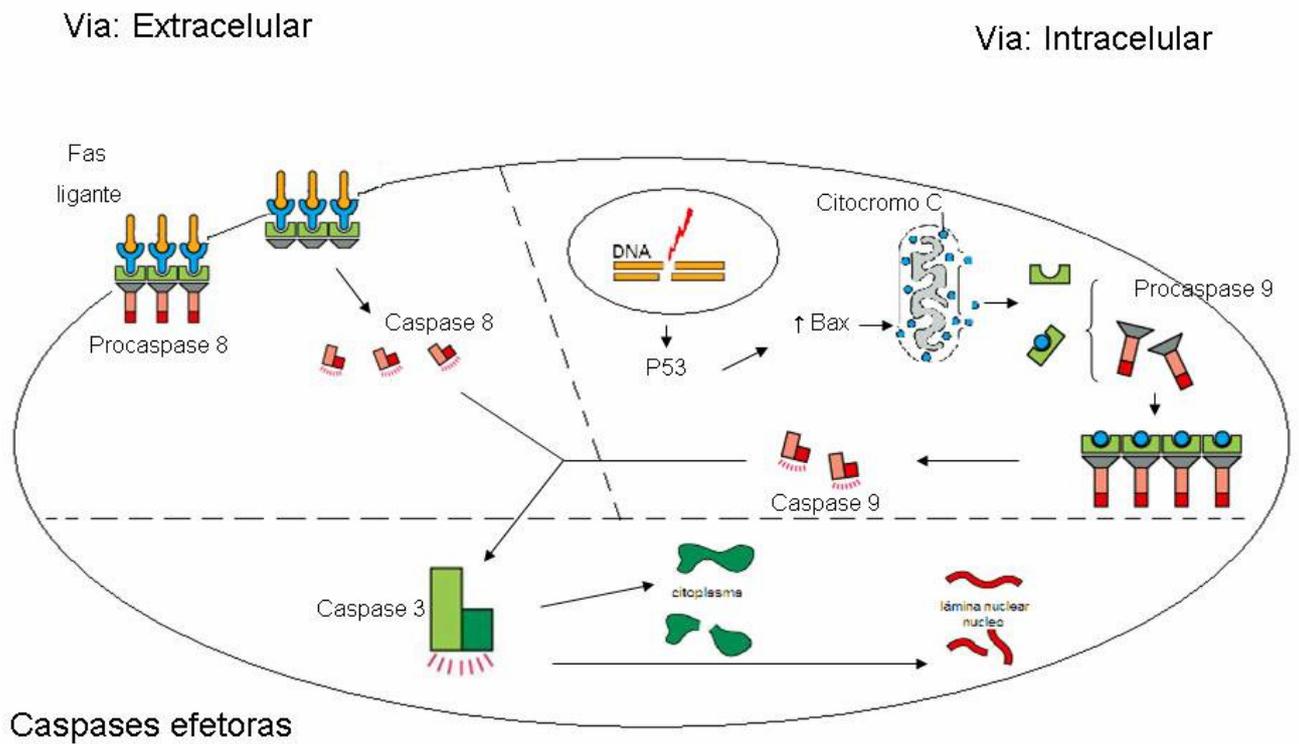


Figura 1 - Vias de ativação da apoptose

## 2.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA APOPTOSE

É importante descrever que a apoptose obedece uma seqüência de ativação cronológica e hierárquica. Há diferentes marcadores de apoptose, relacionados a diferentes estágios deste mecanismo; portanto para melhor caracterização deste evento, é importante compreender os ensaios e as técnicas utilizadas para sua detecção ((DARZYNKIEWICZ; BEDNER; TRAGANOS, 2001).

### 2.4.1 Morfologia

A avaliação morfológica é uma análise crucial para diferenciar os distintos mecanismo de morte celular. A microscopia óptica foi a primeira técnica usada na detecção morfológica de apoptose, evidenciando bolhas na membrana (“blebbings”), picnose e fragmentação nuclear em cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina (HE) (HEERDE et al., 2000).

Wood, Sarma e Archer (1999) observaram que a coloração com HE fluoresce o citoplasma de células apoptóticas (ação da eosina). Deste modo, Coutinho et al. (2007) trabalhando com embriões de camundongos criopreservados, confirmaram que preparações coradas com HE podem ser rotineiramente analisadas por microscopia de epifluorescência, auxiliando na identificação de corpos apoptóticos. A avaliação morfológica pela microscopia óptica é uma técnica de baixo custo, rápida, de fácil aplicação e alta especificidade, porém apresenta baixa sensibilidade, visto que as células apoptóticas podem ser removidas pelos fagócitos de 30-60 minutos após início do processo (WOOD; SARMA; ARCHER, 1999; HEERDE et al., 2000).

Ainda com relação à avaliação morfológica pode-se fazer o uso da microscopia eletrônica de transmissão, método de grande sensibilidade, porém permite apenas uma análise qualitativa devido à dificuldade de se aplicar em grande número de células e ao alto custo. Para melhor exatidão da detecção de apoptose pela morfologia é importante associar a microscopia óptica com a análise ultraestrutural (HEERDE et al., 2000).

### 2.4.2 Sondas fluorescentes

Na literatura, diversas sondas fluorescentes têm sido utilizadas na detecção da morte celular. Entre elas o Hoechst 33342 (H), o Iodeto de Propídeo (IP), o Brometo de Etídio (EthD-1) e o Yo-Pro-1 são as mais citadas (ORMEROD et al., 1993; KAIDI et al., 1999; ALBIERI et al., 2005; POMAR et al., 2005; COUTINHO et al., 2007).

O Hoechst 33342 é um corante permeável a qualquer tipo de célula, que se liga à fita de DNA em regiões ricas em dinucleotídeos A-T (KAIDI et al., 1999). Os núcleos de células vivas ou danificadas são corados em azul. Ormerod et al. (1993) descreveram que células apoptóticas fluorescem de maneira mais intensa e brilhante, enquanto que células viáveis apresentam uma fluorescência menos intensa.

O Iodeto de Propídeo (IP) se liga entre as fita de DNA, e assim como o EthD-1 só penetra em células com alteração tardia de permeabilidade de membrana. O núcleo é corado em tons de vermelho e as células marcadas podem representar oncose ou apoptose tardia (KAIDI et al., 1999; POMAR et al., 2005).

O Yo-Pro1 pertence a família das cianinas monoméricas e é uma sonda que emite fluorescência verde, com comprimento de onda de 491 (excitação) e 509 (emissão). Devido a pequenas mudanças da membrana plasmática que ocorre na fase inicial da apoptose, esta sonda é capaz de penetrar em células em estágio inicial de apoptose, marcando o DNA (ALBIERI et al., 2005; PENA et al., 2005).

Todas estas sondas podem ser utilizadas sozinhas ou em associação dupla (H e IP ou H e EthD-1), ou tripla (H, IP e Yo-Pro1); sendo que neste último exemplo é possível diferenciar célula normal, apoptótica ou oncótica (ALBIERI et al., 2005; PENA et al., 2005; COUTINHO et al., 2007).

### 2.4.3 Ensaio molecular – Tunel

O teste Tunel (Terminal Uracil End Labeling) é utilizado na detecção *in situ* de células apoptóticas, pela marcação do DNA fragmentado em regiões específicas (entre nucleossomos), gerado pela atividade endógena da DNase. Este método é composto pela enzima transferase deoxinucleotidil terminal (TdT) que catalisa e transfere o nucleotídeo dUTP (conjugado de fluoresceína) para a região livre do grupo 3'hidroxil, presente em fitas fragmentadas de DNA (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002).

Embora o teste de TUNEL detecte significantes resultados selecionando métodos mais viáveis para a produção *in vitro* de embriões em diversas espécies animais (JURISICOVA; VARMUZA; CASPER, 1996), a especificidade desta técnica tem sido questionada (LABAT-MOLEUR et al., 1998; CUELLO-CARRIÓN; CIOCCA, 1999; WOOD; SARMA; ARCHER, 1999). Kanoh et al. (1999) mostraram que células apoptóticas, oncóticas e viáveis (acompanhadas de replicação do DNA ou reparo) podem ser detectadas pela técnica de TUNEL.

### 2.4.4 Ensaio molecular – Caspases/ inibidores de Caspases

Voronina e Wessel (2001) descreveram que a ativação das Caspases é o evento mais precoce da apoptose, iniciando 30 minutos após a indução, identificado por marcadores fluorescentes (FVf). Assim, técnicas como a Imunocitoquímica podem ser utilizadas na identificação de anticorpos específicos que reconhecem as formas inativas e ativas das Caspases, auxiliando na detecção da apoptose (HUPPERTZ; FRANK; KAUTMANN, 1999; SPANOS et al., 2002; MEN et al., 2003).

Um método indireto de avaliar apoptose é pelo uso de inibidores de proteínas que participam do evento, sendo empregado com frequência na avaliação desse mecanismo em diversos sistemas de cultivo celular. Os inibidores de Caspases têm sido os mais utilizados, visto a importância destas proteínas na cascata da apoptose. O z-DEVD-fmk, um inibidor da Caspase de execução (grupo II), age sobre a fração ativa das Caspases 3 e 7 evidenciando o papel destas proteínas em eventos biológicos distintos (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; ROTH; HANSEN, 2004; ZHANG et al., 2004).

## 2.5 TIPOS DE REPARO DO DNA

Os genes de reparo do DNA estão divididos em dois tipos: a) sinalização e regulação do reparo do DNA; b) mecanismos específicos de reparos.

Os principais tipos de reparo do DNA em mamíferos são: a) Reparo por excisão de nucleotídeo (NER); b) Reparo por excisão de bases (BER); c) Reparo na trocas de bases (MMR) e d) Reparo nas quebras de fitas duplas de DNA (DSBs) (JAROUDI; SENGUPTA, 2007).

A quebra da fita dupla do DNA (DSBs) é uma das principais lesões que podem levar à apoptose ou a ativação do mecanismo de reparo do DNA (HUANG et al., 2005). As DSBs ocorrem nos cromossomos quando há erro na replicação do DNA e ou na exposição do DNA a agentes externos (por exemplo as radiações ionizantes). O mecanismo de reparo das DSBs pode ocorrer por recombinação homóloga ou não homóloga (NHEJ), sendo a primeira a mais importante na manutenção da integridade dos cromossomos (KITAO; YUAN, 2002; DOWNS et al., 2007).

A manutenção da integridade do genoma ocorre pela detecção de injúrias no DNA, recrutamento das proteínas de reparo do DNA, parada no ciclo celular com ativação de

proteínas do “check-point” e apoptose. A parada do ciclo celular nos “check-points” G1/S ou G2/M são importantes para o reparo do DNA antes da síntese protéica ou início da divisão celular (JAROUDI; SENGUPTA, 2007).

Normalmente as DSBs são rapidamente reparadas, porém quando ocorre persistência da lesão, o DNA aciona o mecanismo de “check-point” com prolongamento da parada no ciclo celular. Quando a lesão é corrigida extinguem-se os sinais de parada e a célula retorna ao ciclo celular; caso não ocorra o reparo, a célula aciona a apoptose ou o estágio de senescência, evitando assim a propagação da lesão (HUANG et al., 2005; DOWNS et al., 2007).

## 2.6 REPARO X APOPTOSE (SOBREVIVÊNCIA CELULAR)

Há uma associação entre a deficiência de proteínas do reparo do DNA em mamíferos e a incidência de malformações, câncer, envelhecimento precoce e redução da expectativa de vida (JAROUDI; SENGUPTA, 2007).

O tratamento com RAD51 recombinante (proteínas reparadoras do DNA) em células com injúrias do DNA levou há uma diminuição das DSBs e da apoptose, mostrando que as DSBs estão diretamente relacionadas com a frequência da apoptose. Entretanto, a suscetibilidade celular para as DSBs e conseqüentemente para a apoptose depende de uma série de fatores. Recente estudo mostrou que a variabilidade genética manifestada pelo alto ou baixo índice reprodutivo pode ser traduzida nas incidências das DBSs e da apoptose (PEREZ et al., 2007).

Oócitos de camundongas AKR/J, com baixo índice de prolificidade, apresentaram alta taxa de apoptose e fragmentação do DNA. Já fêmeas da linhagem BC63F1, com crias maiores em tamanho e números, apresentaram baixos índices de apoptose e fragmentação do DNA. Porém, foi observado um terceiro grupo de oócitos provenientes de fêmeas FVB que

apresentaram alta taxa de apoptose com baixas taxas de fragmentação do DNA e que quando submetidos a tratamentos com RAD51 recombinantes não apresentaram alterações nas taxas de apoptose (PEREZ et al., 2007).

Apesar das DSBs estarem relacionadas com as taxas de apoptose, os resultados em camundongos FVB mostrou que o aumento da suscetibilidade a apoptose não está necessariamente relacionado às injúrias do DNA. Neste grupo foi observada redução da atividade mitocondrial com anomalias ultraestruturais da organela que promoveram a liberação do citocromo C e da proteína Diablo com ativação do mecanismo de apoptose, porém sem intermédio de lesões do DNA.

Há uma relação entre a ativação da apoptose e a inibição dos mecanismos de reparo do DNA (KITAO; YUAN, 2002; HUANG et al., 2005;). Deste modo é relevante investigar com maior exatidão a influência dos mecanismos de detecção de lesões e reparo do DNA em embriões suínos cultivados *in vitro* (CIV).

## 2.7 PROTEÍNA DE REPARO DO DNA

A estabilidade genômica deve ser mantida em todas as células (somáticas e germinativas), sendo que é a integridade do genoma nos gametas o que garante a transmissão da informação genética entre as gerações. Apesar da existência de um complexo mecanismo de defesa celular contra a instabilidade dos genes, algumas mutações ocorrem durante a gametogênese o que por um lado positivo permitiu a evolução das espécies, porém também o aparecimento de patologias graves como o câncer (KITAO; YUAN, 2002; JAROUDI; SENGUPTA, 2007).

Assim como o mecanismo de apoptose, alguns genes de reparo do DNA também se mantêm conservados em diversas formas de vida (DOWNS et al., 2007). Apesar de muitos

genes de reparo do DNA serem expressos em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, a capacidade embrionária para a detecção e reparo de lesões no DNA é limitada (JAROUDI; SENGUPTA, 2007). Isto pode ser justificado por um ciclo celular de menor duração e pela ausência de algumas proteínas chave quando comparado a células adultas (JAROUDI; SENGUPTA, 2007).

A sobrevivência embrionária depende de um adequado estoque de proteínas materna nos oócitos e da ativação do genoma embrionário. Deste modo, se o oócito não estiver adequadamente equipado ou se não ocorrer a ativação do genoma no momento ideal, o embrião não sobrevive (JAROUDI; SENGUPTA, 2007).

Ensaio imunocitoquímico na identificação *in situ* de lesões de DNA são testes de alta precisão e sensibilidade que permitem a melhor compreensão do ciclo celular com a ativação das proteínas de reparo do DNA e da indução da apoptose (HUANG et al., 2005).

### **2.7.1 Proteína quinase ATM**

A proteína quinase ATM (ataxia-telangiectasia mutated) age na fosforilação do complexo nucleolares MRN (Mre11/ RAD50/ NSB1), ativando enzimas envolvidas no evento de identificação de lesões e reparo do DNA. A ATM é um dos primeiros sinalizadores da resposta celular as DSBs. Como substratos da ATM pode-se citar a  $\gamma$ H2AX, o fator de transcrição P53, e a NSB1 (SCHULTZ et al., 2000; BHOUMIK et al., 2005) (Figura 2).

### **2.7.2 Histona $\gamma$ H2AX**

A histona H2AX é uma variante do core de histonas H2A. A fosforilação desta histona na posição serina 139 é denominado  $\gamma$ H2AX. (HUANG et al., 2005). A marcação

nuclear da  $\gamma$ H2AX pode representar a frequência das DSBs e/ou mitoses. Pode-se diferenciar a injúria do evento de replicação do DNA pelas diferentes marcações nucleares e ou estágio do ciclo celular (HUANG et al., 2005; MACMANUS; HENDEZL, 2005).

As presenças de pequenos pontos nucleares de localização difusa estão relacionadas a processos mitóticos com maior predominância nas fases G2/M. Pontos maiores, corados mais intensamente e isolados são evidentes principalmente nas fases G1/S, marcando as DSB, que vão recrutar outras proteínas envolvidas no reparo do DNA (MACMANUS; HENDEZL, 2005).

Na mitose, a  $\gamma$ H2AX é fosforilada por intermédio da ATM e as DSB marcadas com  $\gamma$ H2AX colocalizam-se com as NSB1 e RAD51 (BHOUMIK et al., 2005; MACMANUS; HENDEZL, 2005). Na apoptose também se observa a marcação com  $\gamma$ H2AX; no entanto em estágio tardio da apoptose a expressão desta proteína declina (HUANG et al., 2005) (Figura 2).

### **2.7.3 P53**

Além de agir como um fator de transcrição gênica, a P53 tem papel fundamental como gene supressor de tumor eliminando células com crescimento anormal. A ausência da proteína P53 leva a instabilidade do genoma devido à dificuldade de identificar lesões e reparar o DNA, o encurtamento excessivo dos telômeros, assim como comprometimento da ativação da apoptose (VERDUM; KARLSEDER, 2007). Deste modo foi mostrado que colônias de células mutantes para P53<sup>-/-</sup> são resistentes a radiações ionizantes com comprometimento dos mecanismos de reparo do DNA e de apoptose, levando a uma propagação do erro para as células filhas (LOWE; RULEY; JACKS, 1993) (Figura 2). Porém,

é importante lembrar que nem todas as vias de ativação da apoptose requer a participação da P53 (LOWE; RULEY; JACKS, 1993; PEREZ et al., 2007).

#### 2.7.3.1 53BP1

A 53BP1 foi inicialmente identificada como uma proteína de ligação responsável pela ativação da P53. Assim como outras proteínas envolvidas na resposta de lesões do DNA, a 53BP1 é também hiperfosforilada após radiações ionizantes (WARD et al., 2003).

Em situações fisiológicas, a 53BP1 apresenta-se distribuída de forma difusa no núcleo. Já em resposta ao estresse externo, esta proteína assume um padrão de localização em pontos nucleares isolados, concomitantemente com a  $\gamma$ H2AX e NSB1. Os pontos isolados correspondem ao número de DSBs e a dispersão destes obedecem a cinética de reparo do DNA (SCHULTZ et al., 2000).

A 53BP1 não depende da atividade da ATM, da NSB1 e da P53, porém Ward et al. (2003) relataram que a  $\gamma$ H2AX é essencial para que ocorra a migração da 53BP1 para sítios de quebra do DNA. Este fato sugere que a 53BP1 age precocemente na resposta celular às DSBs, contudo após o recrutamento da  $\gamma$ H2AX (SCHULTZ et al., 2000; WARD et al., 2003) (Figura 2).

#### 2.7.4 NSB1/ P95

A NSB1 é um componente do complexo nuclease MRN com importância no reparo das DSBs. Há dois sítios de fosforilação da NSB1, a serina 278 e a 343. Ambas fosforilações ocorrem na fase S do ciclo celular, pela ação da ATM. A inativação destes sítios de

fosforilação inativa a função da NSB1 na ativação dos mecanismo de “check-point” e reparo do DNA, alterando também a formação do complexo MRN (ZHAO et al., 2000) (Figura 2).

### **2.7.5 RAD52**

A RAD52 é uma proteína que está dispersa no núcleo na forma de pontos isolados após radiações ionizantes. Por recombinação homóloga, as proteínas do grupo RAD (RAD51/52 e 54) se agrupam nos sítios de quebra do DNA, na fase S do ciclo celular, com a finalidade de recrutar os cromossomos homólogos das cromátides irmãs, reparando as DSBs (KITAO; YUAN, 2002; VERDUN; KRLSEDER., 2007) (Figura 2).

Sabe-se que mutações dos genes do grupo RAD frequentemente estão associado à hipersensibilidade a agentes externos e aumento dos defeitos mitóticos e meióticos. Como o DNA lesado regula este processo ainda não está esclarecido. Entretanto, Kitao e Yuan (2002) demonstraram a participação da proteína C-Abl na fosforilação do resíduo de tirosina 104 da RAD52, ativando este mecanismo.

### **2.7.6 Fatores epigenéticos**

Altos graus de condensação da cromatina inviabilizam o reparo do DNA. Em segundos as DSBs induzem uma descondesação da cromatina nos sítios de quebra, aumentando o acesso das proteínas de detecção de lesão do DNA. A mobilização dos cromossomos para uma região nova é realizada por um complexo enzimático dependente de ATP (RSC). A falta de algumas proteínas do complexo RSC leva a um atraso da fosforilação da  $\gamma$ H2AX, mostrando a participação deste complexo e de energia no início da detecção e reparo do DNA (DOWNS et al., 2007).

As proteínas envolvidas na remodelagem da cromatina formam agregações citológicas detectadas como pontos nucleares. A fosforilação da H2AX, a metilação (H3K79) e ou acetilação (H3K56) da H3, e acetilação da H4 têm importância nas respostas da lesão do DNA. A H3K79 e possivelmente a H4K20 (trimetilação) recrutam a 53BP1. A acetilação da H2A mantém a sobrevivência das células após lesão do DNA, enquanto que a fosforilação da H2B leva a apoptose (DOWNS et al., 2007).

Alguns estudos têm apresentado a participação das histonas deacetilases (HDACs) no estágio tardio do processo de reparo do DNA, restaurando a conformação original da cromatina, finalizando tanto o processo de reparo como a associação com as proteínas do “check-point” (DOWNS et al., 2007).

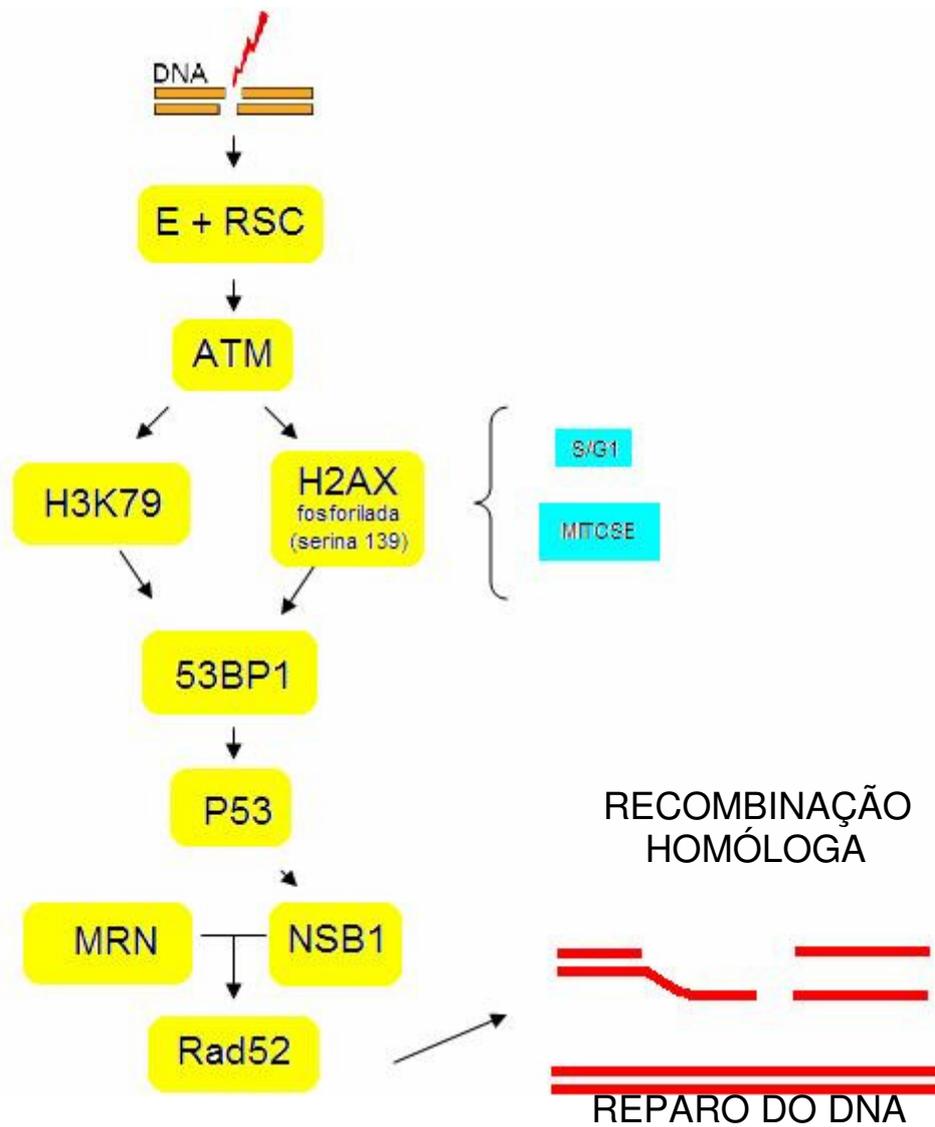


Figura 2 - Representação gráfica da cascata do mecanismo de reparo do DNA, em células somáticas

### 3 MATERIAL E MÉTODO

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal do Departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo e no Departamento de Ciência Animal da Universidade McGill, MacDonald Campus; Montreal, na província de Quebec, Canadá.

Embriões suínos ativados partenogeneticamente foram utilizados como unidade experimental, os quais foram avaliados quanto à velocidade de desenvolvimento embrionário e quanto à presença de apoptose pela detecção da Caspase-3 ativa.

Ao menos quando indicado, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Company (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). O meio TCM foi adquirido da Gibco (Grand Island, NY, EUA).

#### 3.1 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DE OÓCITOS SUÍNOS

Ovários de fêmeas pré-púberes foram colhidos no abatedouro e transportados até o laboratório a 37°C em solução salina, acrescida de 0,1% de Gentamicina. No laboratório, os ovários foram lavados em solução salina (35°C) e os folículos com diâmetro entre 3-6 mm aspirados com agulha de calibre 19G acoplada a seringa de 10ml. O líquido folicular foi depositado em tubo cônico de 50ml, permanecendo em repouso para sedimentação. Após 20 minutos de sedimentação, o sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e o sedimento ressuspendido 3 vezes em meio TLP (Tyrodes Lactato Piruvato), com intervalo de 20 minutos entre cada lavagem. Após a última lavagem em meio TLP (1 hora do final da aspiração), o sedimento foi ressuspendido em meio TLP e distribuído em placas de Petri (90mm) para

rastreamento dos oócitos em esteromicroscópio. Foram selecionados oócitos de grau GI, GII e GIII que apresentaram camadas de células do *cumulus oophorus* espessas e compactas. Grupos de 20 a 25 oócitos foram maturados *in vitro* por 22 horas com hormônios e 22-24 horas sem hormônios em gotas de 100µl de meio de maturação (Anexo A) em estufa à 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e alta umidade.

### 3.2 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA (AP)

Após a MIV, as células do *cumulus* foram removidas mecanicamente por pipetagens sucessivas durante 2-4 minutos em TLP acrescido de 0,1% de hialuronidase. Oócitos maduros foram selecionados pela presença do 1º corpúsculo polar (CP) e foram submetidos à ativação química (Ativação Partenogénética/AP). A taxa de maturação foi calculada pelo número de oócitos maduros sobre o número total de oócitos utilizados.

Para a AP, os oócitos foram lavados em meio TCM + 2mg/ml BSA (albumina sérica bovina), transferidos para solução de 15µM Ionomicina (1 oócito/10 µl meio) por 5 minutos e lavados em solução de TCM + 3mg/ml BSA. Após 3 lavagens em meio PZM3 (Anexo B) sem Cálcio e Magnésio (PZM3 - CM), os oócitos foram incubados por 4 horas em solução de 10mM Cloreto de estrôncio (ClSr) + 10µg/ml de Ciclohexemida (CHx) + 7,5µg/ml de Citocalasina B (CB). Após este período, os oócitos foram lavados em PZM3 (Anexo B) e incubados por mais 2 horas em CHx+CB, na mesma concentração da fase anterior (CHE; LALONDE; BORDIGNON, 2007). Em seguida 15 a 20 oócitos foram lavados e cultivados em meio microgotas de 30 a 40 µl de PZM3. Todas as incubações, durante a AP e o cultivo *in vitro* (CIV) foram realizadas a 38,5°C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar e alta umidade.

## 4 EXPERIMENTO PRÉVIO

### 4.1 JUSTIFICATIVA

Um experimento prévio foi realizado com a finalidade de se obter a distribuições quanto o tempo de clivagem dos diferentes grupos de embriões, rápido (clivados até 24 horas) ou lento (clivados após 24 horas), e quanto ao número de células às 48 horas. Para determinar se os grupos experimentais possuíam número suficiente em todos os grupos.

### 4.2 OBJETIVO

Quantificar, pela taxa de clivagem no D-2 de cultivo, os diferentes grupos de embriões em desenvolvimento rápido ou lento, no modelo animal utilizado (embriões suínos AP).

### 4.3 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização deste experimento prévio foram maturados *in vitro*, conforme descrito no item 3.1, 4560 oócitos em 23 repetições. Após a AP, os embriões foram transferidos para o meio PZM3, determinando neste momento o início do cultivo *in vitro* (D0).

Quatro grupos foram formados de acordo com o tempo de clivagem. Os embriões foram avaliados no D1 (24 horas após o início do cultivo) e classificados como rápido (R-clivados) ou lento (L-não clivados). No D2 (48 horas após o início do cultivo *in vitro*),

embriões a partir de 4 células foram subdivididos em R4 e L4 e embriões de 2 e 3 células em R2 e L2. Neste momento foi determinado o índice total de clivagem (número de embriões clivados sobre o total de oócitos cultivados) (Figura 3).

#### 4.3.1 Delineamento Experimental

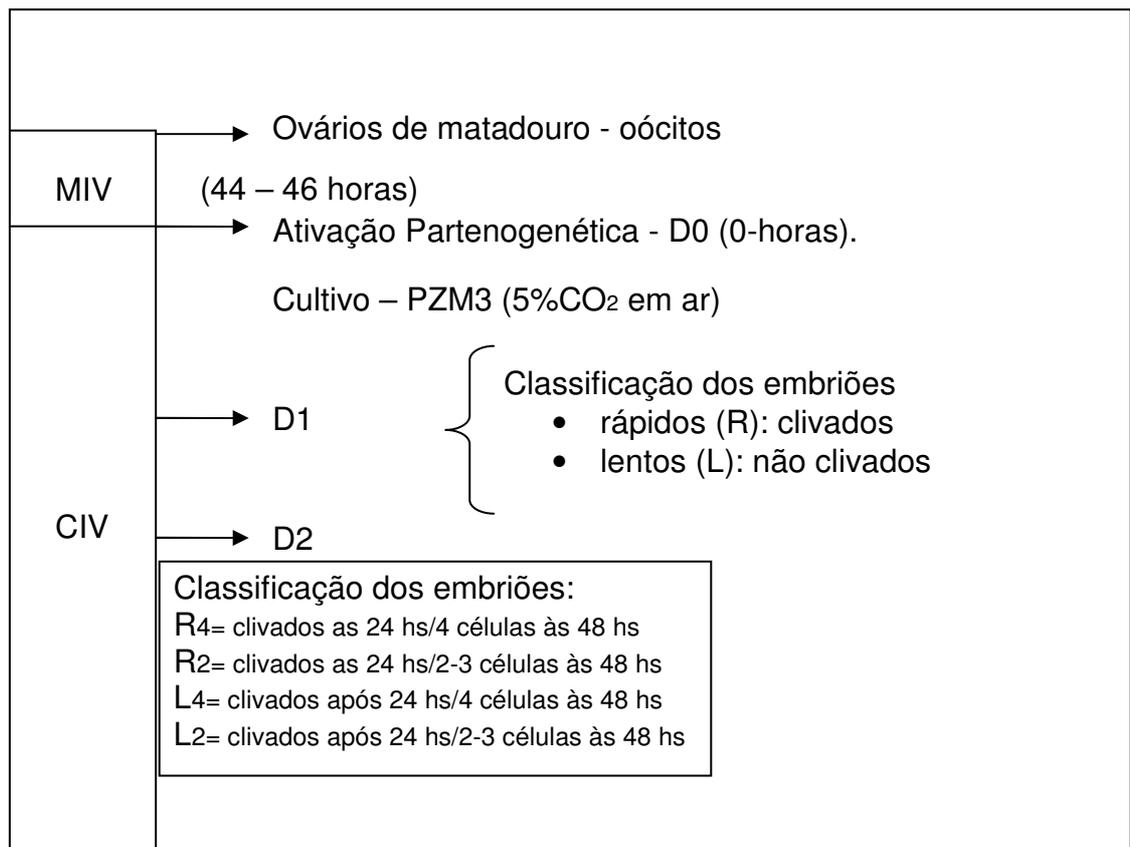


Figura 3 - Esquema representativo gráfico do delineamento experimental do experimento prévio

#### 4.3.2 Análise Estatística

Variações nos índices de desenvolvimento embrionário foram analisados usando o programa JMP (SAS Institute Inc. Cary, NC) determinadas por análise de variância com nível

de significância de 5%; sendo as variáveis dependentes os índices de maturação, clivagem e fragmentação e as variáveis dependentes os diferentes grupos R4, R2, L4 e L2.

#### 4.4 RESULTADOS

O índice de maturação dos oócitos foi de 69,03% (3140/4560). Foram ativados 2890 oócitos e os índices de fragmentação, não clivados e clivados foram de 14,07%; 15,33% e 70,6%, respectivamente.

Do total de embriões clivados sobre o número de oócitos ativados, 53,0% pertenceram ao grupo R (R4 e R2), e apenas 17,6 representaram o grupo L (L4 e L2). Com relação aos embriões clivados, 70,5% destes apresentaram 4 ou mais células, sendo que destes, mais da metade composto apenas pelo grupo R4 (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias ( $\pm$ EP) dos índices de clivagem de embriões suínos AP no D-2 de cultivo nos diferentes grupos experimentais - São Paulo – 2007

Grupos	% Clivagem às 48 hs (n° de embriões)	% Clivagem às 48 hs em relação aos clivados
R4	37,4 $\pm$ 3,4 (1077)	52,97
R2	15,6 $\pm$ 2,1 (461)	22,09
L4	5,3 $\pm$ 1,1 (158)	7,51
L2	12,3 $\pm$ 1,8 (356)	17,42

#### 4.5 CONCLUSÃO

Embriões do grupo rápido representam o maior grupo de embriões suínos AP, expressos pela alta taxa de clivagem no D-2.

## **5 EXPERIMENTO 1: RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE CLIVAGEM E O POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO ATÉ BLASTOCISTO**

### **5.1 HIPÓTESE**

Embriões que clivam até 24 horas após o início do CIV apresentam melhor taxa de desenvolvimento embrionário.

### **5.2 OBJETIVO**

Relacionar tempo de clivagem com o potencial de desenvolvimento de embriões suínos ativados partenogeneticamente (AP) até o estágio de blastocisto.

### **5.3 MATERIAL E MÉTODO**

Os embriões foram produzidos conforme descrito nos itens 3.1 e 3.2. Após 24 horas do início do CIV (D-1) os embriões foram classificados em rápido e lento como descrito no item 4.3.

Do total de manipulações utilizadas no experimento prévio, 6 manipulações aleatórias foram mantidas em cultivo até o D6, sendo que no D-5, 10% de soro fetal bovino (SFB) foram adicionados ao meio de cultivo. O índice de blastocisto (número de blastocistos/número de embriões clivados) e o número médio de núcleos por blastocistos (111

embriões oriundos de 5 manipulações) foram calculados para os 4 diferentes grupos (Figura 4).

### 5.3.1 Delineamento Experimental

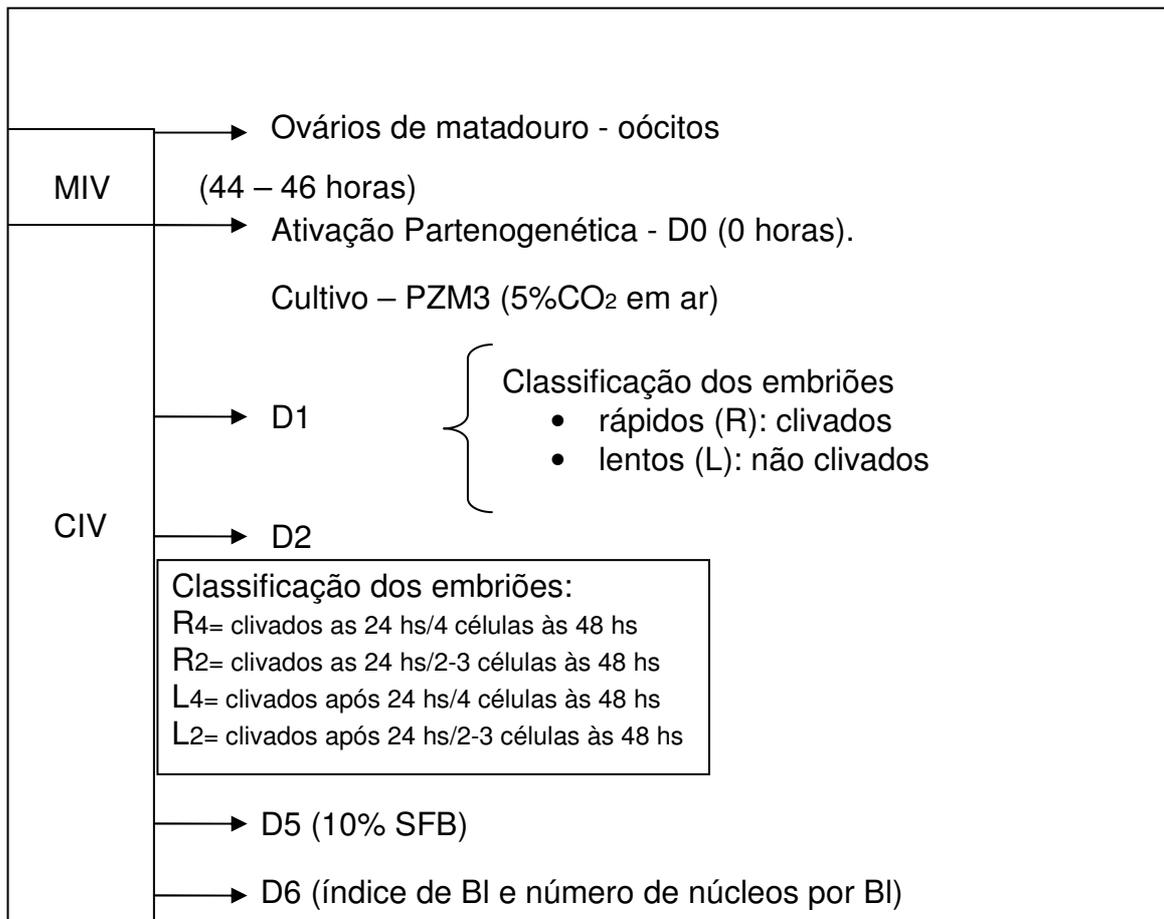


Figura 4 - Esquema representativo gráfico do delineamento do experimento 1

### 5.3.2 Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o programa JMP (SAS Institute Inc. Cary, NC). As Alterações nas variáveis dependentes do número médio de núcleo entre os diferentes grupos foi determinada pela análise de variância com médias comparadas pelo teste de Tukey-

Kramer HSD e o índice de blastocisto determinado pelo teste Qui-quadrado. Para a variável independente utilizou-se os grupos R e L. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significante.

#### 5.4 RESULTADO

Maiores índices de blastocisto ( $66,16 \pm 2,9$  e  $59,62 \pm 4,8$  versus  $15,38 \pm 5,8$  e  $16,8 \pm 4,3$ ) e maior número de núcleos por blastocistos ( $40,08 \pm 2,2$  e  $38,89 \pm 3,2$  versus  $19,16 \pm 2,8$  e  $20,2 \pm 2,1$ ) foram obtidos nos grupos R (R4 e R2) em comparação aos grupos L (L4 e L2), respectivamente (Figura 5).

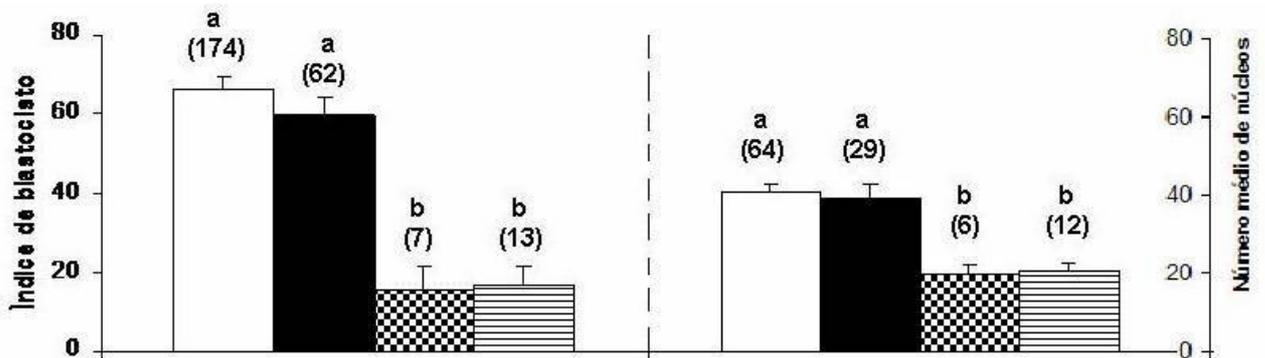


Figura 5 - Índice de blastocisto e número médio de núcleos por blastocisto no D-6 de cultivo nos diferentes grupos experimentais. Barras brancas – grupo R4; barras pretas - grupos R2; barras pontilhadas - grupos L4; barras com linhas horizontais - grupo L2. Os números acima das colunas representam os números de blastocistos avaliados. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os grupos no mesmo dia ( $p < 0,05$ ). Valores de p (ANEXO C)

## 5.5 CONCLUSÃO

Embriões AP que clivam até 24 horas após o início do CIV, apresentam melhor desenvolvimento embrionário até blastocisto e maior número de núcleos por blastocisto.

Apesar dos grupos experimentais diferirem quanto ao número de células às 48 horas, embriões dos grupos R4 e R2 ou L4 e L2, não apresentaram diferenças quanto ao desenvolvimento embrionário expressos na taxa de blastocisto e no número de células por blastocistos.

## **6 EXPERIMENTO 2: IMUNODETECÇÃO DE CASPASE-3 ATIVA DURANTE DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS AP**

### **6.1 HIPÓTESE**

Embriões de desenvolvimento rápido e lento apresentam diferenças na marcação de Caspase-3 ativa.

### **6.2 OBJETIVOS**

- a) Quantificar a presença de Caspase-3 ativa em embriões suínos AP nos grupos rápido e lento durante o desenvolvimento embrionário.
- b) Determinar a localização da Caspase-3 ativa em embriões suínos AP ao longo do desenvolvimento embrionário.

### **6.3 MATERIAL E MÉTODO**

Para este experimento foram realizadas 8 manipulações. Os oócitos foram maturados *in vitro* e AP como descrito previamente nos itens 3.1 e 3.2. Apenas dois grupos foram formados de acordo com o tempo de clivagem. O grupo rápido (R - clivado até 24 horas após o início do CIV) e o grupo lento (L clivado entre 24 e 48 horas após o início do CIV). Ambos os grupos (R e L) foram destinados à análise de imunocitoquímica para Caspase-3 ativa

fixados nos D2, D4 e D6, sendo cada um destes dias considerado um sub-experimento e realizado em manipulações diferentes. A determinação do número total de células embrionárias foi realizada em embriões fixados nos D5 e D6 (Figura 6).

### **6.3.1 Imunocitoquímica para Caspase-3 ativa**

Para a reação de imunocitoquímica, os embriões foram fixados em solução de 4% de paraformaldeído em PBS por 20 minutos e mantidos em solução de 0,5% de TritonX-100 acrescido de 0,3% BSA em PBS à 4°C, por no máximo 7 dias. A permeabilização das células embrionárias foi realizada com 0,2% de TritonX-100 em PBS por 60 minutos à temperatura ambiente e a solução de bloqueio para proteínas inespecíficas foi composta de 3% BSA + 0,15% Tween-20 em PBS, incubados a 37°C por 60 minutos.

A concentração do 1º anticorpo (Ac) monoclonal anti-coelhos para Caspase-3 ativa, Asp175 - anticorpo monoclonal de coelho (Cell Signaling Technology, Canada), foi de 1:400 incubado a 4°C por 12 horas. Após este período, os embriões foram lavados 3 vezes com solução de bloqueio (20 minutos em cada lavagem) e incubados a 37°C por 60 minutos com o 2º Ac anti-camundongo, Alexa Green 546 (Molecular Probe), na concentração de 1:700. Para todas as reações foi realizado controle negativo (ausência do 1º Ac).

Os embriões foram lavados 4 vezes em solução de PBS e transferidos para solução de montagem (10µg/ml de DAPI) em moviol, colocados entre lâmina e lamínula e analisados por Microscopia de Epi-fluorescência (Nikon-E800, Japão), em aumento de 200X. Foram quantificados simultaneamente o número médio de núcleos e as células positivas para Caspase-3 nos diferentes grupos.

### 6.3.2 Quantificação relativa do sinal de fluorescência para Caspase-3 ativa

As imagens para Caspases-3 ativa (+casp-3) obtidas em microscopia de Epi-fluorescência foram arquivadas, analisadas e quantificadas por densitometria, usando o programa simple PCI®; mantendo o mesmo padrão de tempo (segundos) e intensidade de fluorescência (3.0 Pixels) para todas as análises. Para a quantificação de +casp-3, as imagens dos controles negativos (ausência do Ac 1º) foram padronizadas no valor de 1,0 e os demais grupos ajustados em relação a este valor.

### 6.3.3 Delineamento Experimental

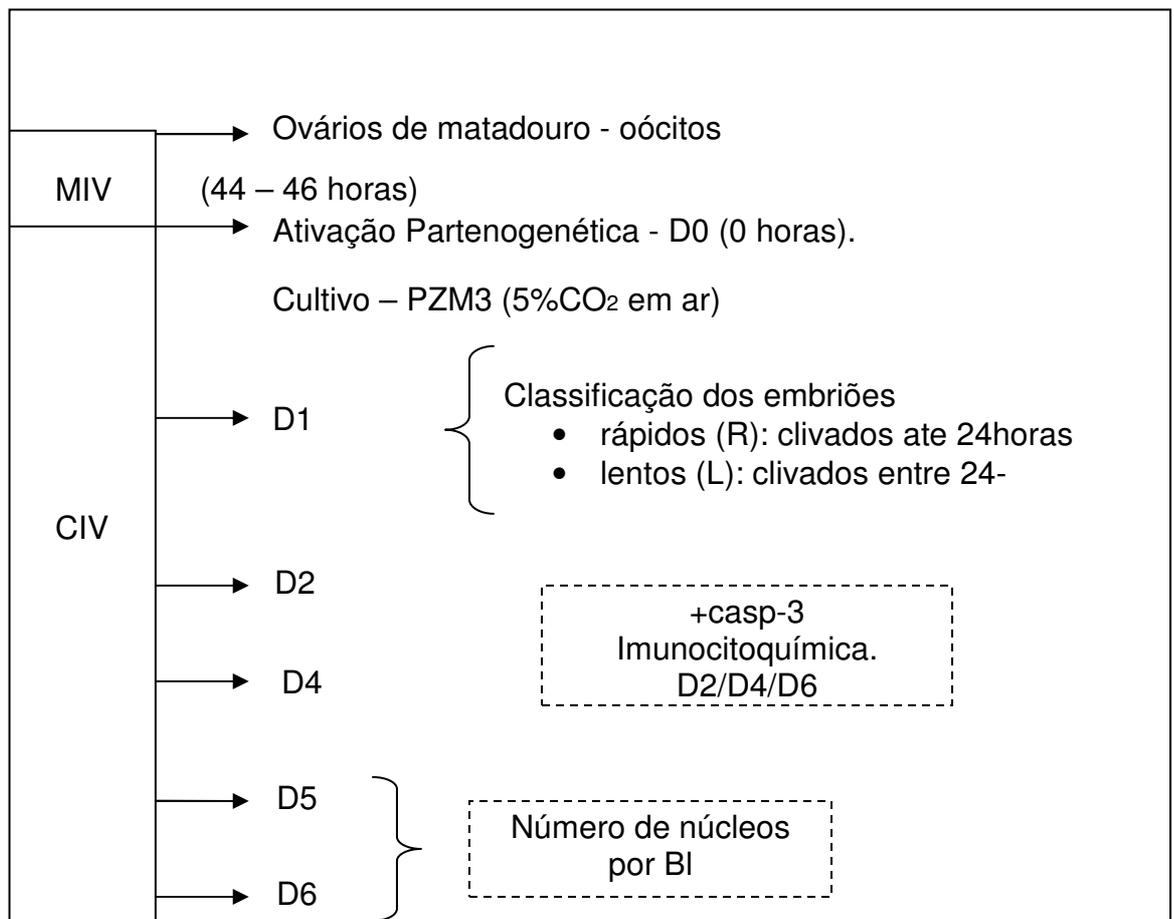


Figura 6 - Esquema representativo gráfico do delineamento experimental 2

### 6.3.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o programa JMP (SAS Institute Inc. Cary, NC). Alterações nas variáveis dependentes dos números médios de núcleos e intensidade de fluorescência entre as variáveis independentes dos diferentes grupos (R e L) e diferentes dias (D2, D4, D5 e D6) foram determinadas pela análise de variância com médias comparadas pelo teste de Tukey-Kramer HSD. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 6.4 RESULTADOS

Foi observada diferença na localização do sinal de Caspase-3 ativa durante o cultivo *in vitro*. Entre o D2 e o D6, o sinal apresentou localização citoplasmática, sendo que a partir do D5 o sinal passou a apresentar também localização nuclear (Figuras 7 e 8 e Tabela 2).

Para a localização citoplasmática no D2 foi observado, que embriões do Grupo R apresentaram sinal de Caspase-3 ativa maior do que os embriões do grupo L (2,4 versus 1,4). No D4, a atividade de Caspase-3 citoplasmática foi equivalente entre os embriões dos grupos R e L (1,1 versus 1,0). No D6, a atividade citoplasmática de +casp-3 somou-se à atividade nuclear e não apresentou diferença significativa entre o grupo R, comparado ao grupo L (1,1 versus 1,2 respectivamente) (Figura 7).

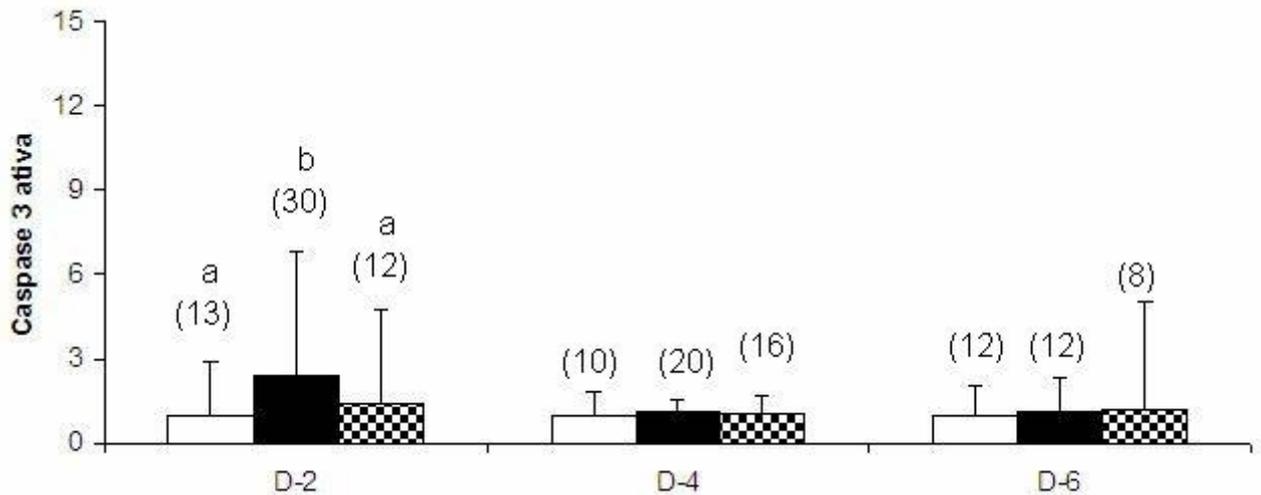


Figura 7 - Quantificação relativa de Caspase-3 ativa por densitometria (média  $\pm$  EP) em embriões de desenvolvimento rápido (R) e lento (L). Barras brancas - controle negativo; barras pretas - grupo L; barras pontilhadas - grupo R. Os números acima das colunas representam os números de embriões analisados. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os grupos tratados no mesmo dia ( $p < 0,05$ ). Valores de p (ANEXO C)

Não foi observada diferença na proporção de núcleos marcados para Caspase-3 ativa entre os grupos R e L, tanto no D5 quanto no D6. Porém, no grupo R houve aumento significativo, entre o D-5 e D-6, na porcentagem de núcleos positivos para Caspase-3 ativa, passando de 29,2% a 47,83 (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias ( $\pm$ EP) de núcleos positivos para Caspase-3 ativa ao longo do cultivo *in vitro* - São Paulo - 2007.

Grupos	% de núcleos que apresentaram marcação para Caspase3 ativa (n° de embriões)	
	D5	D6
Rápido (R)	29,2 $\pm$ 3,1 (50) <sup>a</sup>	47,83 $\pm$ 5,6 (45) <sup>b</sup>
Lento (L)	17,1 $\pm$ 9,3 (8)	33,96 $\pm$ 8,9 (20)

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa entre os dias de cultivo dentro do mesmo grupo ( $p < 0,001$ ). Valores de p (ANEXO C)

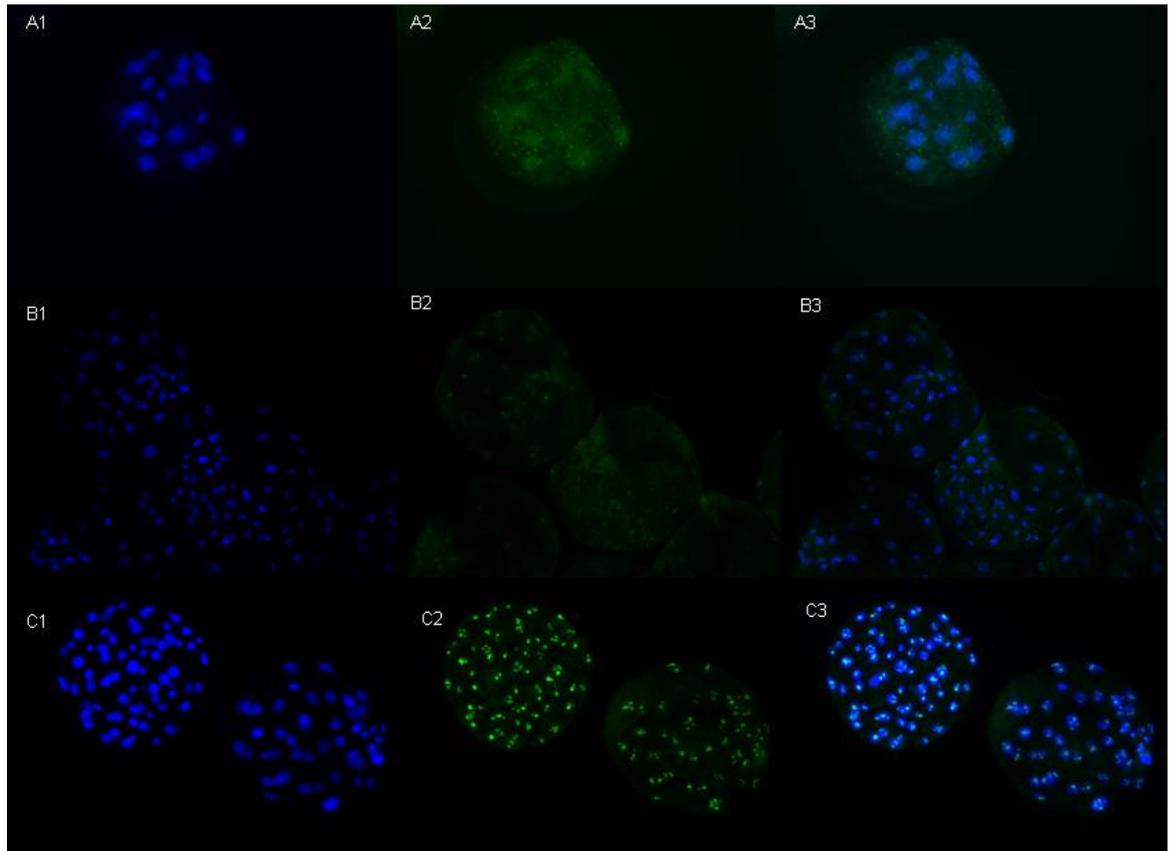


Figura 8 - Imunodeteção de Caspase-3 ativa no D4 (A), D5 (B) e D6 (C). Marcação nuclear com Hoechst 33342 (1), Caspase-3 ativa (2) e sobreposição das imagens da 1 e 2 (3) em microscopia de Epifluorescência, aumento 200X

## 6.5 CONCLUSÃO

Embriões AP do grupo rápido (R) apresentaram maior quantidade de Caspase-3 ativa do que embriões do grupo lento (L) às 48 horas do início do CIV.

A Caspase-3 ativa apresentou localização citoplasmática no D-2 e no D-4 e localização citoplasmática e nuclear no D-5 e no D-6 do cultivo *in vitro*.

## **7 EXPERIMENTO 3: EFEITO DO INIBIDOR DE CASPASE-3 (z-DEVD-fmk) NA MATURAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS AP**

### **7.1 HIPÓTESE**

A inibição da Caspase-3 ativa interfere no desenvolvimento de embriões suínos AP.

### **7.2 OBJETIVO**

Determinar o papel da Caspase-3 ativa durante a MIV, início ou final do CIV avaliando as taxas de blastocistos e número de núcleos por embrião.

### **7.3 MATERIAL E MÉTODO**

Para este experimento foram realizadas 3 etapas, de acordo com o período de exposição ao inibidor de Caspase-3: 1) maturação, 2) início do cultivo *in vitro* ou 3) final do cultivo *in vitro*. Para isto, as estruturas foram transferidas para gotas de MIV ou CIV, contendo 100  $\mu$ M z-DEVD-fmk (R&D Systems®) reconstituído em 1% DMSO ou 1% DMSO sem inibidor para os grupos controles.

Os oócitos foram maturados, ativados e os presumíveis zigotos cultivados usando as mesmas condições descritas nos experimentos anteriores (3.1, 3.2 e 4.3).

### 7.3.1- 1º Etapa - Efeito da inibição da Caspase-3 ativa na MIV

Foi avaliado o efeito da inibição da Caspase-3 ativa durante as 46 horas da MIV. Nesta etapa foram realizadas 5 repetições e utilizados 1382 oócitos. Os oócitos foram maturados na ausência (583 oócitos para o grupo controle) ou presença do z-DEVD-fmk (799 oócitos tratados). Os índices de clivagem foram determinados no D1 (embriões do grupo rápido - R, clivados às 24 horas) e no D2 (embriões do grupo R, somados aos embriões do grupo L - clivados entre 24 e 48 horas). Somente os embriões de desenvolvimento rápido (R), clivados até o D1 foram transferidos para nova gota de meio PZM-3 e mantidos em cultivo por um adicional de 5 dias para verificar o índice de desenvolvimento até blastocisto (número de blastocistos/ número de embriões clivados no D1) e o número médio de núcleos por blastocistos (Figura 9).

#### 7.3.1.1 Delineamento Experimental

Tratamento com inibidor de Caspase-3 na MIV		
Tratamentos	MIV (44-46 hs)	CIV (D-0 a D-6)
Controle (DMSO)	-	-
Inibidor (z-DEVD-fmk)	+	-

Figura 9 - Esquema representativo gráfico do delineamento experimental 3, 1º etapa (+) presença do z-DEVD-fmk, (-) ausência do z-DEVD-fmk

#### 7.3.1.2 Análise Estatística

Foram realizadas 5 manipulações para a primeira fase do experimento 3. Os dados foram analisados usando o programa JMP (SAS Institute Inc. Cary, NC). Variações nos

índices de maturação, clivagem, blastocisto e número médio de núcleos entre os diferentes grupos foram determinadas pela análise de variância com médias comparadas pelo teste de Tukey-Kramer HSD. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### **7.3.2 - 2º Etapa: Efeito da inibição da Caspase-3 ativa no Início do CIV**

Foi avaliado o efeito da inibição da Caspase-3 ativa no início do CIV. Para esta etapa foram realizadas 7 manipulações nas quais 1296 oócitos em MII foram ativados.

Após a AP (ítem 4.3), os oócitos foram divididos em 4 grupos, de acordo com a duração do tratamento e dia de acréscimo do z-DEVD-fmk. Grupo controle (sem acréscimo do z-DEVD-fmk), grupo 0-24h (acrécimo do z-DEVD-fmk no D0, por 24 horas), grupo 0-48 horas (acrécimo de z-FMK-fmk no D0 por 48 horas) e grupo 24-48 horas (acrécimo de z-DEVD-fmk no D1 por 24 horas). Todos os grupos (controle e experimental) foram formados apenas por embriões clivados no D1 (grupo R). A troca de meios com acréscimo de uma nova solução contendo z-DEVD-fmk foi realizada a cada 24 horas. Os índices de clivagem, blastocisto e o número médio de núcleos por blastocisto foram determinados como descrito na etapa anterior (Figura 10).

### 7.3.2.1 Delineamento Experimental

Tratamento com inibidor de Caspase-3 ativa no início do CIV			
Tratamentos	(D0) 0 – 24 hs	(D1) 24 – 48 hs	D - 2 ao D - 6.
D0 (24 hs)	+	-	-
D0 (48 hs)	+	+	-
D1 (24 hs)	-	+	-
Controle	-	-	-

Figura 10 - Esquema representativo gráfico da 2ª etapa do delineamento experimental 3.  
(+) presença do z-DEVD-fmk, (-) ausência do z-DEVD-fmk.

### 7.3.2.2 Análise Estatística

Foram realizados 6 manipulações para a segunda etapa do experimento 3. Os dados foram analisados usando o programa JMP (SAS Institute Inc. Cary, NC). Alterações das variáveis dependentes dos índices de clivagem e número médio de núcleos entre variáveis independentes dos diferentes grupos foram determinadas pela análise de variância com médias comparadas pelo teste de Tukey-Kramer HSD. O índice de blastocisto foi determinado pelo teste Qui-quadrado. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### 7.3.3 - 3ª Etapa - Efeito da inibição da Caspase-3 ativa no final do CIV

Foram realizadas 6 manipulações nas quais 1099 embriões AP clivados foram mantidos em cultivo.

O inibidor de Caspase-3 foi acrescido do D4 ao D6 do CIV, em diferentes intervalos formando 6 grupos: 88 embriões para o grupo controle do D5 (sem acréscimo de z-DEVD-

fmk e fixação no D5), 225 embriões para o grupo controle do D6 (sem acréscimo do z-DEVD-fmk e fixação no D6), 173 embriões para o grupo D4-5 (acrécimo do z-DEVD-fmk no D4 por 24 horas com fixação no D5), 149 embriões para o grupo D4-5b (similar ao anterior, entretanto foi fixado no D6), 251 embriões para o grupo D4-6 (acrécimo do z-DEVD-fmk no D4 por 48 horas com fixação no D6) e 213 embriões para o grupo D5-6 (acrécimo do z-DEVD-fmk no D5 por 24 horas com fixação no D6). O índice de clivagem foi determinado no D2 e o de blastocisto e o número de células no D6, calculado em relação aos embriões clivados no D2 (Figura 11).

Após o final do CIV, os embriões dos grupos controle e tratados com inibidor de Caspase na 3ª etapa foram fixados e destinados à reação de imunocitoquímica para detecção de Caspase-3 ativa como descrito anteriormente.

## 7.3.3.1 Delineamento Experimental

Tratamento com inibidor de Caspase-3 ativa no final do CIV				
Tratamentos	(D-3) 72 – 96 hs	(D-4) 96 – 120 hs	(D-5) 120 - 144 hs	(D-6) 144 hs
Controle D-6	-	-	-	fixado
Controle D-5	-	-	Fixado	∅
D5-D6	-	-	+	fixado
D4-D5 (fixado D5)	-	+	Fixado	∅
D4-D5b (fixado D6)	-	+	+	fixado
D-4 a D-6	-	+	+	fixado

Figura 11: Esquema representativo gráfico do delineamento experimental 3, 3º etapa  
(+) presença do z-DEVD-fmk, (-) ausência do z-DEVD-fmk.

## 7.3.3.2 Análise Estatística

Foram realizados 6 manipulações para a terceira etapa do experimento 3. Os dados foram analisados usando o programa JMP (SAS Institute Inc. Cary, NC). Variações nos índices de maturação, clivagem, blastocisto, número médio de núcleos e intensidade de fluorescência, entre os diferentes grupos foram determinadas pela análise de variância com

médias comparadas pelo teste de Tukey-Kramer HSD. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 7.4 RESULTADOS

### 7.4.1- 1ª Etapa - Efeito da inibição da Caspase-3 na MIV

Os oócitos maturados na ausência (controle) ou presença do z-DEVD-fmk (tratado) não apresentaram diferenças nos índices de maturação, clivagem, desenvolvimento embrionário até blastocisto e número de núcleos por blastocistos entre os grupos. (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias ( $\pm$ EP) dos índices de maturação, clivagem e desenvolvimento embrionário após a maturação de oócitos suínos na presença ou ausência de inibidor de capases (z-DEVD-fmk) - São Paulo - 2007

Tratamentos	MII % (nº de oócitos)	Clivagem % (n)		Desenvolvimento	
		D1	D2	Blastocisto% (n)	Nº núcleos (n)
Controle	59,79 $\pm$ 4,5 (348)	69,02 $\pm$ 6,7 (113)	73,17 $\pm$ 5,0 (120)	67,19 $\pm$ 1,8 (76)	46,80 $\pm$ 2,8 (55)
z-DEVD-fmk	57,60 $\pm$ 2,9 (452)	61,69 $\pm$ 3,7 (108)	66,97 $\pm$ 4,6 (117)	55,98 $\pm$ 7,1 (61)	43,49 $\pm$ 3,1 (43)

n=número de embriões. Valores de p (ANEXO C)

#### 7.4.2- 2ª Etapa: Efeito da inibição da Caspase-3 ativa no início do CIV

Os índices de clivagem após o início do cultivo não diferiram entre os grupos ( $60,77\% \pm 9,1$  versus  $56,86\% \pm 6,1$  às 24 horas e  $68,67 \pm 8,1$  versus  $65,96 \pm 5,6$  às 48 horas) para o grupo tratado com inibidor e grupo controle, respectivamente).

Os grupos tratados com o inibidor  $\alpha$ -DEVD-fmk por 0-24 horas ou por 0-48 horas apresentaram aumento dos índices de blastocistos quando comparados ao grupo tratado por 24-48 horas e ao controle ( $55,86 \pm 4,7$  e  $55,14 \pm 4,8$  versus  $40,87 \pm 4,6$  e  $37,5 \pm 4,7$ , respectivamente). Não houve diferença significativa do número de células por blastocistos entre os diferentes grupos (Figura 12).

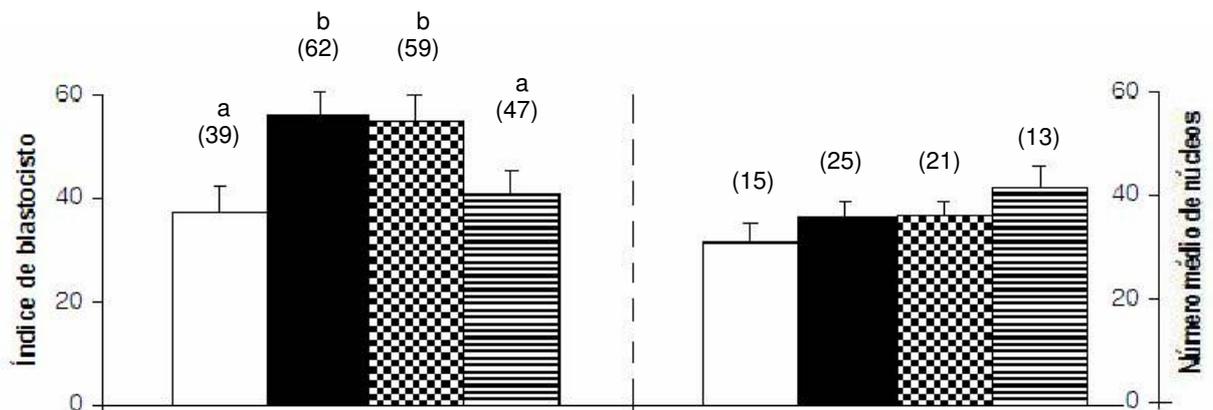


Figura 12 - Índices de blastocisto e número médio de núcleos por blastocistos no D6 em embriões suínos AP, tratados com o inibidor  $\alpha$ -DEVD-fmk no início do cultivo *in vitro*. Barras brancas – grupo controle; barras pretas - grupo 0-24 horas; barras pontilhadas - grupo 0-48 horas; barras com linhas horizontais - grupo 24-48 horas. Os números acima das colunas representam os números de blastocistos. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os grupos tratados ( $p < 0,05$ ). Valores de p (ANEXO C)

### 7.4.3 - 3ª Etapa: Efeito da inibição da Caspase-3 ativa no final do CIV

Não houve diferença nos índices de blastocisto e números médio de núcleos por blastocistos entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4: – Número médio de núcleos e índice de blastocistos Médias ( $\pm$ EP) de embriões suínos AP tratados com o inibidor  $\alpha$ -DEVD-fmk no final do cultivo *in vitro* - São Paulo - 2007

Grupos	% Blastocitos (nº de blastocistos)		Número médio de núcleos/ blastocisto (nº de embriões)	
	D5	D6	D5	D6
Controle	33,0 $\pm$ 3,1 (29)	61,6 $\pm$ 2,7 (140)	33,2 $\pm$ 12,9 (26)	44,0 $\pm$ 13,9 (56)
D4 ao D5	44,0 $\pm$ 8,3 (77)	60,0 $\pm$ 7,4 (93)	31,1 $\pm$ 12,5 (34)	40,8 $\pm$ 13,5 (49)
D5 ao D6	-	63,2 $\pm$ 5,0 (128)	-	44,4 $\pm$ 19,6 (48)
D4 ao D6	-	59,3 $\pm$ 6,7 (152)	-	48,5 $\pm$ 16,2 (54)

Valores de p (ANEXO C)

Com a finalidade de testar a eficiência do inibidor de apoptose, no final do CIV os embriões dos diferentes grupos foram fixados e destinados à análise de Caspase-3 ativa por imunocitoquímica. Todos os grupos tratados com inibidor e fixados no D5 (1,2) ou no D6 (D4 ao D5, D5 ao D6, D4 ao D6) apresentaram menor quantidade de Caspase-3 ativa (1,4; 1,5;

1,6, respectivamente) do que os grupos sem inibidor fixados no D5 (2,0) e no D6 (2,2). O grupo tratado do D4 ao D5 e fixado no D5 e o grupo tratado por maior intervalo de tempo (D4 ao D6), apresentaram padrões de Caspase-3 ativa similares ao controle negativo. Novamente foi observado o aumento da quantidade de Caspase-3 ativa durante o desenvolvimento embrionário do D5 ao D6 nos grupo controle fixados no D5 e no D6 (Figura 13).

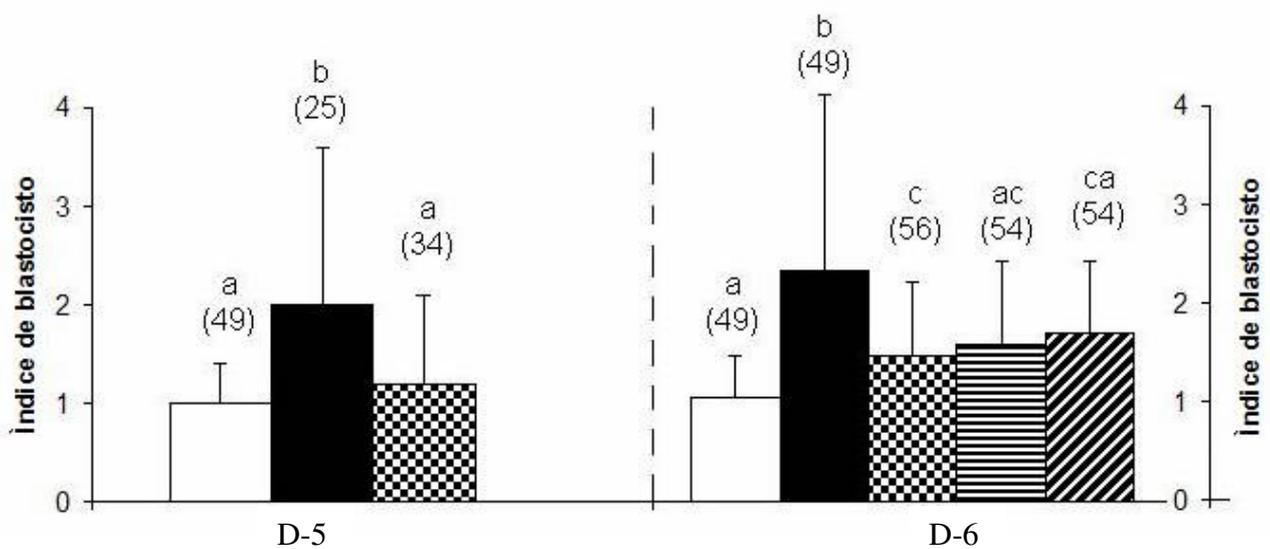


Figura 13 - Quantificação relativa de Caspase-3 ativa em embriões suínos AP tratados e não tratados com z-DEVD-fmk. Barras brancas - controle negativo; barras pretas - grupos não tratados; barras pontilhadas - grupos tratados com inibidor do D4 ao D5; barras com linhas horizontais - grupo tratado com inibidor do D5 ao D6 e barras com linhas oblíquas - grupo tratado com inibidor do D4 ao D6. Os números acima das colunas representam os números de embriões analisados. Letras diferentes acima das barras representam diferenças significativas entre os grupos tratados no mesmo dia ( $p < 0,05$ ). Valores de p (ANEXO C)

### 7.5 CONCLUSÃO FINAL DO EXPERIMENTO 3

O uso de inibidores na maturação ou final do CIV não interfere no desenvolvimento de embriões suínos AP, no entanto, seu uso nas primeiras 48 horas do CIV aumentou o índice de blastocistos.

## **8 EXPERIMENTO 4: IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS DE LESÃO E REPARO DO DNA NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS AP**

### **8.1 HIPÓTESE**

Embriões de suínos AP de desenvolvimento rápido e lento apresentam diferenças na sinalização para o reparo do DNA que refletem na marcação de proteínas de lesão e reparo do DNA.

### **8.2 OBJETIVO**

Investigar a presença de proteínas de lesão e reparo do DNA (53BP1, RAD52, NSB1 e  $\gamma$ H2AX) em embriões suínos AP de desenvolvimento rápido e lento.

### **8.3 MATERIAL E MÉTODO**

Os oócitos foram maturados e AP conforme descrito anteriormente (item 3.1 e 3.2). Os embriões clivados foram divididos em grupos de desenvolvimento rápido (R) e lento (L), fixados do D2, D4 e D6 e submetidos a avaliação de imunocitoquímica, do mesmo modo descrito para os embriões utilizados na avaliação de Caspase-3 ativa (item 6.3.1) (Figura 14).

### 8.3.1 Imunocitoquímica para $\gamma$ H2AX, 53BP1, NSB1 e RAD52

Foram realizados testes de imunocitoquímica para as proteínas  $\gamma$ H2AX (Upstate®), 53BP1, NSB1 e Rad52 (Cell Signaling). Foram realizados ensaios isolados para 53BP1 e  $\gamma$ H2AX e ensaios simultâneos relacionando NSB1 com  $\gamma$ H2AX (3 manipulações) e RAD52 com  $\gamma$ H2AX (3 manipulações). Os ensaios simultâneos foram realizados com o objetivo de otimizar o número de amostras disponíveis e de caracterizar o tipo de marcação de  $\gamma$ H2AX relacionada ao mecanismo de reparo do DNA.

A concentração dos 1º anticorpos (Acs) para 53BP1, RAD52, NSB1 e  $\gamma$ H2AX foram de 1:50, 1:100, 1:200 e 1:500, respectivamente (incubados por 12 horas a 5°C). Após a incubação com os 1ºAc, os embriões foram lavados de 3 a 5 vezes com solução de bloqueio e incubados a 37°C por 60 minutos com o 2º Ac; Alex Green® para 53BP1, RAD52, NSB1 na concentração de 1:400 e Cianina conjugado (Cy3) para  $\gamma$ H2AX na concentração de 1:200. Após este período de incubação, os embriões foram lavados de 4 a 5 vezes com solução de PBS e transferidos para solução de montagem em glicerol (10 $\mu$ g/ml de Hoechst 33342) entre lâmina e lamínula e analisados em Microscópio de Epi-fluorescência.

As análises de  $\gamma$ H2AX foram realizadas em embriões do grupo rápido e lento pela quantificação de núcleos com presença de pontos isolados (>10 e <10) (Figura 15). As demais proteínas de reparo do DNA (53BP1, RAD52 e NSB1) foram analisadas quanto a localização e o dia de migração do sinal citoplasmático para o núcleo.

Para a 53BP1 foi realizado controle positivo em fibroblasto fetal de suínos, radiados com luz UV por 5 minutos. Estas células foram processadas para reação de imunocistoquímica do mesmo modo descrito no item anterior.

## 8.3.2 Delineamento Experimental

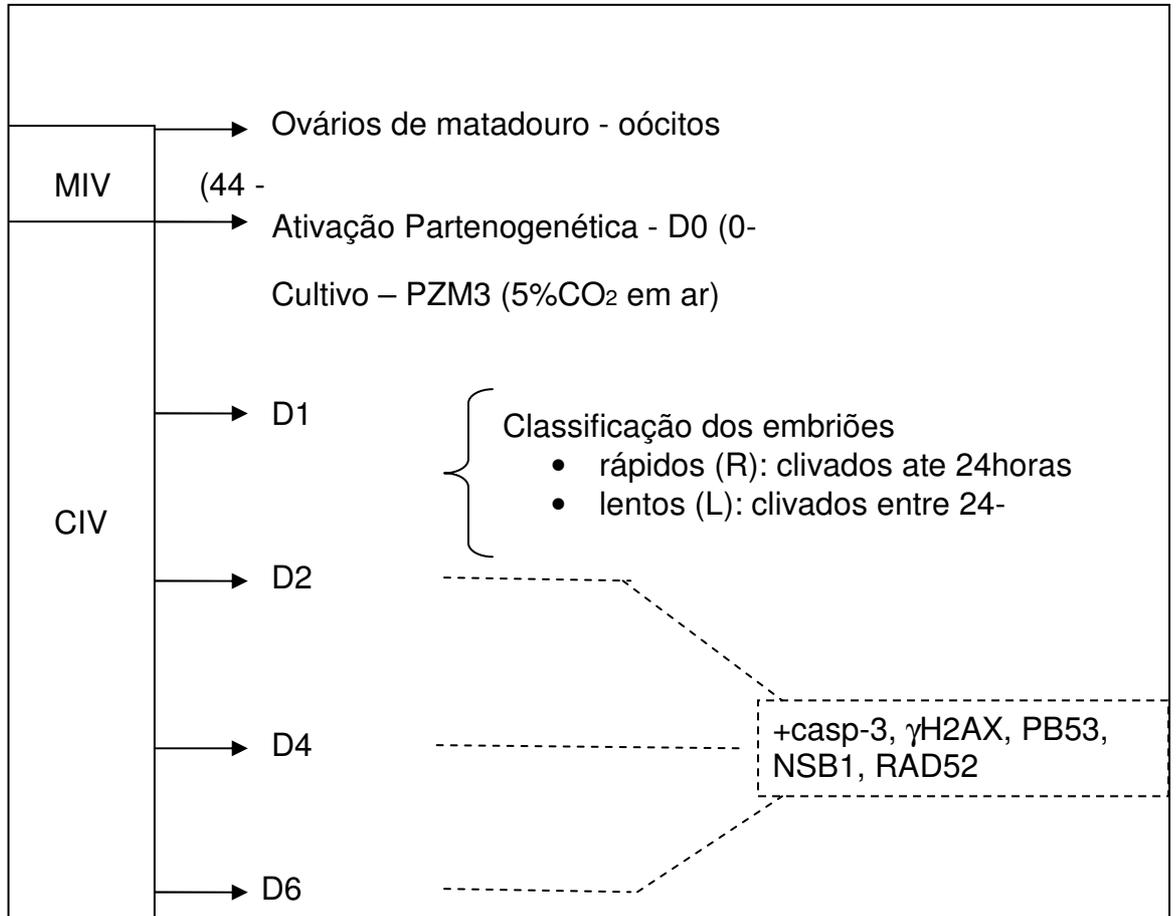


Figura 14 - Esquema representativo gráfico do delineamento experimental 4

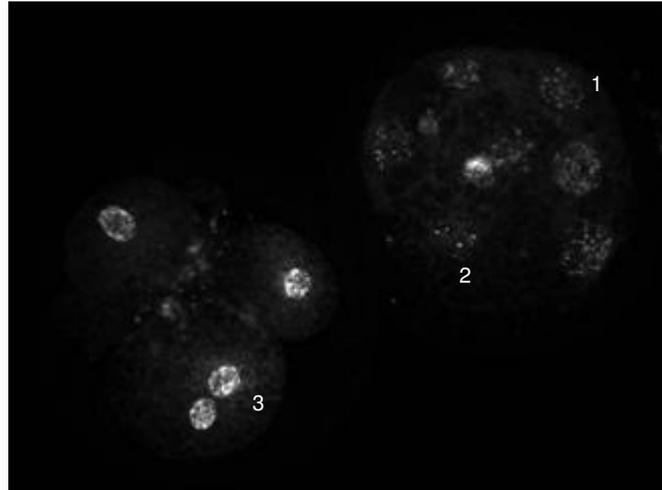


Figura 15 - Imunodeteção de  $\gamma$ H2AX em embriões suínos AP. Diferentes marcações no núcleo: pontos isolados >10 (1), pontos isolados <10 (2), marcação difusa característico de mitose (3). Microscopia de Epifluorescência, aumento 200X

### 8.3.3 Análise Estatística

Foram realizados no mínimo 3 repetições de cada experimento. Os dados foram analisados usando o programa JMP (SAS Institute Inc. Cary, NC). Variações nos índices de maturação, clivagem, blastocisto, número médio de núcleos e intensidade de fluorescência, entre os diferentes grupos foram determinadas pelo teste Qui-quadrado e pela análise de variância com médias comparadas pelo teste de Tukey-Kramer HSD. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 8.4 RESULTADOS: IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS DE LESÃO E REPARO DO DNA NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS AP

### 8.4.1 - Imunodeteccção de $\gamma$ H2AX durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões suínos AP

Foi observada diminuição na marcação da  $\gamma$ H2AX durante o progresso do desenvolvimento embrionário (D-4 ao D-6), com diferença significativa do D-5 para o D-6, tanto no grupo rápido como no grupo lento. Além disso, no D-5 do CIV, o grupo lento apresentou maior número de células marcadas para  $\gamma$ H2AX do que o grupo rápido.

Tabela 5 – Média ( $\pm$  EP) de núcleos marcados para  $\gamma$ H2AX em embriões suínos AP de desenvolvimento rápido e lento, nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro* - São Paulo - 2007

Dias	$\gamma$ H2AX					
	D-4		D-5		D-6	
Grupos	n	Média ( $\pm$ EP)	n	Média ( $\pm$ EP)	n	Média ( $\pm$ EP)
Lento	21	92,17 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	22	85,16 $\pm$ 4,1 <sup>aB</sup>	8	27,47 $\pm$ 5,5 <sup>b</sup>
Rápido	27	81,0 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>	26	70,43 $\pm$ 4,3 <sup>aA</sup>	43	29,56 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>

a,b Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre os dias de cultivo dentro do mesmo grupo (p<0,001)  
 A,B Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas entre grupos dentro do mesmo dia.  
 n= número de embriões. Valores de p (ANEXO C)

Com relação a  $\gamma$ H2AX foi observado um aumento significativo nos núcleos com mais que 10 pontos isolados (>10) no grupo lento comparado ao grupo rápido no D-5 do cultivo *in*

*vitro*. Para o número de pontos isolados menores que 10 (<10), não houve diferença entre os grupos durante o D-4 ao D-6 de CIV.

Dentro do mesmo grupo foi observado que o grupo rápido apresentou diminuição significativa de núcleos com mais de 10 pontos do D-4 para o D-5 e para núcleos com menos de 10 pontos, a diminuição foi 24 horas após (a partir do D-6) (Tabela 6).

Tabela 6 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) do número de pontos de  $\gamma$ H2AX pelo número total de células nos D-4, D-5 e D-6 de CIV – São – Paulo - 2007

dia \ grupo	D-4		D-5		D-6	
	> 10	< 10	> 10	< 10	> 10	< 10
L	42,42 $\pm$ 8,3	14,96 $\pm$ 5,4	43,9 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	10,67 $\pm$ 2,9	14,55 $\pm$ 3,3	10,12 $\pm$ 2,7
R	44,4 $\pm$ 6,4 <sup>A</sup>	17,76 $\pm$ 4,1 <sup>A</sup>	22,46 $\pm$ 4,9 <sup>bB</sup>	15,8 $\pm$ 3,8 <sup>A</sup>	16,14 $\pm$ 1,8 <sup>B</sup>	7,68 $\pm$ 1,0 <sup>B</sup>

a,b Letras diferentes na mesma coluna representa diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo dia de cultivo ( $p < 0,05$ )

A,B letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre dias dentro do mesmo dia ( $p < 0,05$ ).

Valores de p (ANEXO C)

#### 8.4.2 - Presença de fatores de reparo do DNA durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões suínos AP.

##### 8.4.2.1 Imunodeteccção de 53BP1 durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões suínos AP

Não foi observada marcação da 53BP1 em células embrionárias do D1 ao D7, mesmo após a indução de lesões por radiação UV (Tabela 7 e Figura 16). Os fibroblastos suínos usados como controle positivo da técnica apresentaram marcação positiva (Figura 17).

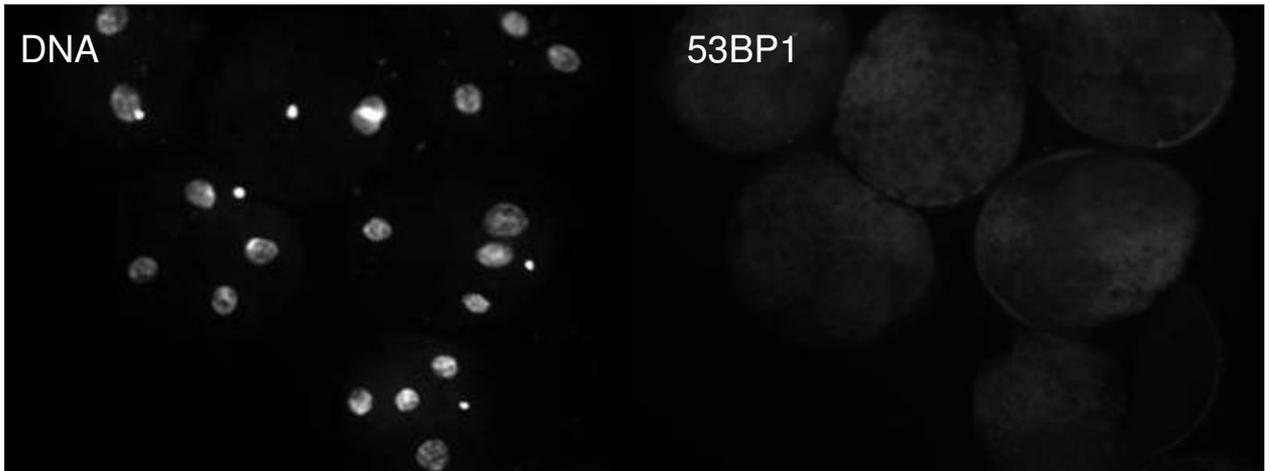


Figura 16 - Imunodeteccção de 53BP1 em embriões suínos AP no grupo R no D-2. Marcação do DNA com Hoechst33342 e ausência de marcação da 53BP1. Microscopia de Epifluorescência, aumento 200X

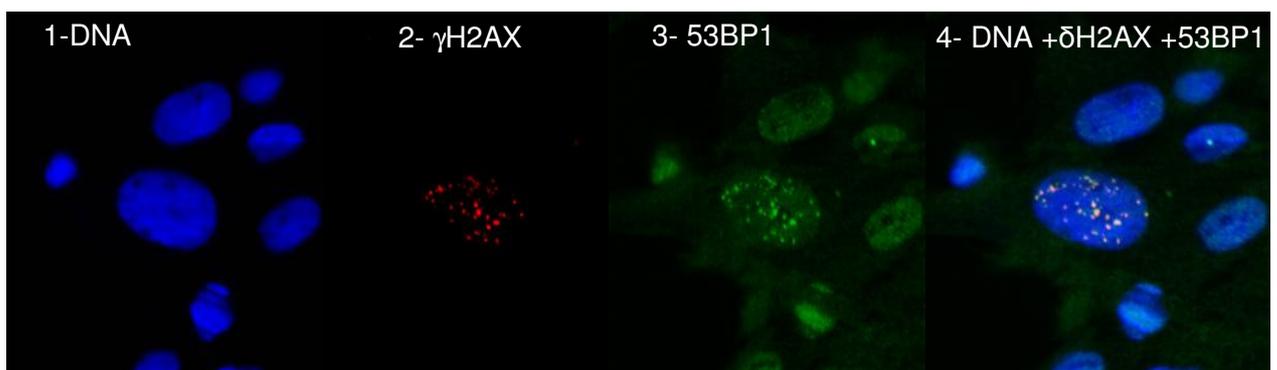


Figura 17 - Imunodeteccção de proteínas de reparo do DNA em fibroblasto fetal de suíno radiados com UV. Marcação do DNA com Hoechst33342 (1), pontos isolados >10 ( $\gamma$ H2AX) (2), marcação para 53BP1 (3) e sobreposição das imagens da 1 e 2 e 3 (4). Microscopia Confocal, aumento 400X

#### 8.4.2.2 Imunodeteccção de NSB1 e RAD52 durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões suínos AP

A NSB1 apresentou aumento de 39,61% de núcleos marcados do D-4 para o D-5, com desaparecimento do sinal citoplasmático a partir do D-5 do CIV (Tabela 7).

A RAD52 foi detectada no núcleo a partir do D-5 do desenvolvimento embrionário, com aumento da porcentagem de núcleos marcados no D-6. O sinal citoplasmático diminuiu do D-4 ao D-6 (Tabela 7).

Tabela 7 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) das diferentes proteínas de reparo de DNA no núcleo e índice de marcação citoplasmática em embriões suínos AP nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro* - São Paulo - 2007

PTN DNA	Dia	D-4		D-5		D-6	
		% sinal nuclear	Sinal citoplasmático	% sinal nuclear	Sinal citoplasmático	% sinal nuclear	Sinal citoplasmático
53BP1		Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
NSB1		30,47 $\pm$	100 <sup>a</sup>		0 <sup>b</sup>		0 <sup>b</sup>
		6,0 <sup>a</sup>	(29/29)	70,08 $\pm$	(0/31)	64,16 $\pm$ 4,9 <sup>b</sup>	(0/35)
RAD52			100 <sup>a</sup>		96,67 <sup>a</sup>		37,5 <sup>b</sup>
		0 <sup>a</sup>	(19/19)	1,19 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	(29/30)	47,48 $\pm$ 10,3 <sup>b</sup>	(6/16)

a,b Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre os dias de cultivo dentro do mesmo grupo ( $p < 0,001$ ).  
Valores de p (ANEXO C)

#### 8.4.2.2.1 Imunodeteção de NSB1 durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões suínos AP

A presença do sinal citoplasmático para NSB1 foi detectada no D-4, enquanto que o sinal nuclear esteve presente do D-4 ao D-7.

Foi observado um aumento da marcação de NSB1 durante a progressão do CIV, com diferença significativa entre os dias a partir do D-4 para D-5.

Durante o D-5 para o D-6 ambos os grupos apresentaram diminuição de núcleos marcados para NSB1, porém não significativa (Tabela 8 e Figura 18).

Tabela 8 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) da NSB1 no núcleo e o índice de marcação citoplasmática em embriões suínos AP de desenvolvimento rápido e lento nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro* - São Paulo - 2007

Dia	D-4		D-5		D-6	
	% sinal nuclear	Sinal citoplasmático	% sinal nuclear	sinal citoplasmático	% sinal nuclear	Sinal citoplasmático
R	36,59 $\pm$ 7,6 <sup>b</sup>	100 (16/16) <sup>b</sup>	75,7 $\pm$ 4,5 <sup>a</sup>	0 (0/17) <sup>a</sup>	66,29 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>	0 (0/27) <sup>a</sup>
L	22,93 $\pm$ 9,6 <sup>b</sup>	100 (13/13) <sup>b</sup>	63,2 $\pm$ 8,3 <sup>a</sup>	0 (0/14) <sup>a</sup>	57,23 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>	0 (0/8) <sup>a</sup>

a,b Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre os dias de cultivo dentro do mesmo grupo ( $p < 0,01$ ). Valores de p (ANEXO C)

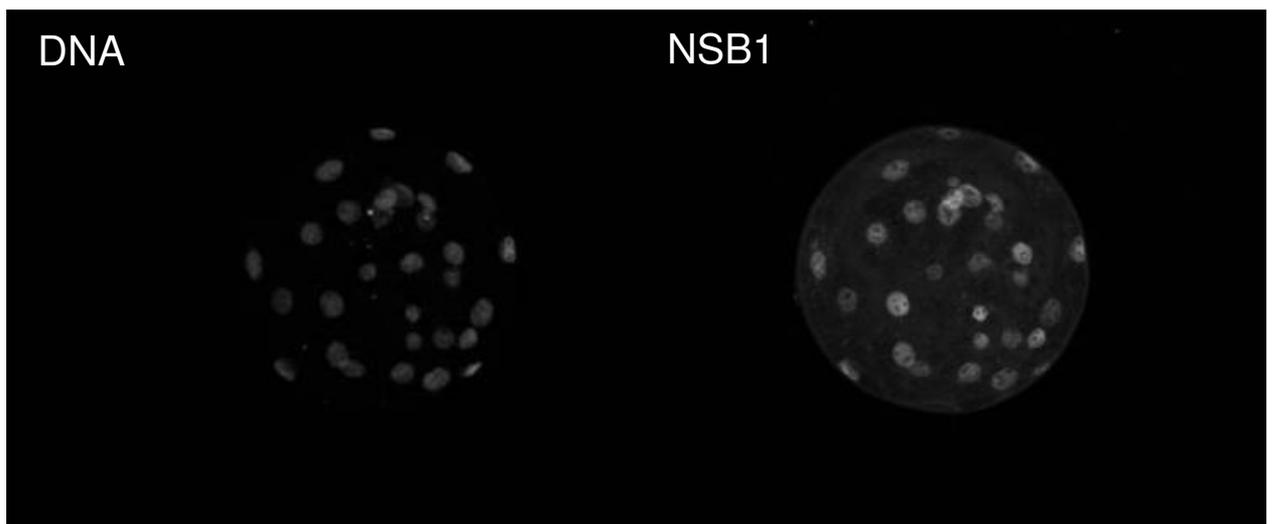


Figura 18 - Imunodeteção de NSB1 em embriões suínos AP do grupo R no D-5. Marcação do DNA com Hoechst<sub>33342</sub> e marcação nuclear da NSB1. Microscopia de Epifluorescência, aumento 200X

#### 8.4.2.2.2 Imunodeteção da RAD52 durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões suínos AP

No D-4 e D-5, a RAD52 foi detectada no citoplasma para ambos os grupos. O grupo lento apresentou uma antecipação da marcação da RAD52 no núcleo no D-5, enquanto que o sinal nuclear para o grupo rápido foi a partir do D-6 (Tabela 9 e Figura 19).

Tabela 9 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) da RAD52 no núcleo e o índice de marcação citoplasmática em embriões suínos AP de clivagem lenta e rápida nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro* - São Paulo – 2007

Dia	D-4		D-5		D-6	
	% sinal nuclear	Sinal citoplasmático	% sinal nuclear	Sinal citoplasmático	% sinal nuclear	Sinal citoplasmático
R	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup> (11/11)	0 <sup>a</sup>	93,31 <sup>a</sup> (12/13)	47,48 $\pm$ 10,3 <sup>b</sup>	37,5 <sup>b</sup> (6/16)
L	0	100 (8/8)	2,7 $\pm$ 2,2	100 (17/17)	-	-

a,b,c Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre os dias de cultivo dentro do mesmo grupo ( $p < 0,001$ ). Valores de p (ANEXO C)

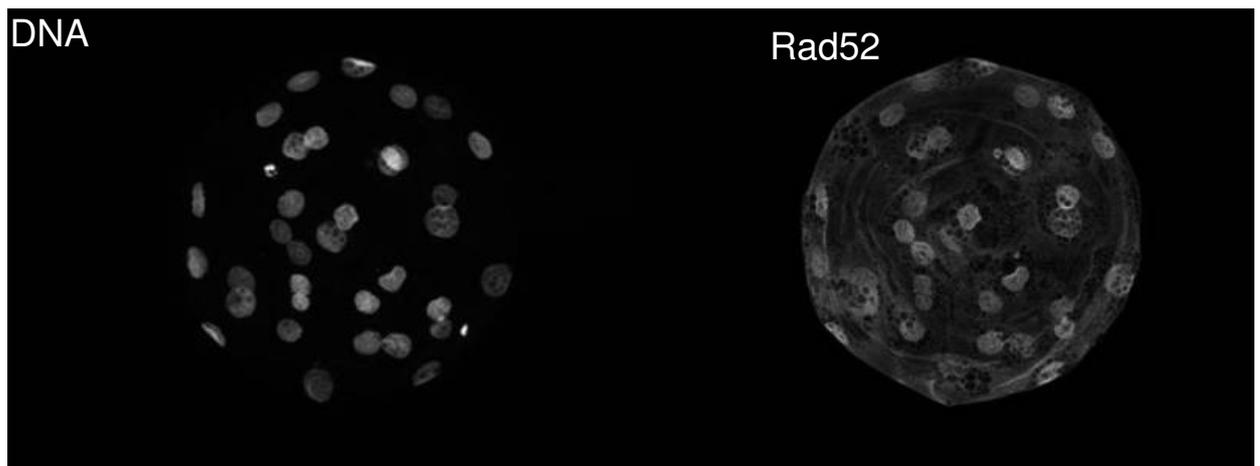


Figura 19 - Imunodeteção de RAD52 em embriões suínos AP no D-6. Marcação do DNA com Hoechst33342 e marcação nuclear da RAD52. Microscopia de Epifluorescência, aumento 200X

## 8.5 CONCLUSÃO

Embriões suínos AP não apresentam atividade de 53BP1 no início do desenvolvimento.

Embriões de diferentes potenciais de desenvolvimento apresentam diferenças quanto a marcação de  $\delta$ H2AX no D5, sendo maior no grupo lento. Há uma diminuição da marcação ao longo do desenvolvimento embrionário inicial.

As proteínas NSB1 e RAD52 apresentaram localização nuclear no D4 e D5, respectivamente, não apresentando diferenças entre os grupos.

## 9 DISCUSSÃO

Embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* apresentam diferenças no potencial de desenvolvimento. A baixa viabilidade embrionária na PIV, particularmente em suínos, está relacionada aos altos índices de polispermia, à qualidade dos oócitos, ao método de produção utilizada (AP, FIV ou TN), bem como produção de meios de sistemas artificiais de CIV inadequados. Estas dificuldades refletidas no potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro* e na taxa de gestação podem ser melhor compreendidas pela caracterização e quantificação da morte celular.

No presente estudo, o uso de oócitos maturados *in vitro* e a produção de embriões pela AP proporcionaram índices de desenvolvimento embrionário satisfatórios, expressos pelos altos índices de maturação, clivagem as 24 e 48 horas de blastocistos. Estes dados corroboram com a literatura na afirmativa de que a PIV de embriões pela AP é um ótimo modelo para estudar os mecanismos biológicos durante a fase de pré-implantação em embriões suínos (OZIL, 1990; JEONG et al., 2005).

Sabe-se que o tempo de clivagem após o início do CIV está altamente relacionado com o potencial de desenvolvimento embrionário, sendo um bom indicador de qualidade embrionária (DOCE et al., 2005; JEONG et al., 2005). Os resultados da primeira fase do experimento concordam com esta afirmação, mostrando que embriões do grupo R (clivados até 24 horas após o início do CIV) foram os que apresentaram melhores índices de desenvolvimento embrionário, expressos pelos altos índices de blastocistos e pelo maior número de células por embriões quando comparado ao grupo lento (clivados entre 24 e 48 horas após início do CIV).

Quanto à classificação embrionária em relação ao tempo de clivagem, a nomenclatura utilizada no presente trabalho foi semelhante à adotada por Dode et al. (2005). Estes autores

adotaram o termo rápido, para embriões bovinos clivados 24-32 horas após a inseminação (hpi) e lentos para os clivados 36-44 hpi. Baseado nestes dados foi possível concluir que embriões classificados como R apresentaram melhor potencial de desenvolvimento embrionário.

Quanto ao número de células observadas em estágios iniciais do desenvolvimento, do D-2 ao D-5 (dados não apresentados), o grupo R4 foi o que apresentou maior quantidade de células, porém no D-6 a média foi igualada ao Grupo R2, permanecendo diferenças apenas entre os grupos R e L. Pode-se concluir que a diferenciação do número de células quanto ao tempo de clivagem requer estágios iniciais de desenvolvimento. Apesar do número de núcleos/blastocistos ser um indicador na seleção entre embriões, os grupos R4 e R2 ou L4 e L2 não apresentaram diferenças quanto ao índice de desenvolvimento no D-6 do CIV.

Quanto a presença da Caspase-3 durante o desenvolvimento embrionário foi detectado sinal de Caspase-3 ativa em estágios iniciais do desenvolvimento a partir do D-1 (dados não apresentados). Provavelmente, a presença desta proteína ativa antes da ativação do genoma embrionário seja de origem oocitária.

A quantificação relativa da Caspase-3 ativa durante o desenvolvimento embrionário, mostrou que no D-2, embriões de melhor potencial de desenvolvimento (R) apresentaram maior quantidade de Caspase-3 do que o grupo L. No D-4, a proporção foi equivalente entre estes dois grupos e no final do CIV (D-6) também não houve diferença entre os grupos R e L. Ao contrário do que era esperado, embriões de melhor qualidade (R) apresentaram aumento da quantidade de Caspases 3 ativa no início do desenvolvimento quando comparados aos embriões de menor potencial de desenvolvimento (L). Porém, pode-se sugerir, que por algum mecanismo ainda não compreendido, a Caspase-3 ativa em embriões suínos AP possa ser degradada entre D2 e o D4, não havendo o efeito biológico final. Esta hipótese pode ser justificada por não ser possível detectar células positivas para o teste TUNEL antes do D-5 de

CIV em embriões suínos (POMAR et al., 2005) e pelo fato da Caspase-3 ativa, neste trabalho, ter sido detectada no núcleo somente no D5 e no D6 do cultivo. Segundo Hanoux et al. (2007), a Caspase-3 após ativação possui meia vida de 24 horas, ou seja, se no início do cultivo a Caspase-3 não fosse degradada, hipótese formulada, esta agiria no núcleo havendo fragmentação de DNA, o que seria detectado pelo teste TUNEL e pela imunocitoquímica. Uma possível diminuição da quantidade de Caspase-3 no D-4 comparado ao D-2, também poderá justificar a degradação desta proteína.

A maior quantidade de Caspase-3 ativa em embriões do grupo R, no período anterior à ativação do genoma, pode ser devido a uma melhor qualidade dos oócitos dos quais foram originados os embriões, mostrando a importância do acúmulo de proteínas e RNAm de origem materna no embrião. Assim, como sugerido por Mourot et al. (2006), um maior estoque de proteínas maternas indica uma maior competência oocitária no desenvolvimento embrionário.

Se há maior quantidade de Caspase-3 ativa ou mesmo Pró-Caspase-3 em oócitos de melhor qualidade; ou ainda uma maior amplificação da resposta da ativação da Caspase-3 em embriões de melhor desenvolvimento, e como e por quê esta caspase é ativada no estágio inicial do desenvolvimento sem a ativação de proteínas responsáveis pela fragmentação do DNA, são perguntas que ainda precisam ser esclarecidas.

É importante salientar que, provavelmente, no D-2 e no D-4 do CIV a quantidade relativa de Caspase-3 seja menor do que no D-6, visto que neste período, a localização desta proteína é apenas citoplasmática no período inicial. Nos D-5 e D-6 do CIV, não houve diferença na quantidade de núcleos positivos para Caspase-3 entre os grupos R e L. Deste modo, um possível aumento da quantidade de Caspase-3 ativa no D6, de ambos os grupos, pode significar uma maior produção de Caspase-3 ativa, que ainda não se ligou ao substrato no núcleo.

Houve um aumento significativo no número de núcleos positivos para Caspase-3 do D5 para o D6, mostrando uma progressão no mecanismo de apoptose durante o final do desenvolvimento embrionário. Hao et al. (2003) também relataram que a incidência de apoptose aumentou com a progressão do CIV do D5 ao D8, detectada pelo teste Tunel.

A identificação de Caspase-3 ativa no citoplasma e posteriormente no núcleo no D-5 e no D6 do CIV é um achado novo que corrobora com os de Hao et al. (2003) na detecção da reação TUNEL positiva em embriões suínos a partir deste mesmo dia. A localização da Caspase-3 no núcleo também confirma os achados de Mao et al. (1998) e Martim et al. (1998) quanto à detecção de Caspases em diferentes compartimentos celulares, sugerindo que estas proteínas não tem localização exclusivamente citoplasmática. Polêmicas quanto à localização do complexo DFF com a migração deste para o núcleo, também contribuem para a localização da Caspase-3 no núcleo; visto que a forma inativa (ICAD) precisa ser clivada pela Caspase-3, para que a forma ativa (CAD) promova condensação e fragmentação nuclear.

A localização nuclear da Caspase-3 somado a diminuição da  $\gamma$ H2AX, no grupo R, a partir do D-5 do CIV, complementa a hipótese formulada por Chang e Yang (2000), na qual mecanismos de reparo de DNA são inativados quando a apoptose é acionada. Outros exemplos adicionais tais como a ativação da HDAC4 e a clivagem da proteína PARP pela Caspase-3 ativa também auxiliam esta justificativa (CHANG; YANG 2000). Deste modo histonas deacetilases compactam a estrutura da cromatina finalizando ou impedindo a associação da cromatina com as proteínas do “check-point” (DOWNS et al., 2007). A clivagem da proteína PARP, proteína nuclear responsável pelos mecanismos de reparo do DNA, também leva a inibição do reparo do DNA.

Pouco se sabe sobre a atividade da Caspase-3 durante o desenvolvimento embrionário. A literatura cita dois papéis da apoptose na fase de pré-implantação, todavia antagônicos. Paula-Lopes e Hansen (2002) destacaram um papel benéfico relacionado principalmente às

situações de estresse nas quais a apoptose auxilia no desenvolvimento embrionário, contribuindo com a resposta adaptativa do embrião às situações adversas. Seguindo esta explicação, estes autores demonstraram que embriões bovinos cultivados *in vitro* com o inibidor z-DEVD-fmk e expostos às condições de estresse térmico apresentavam menor índice de blastocisto quando comparados aos embriões que só foram expostos ao estresse térmico.

O outro papel, descrito por POMAR et al. (2005), refere-se à apoptose como um indicador de redução de índice de desenvolvimento embrionário. Ao compararem embriões oriundos de FIV e TN com embriões produzidos *in vivo*, verificaram aumento da incidência de apoptose detectado pelo teste Tunel e conseqüentemente diminuição dos índices de blastocistos.

O inibidor de Caspase do grupo II foi eficiente na inibição de Caspase-3 ativa, visto que embriões tratados com z-DEVD-fmk no final do desenvolvimento, apresentaram diminuição na quantidade relativa de Caspase-3 ativa, sendo esta similar às amostras negativas no teste de imunocitoquímica.

Durante as 48 horas iniciais do CIV (D0 ao D2), os embriões tratados com inibidor de Caspases apresentaram aumento dos índices de blastocisto. Estes resultados sugerem que o uso do inibidor z-DEVD-fmk, nesta fase de desenvolvimento, pode interferir positivamente no desenvolvimento embrionário. Roth e Hansen (2004) trabalhando com oócitos bovinos maturados *in vitro*, mostraram que os efeitos do estresse térmico podem ser minimizados pelo uso de inibidores de apoptose. Fazendo uma analogia deste estresse com a fase inicial do CIV (estresse fisiológico pela ativação do genoma embrionário), os efeitos deletérios durante a passagem por este período crítico também podem ser mascarados pelo uso de inibidores de Caspases. Devido ao aumento na taxa de blastocisto e não necessariamente do número de células, pode-se sugerir que a inibição do mecanismo de apoptose proporcionou uma maior

reserva de energia que poderá ser melhor aproveitada no reparo do DNA. Sabe-se que os mecanismos de apoptose e reparo do DNA são processos ativos com gasto de energia, que não ocorrem simultaneamente (CHANG; YANG, 2000).

Estudos complementares são necessários para pesquisar a eficácia do mecanismo de reparo do DNA em estágios iniciais do desenvolvimento. Uma abordagem interessante seria a utilização de inibidores de apoptose em estágios mais críticos do desenvolvimento *in vitro* melhorando os índices de blastocistos, implementando os sistemas artificiais de CIV, com a proposta de auxiliar o reparo do DNA.

É importante salientar que o uso de inibidor de Caspase do grupo II, utilizado tanto na maturação como no final do CIV, não afetaram o desenvolvimento embrionário. Entretanto, no grupo de oócitos não tratados (controle) houve uma tendência ( $P=0,07$ ) de maiores índices de blastocistos. Porém, é importante salientar que na MIV só foram utilizados embriões de alto potencial de desenvolvimento, embriões clivados após 24 horas do início do CIV, ou seja, o grupo rápido (R). A tendência à diminuição do desenvolvimento embrionário apresentado no resultado desta etapa, mostra uma pequena participação do mecanismo de apoptose e possivelmente a participação de outros mecanismos regulatórios deste evento durante esta fase do desenvolvimento. É provável que o uso de inibidores em embriões de baixo potencial de desenvolvimento, grupo L, apresente resultados significantes.

Apesar do uso de inibidores de Caspases do grupo II não influenciarem no índice de blastocisto durante o final do CIV, embriões tratados por um intervalo de tempo maior (D4 ao D6) apresentaram, embora não significante ( $P=0,1$ ) aumento no número de células, o que pode ser justificado pela diminuição da indução de apoptose, nestes embriões.

Com relação à influência da apoptose no desenvolvimento embrionário, os resultados obtidos neste experimento mostraram um possível papel deste mecanismo no início do desenvolvimento embrionário. Entretanto, fez-se necessária a investigação de outros

parâmetros também relacionados a este evento. Como descrito na literatura, há uma possível ligação entre a ativação da apoptose e a inibição dos mecanismo de reparo do DNA. Deste modo achou-se relevante também investigar a expressão de proteínas relacionadas ao mecanismo de lesões e reparo do DNA em embriões suínos cultivados *in vitro* (CIV).

Quanto ao tipo de marcação encontrada para  $\gamma$ H2AX, o grupo L apresentou o dobro de pontos isolados no núcleo no D-5 do CIV, em relação ao grupo R. Apesar de não ser significativo ( $p < 0,08$ ), o grupo lento, no D-4, também apresentou um maior número de células marcadas. No D-6, o grupo rápido, apesar de não haver diferença ( $p < 0,77$ ), apresentou maior número de células marcadas para  $\gamma$ H2AX, este resultado pode ser explicado devido ao baixo número de embriões do grupo lento.

Não foram realizados testes complementares para detectar a fase do ciclo celular, descartando possíveis marcações mitóticas; entretanto, a classificação adotada está de acordo com a literatura (MCMANUS; HENDZEL, 2005), sugerindo que pontos maiores em tamanho e número ( $>10$ ) representam as DSBs nas células. O menor número de DSBs podem contribuir no potencial de desenvolvimento dos embriões do grupo R. Esta afirmação pode ser reforçada pela menor permanência destes embriões no ciclo celular, representada pela diminuição antecipada da marcação do  $\gamma$ H2AX do D-6 (grupo L) para o D-5 (grupo R). Outra explicação para a menor sinalização para a indução da apoptose, apesar da quantificação de Caspase-3 ativa não apresentar diferenças entre os grupos no final do desenvolvimento (D-6).

Apesar de não haver estudos que mostrem diferenças de  $\gamma$ H2AX em embriões de diferente potencial de desenvolvimento, os dados apresentados neste trabalho corroboram com (MCMANUS; HENDZEL, 2005) apresentando uma diminuição da marcação de  $\gamma$ H2AX com o avanço do desenvolvimento embrionário na fase inicial (D2-D7 do CIV).

Quanto ao tipo de marcação da 53BP1 em células somáticas, Schutz et al. (2007) mostraram uma marcação nuclear difusa, não associada às quebras do DNA, e uma

aglomeração em pontos isolados de 53BP1 características das DSBs. McManus e Hendzel (2005) relataram o mesmo tipo de padrão de marcação de DSBs para a proteína NSB1.

Durante os dias D-2, D-4 e D-6 de cultivo *in vitro*, o grupo rápido apresentou um aumento na marcação de NSB1, porém não foi diferente do grupo lento ( $P=0,27$  no D-4,  $P=0,17$  no D-5 e  $P=0,37$ ). Entretanto, apesar das células embrionárias estudadas apresentarem positividade para NSB1 e RAD52 não se pode dizer que houve marcação das DSBs, devido a falta da localização nuclear característico de células somáticas com quebras do DNA.

A translocação da proteína do citoplasma para o núcleo, com 100% de sinal nuclear no D-5 do CIV para a NSB1, mostrou que apesar de não haver associação com DSBs, a proteína está presente no seu local de atuação para possíveis reparos. Quanto às causas na falha deste reparo pode-se sugerir: ausências de proteínas iniciadoras do reparo do DNA em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário; ativação do mecanismo de apoptose no D-5 do CIV; exigência de maior quantidade de energia ou ainda ausência de DSBs no modelo utilizado.

Apesar das marcações observadas não serem patognomônicas de lesão e reparo do DNA, embriões dos grupos R e L não apresentaram diferenças quanto à presença de NSB1 e RAD52. Apenas foi detectado que o grupo L apresentou uma maior quantidade de  $\gamma$ H2AX, porém até o momento não há dados suficientes para mostrar que embriões com diferentes potenciais de desenvolvimento apresentam variações nas proteínas de reparo do DNA.

Ainda quanto à 53BP1 não foi detectada marcação em embriões suínos AP em estágios iniciais do desenvolvimento. Além de agir diretamente como um fator de reparo do DNA (SCHULTZ et al., 2000), a 53BP1 tem um papel indireto aumentando a estabilidade da P53.

A ausência da 53BP1 e presença nuclear da Caspase-3 ativa sugerem que embriões suínos AP ativam o mecanismo de apoptose sem a participação da P53. Neste caso, o

mecanismo de apoptose pode ser ativado pelos receptores de membrana (via extracelular) ou ainda pelas alterações morfofuncionais das mitocôndrias (via intracelular).

Deste modo, embriões suínos AP também podem contribuir para a descoberta de novos tratamentos para doenças graves como, por exemplo, o câncer. Visto que a maioria dos tumores malignos ocorre por alterações da função da P53, o que compromete tanto o reparo do DNA como o mecanismo de apoptose, aumentando a resistência das células tumorais aos tratamentos de radioterapia. Deste modo, estudos de quimioterápicos que utilizam o mecanismo de apoptose independente de lesões do DNA podem ser mais relevantes.

Os presentes resultados sugerem que nas condições de CIV utilizadas, a atividade da Caspase-3 interfere no início do desenvolvimento embrionário, com maior importância na fase de ativação do genoma, devido ao aumento da atividade celular durante este estágio. O mecanismo de apoptose parece ter funções diferentes durante a MIV e a CIV, o que precisa ser melhor investigado. Entretanto, a investigação de outras variáveis que possam afetar a função embrionária, como a relação entre o mecanismo de apoptose e o reparo do DNA, poderá fornecer informações adicionais em relação à qualidade embrionária e o potencial de desenvolvimento do embrião.

## 10 CONCLUSÕES GERAIS (MODELO HIPOTÉTICO)

- Embriões do grupo rápido representam o maior grupo de embriões suínos AP, expressos pela alta taxa de clivagem no D-2 do CIV.
- Embriões AP que clivam até 24 horas após o início do CIV, apresentam melhor desenvolvimento embrionário até blastocisto e maior número de células.
- A Caspase-3 ativa tem localização citoplasmática no D-2 e D-4 e localização citoplasmática e nuclear no D-5 e D-6 do cultivo *in vitro*.
- Embriões AP do grupo rápido (R) apresentaram maior quantidade de Caspase-3 ativa do que embriões do grupo lento (L) às 48 horas do início do CIV.
- O uso de inibidores na maturação ou final do CIV não interfere no desenvolvimento de embriões suínos AP, no entanto seu uso nas primeiras 48 horas do CIV aumenta o índice de blastocistos.
- Embriões suínos AP não apresentam atividade de 53BP1 no início do desenvolvimento.
- Embriões de diferentes potenciais de desenvolvimento apresentam diferenças quanto a marcação de  $\delta$ H2AX no D5, sendo maior no grupo lento. Há uma diminuição da marcação ao longo do desenvolvimento embrionário inicial.
- As proteínas NSB1 e RAD52 apresentaram localização nuclear a partir do D4 e D5, respectivamente, não apresentando diferenças entre os grupos.

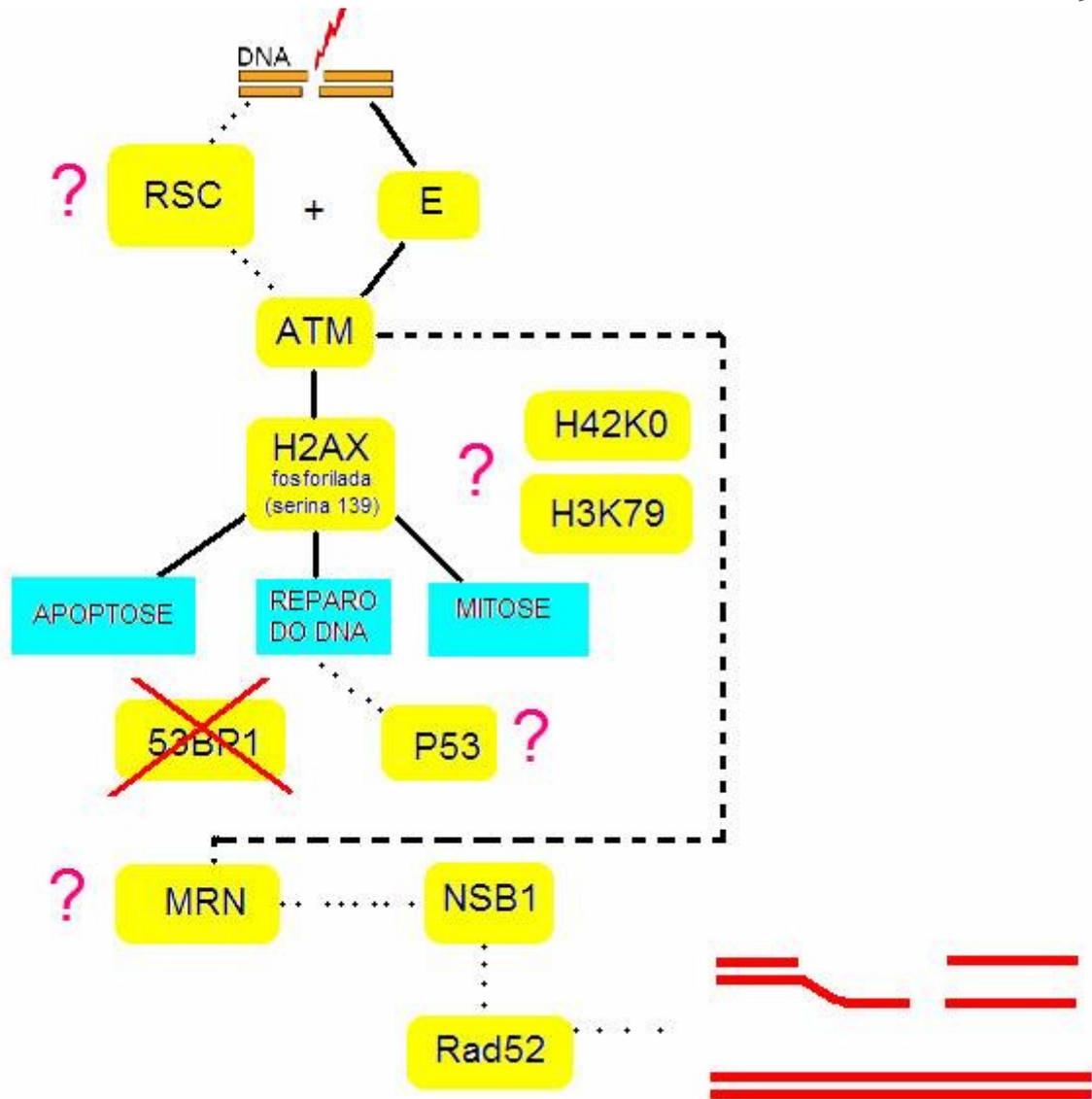


Figura 20 - Modelo hipotético da cascata de ativação do mecanismo de reparo do DNA em embriões suínos AP.

## REFERÊNCIAS

ALBIERI, A.; HOSHIDA, M. S.; GAGIOTI, S. M.; LEANZA, E. C.; ABRAHAMSOHN, I.; CROY, A.; ASHKAR, A. A.; BEVILACQUA, E. Interferon-gamma alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. **Reproduction Biology Endocrinology**, v. 3, p. 34, 2005.

AMEISEN, J. C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a time line of four billion years. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, n. 4, p. 376-393, 2002.

BAGUISI, A.; BEHBOODI, E.; MELICAN, D. T.; POLLOCK, J. S.; DESTREMPES, M. M.; CAMMUSO, C.; WILLIAMS, J. L.; NIMS, S. D.; PORTER, C. A.; MIDURA, P.; PALACIOS, M. J.; AYRES, S. L.; DENNISTRON, R. S.; HAYES, M. L.; ZIOMEK, C. A.; MEADE, H. M.; GODKE, R. A.; GAVIN, W. G.; OVERSTROM, E. W.; ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 456-461, 1999.

BETTS, D. H.; KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 171-191, 2001.

BHOUMIK, A.; TAKAHASHI, S.; BREITWEISER, W.; SHILOH, Y.; JONES, N.; RONAI, Z. ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response. **Molecular Cell**, v. 18, p. 577-587, 2005.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 38-43, 2002.

BORDIGNON, V.; SMITH, L. C. Clonagem animal por transferência nuclear. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, São Paulo: Varela, p. 195-226, 2002.

CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of Caspases. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 64, n.4, p. 821-846, 2000.

CHE, L.; LALONDE, A.; BORDIGNON, V. Chemical activation of parthenogenetic and nuclear transfer porcine oocytes using ionomycin and strontium chloride. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1297-1304, 2007.

COUTINHO, A. R.; MENDES, C. M.; CAETANO, H. V.; NASCIMENTO, A. B.; OLIVEIRA, V. P.; HERNADEZ-BLAZQUEZ, F. J.; SINHORINI, I. L.; VISINTIN, J. A.;

ASSUMPCAO, M. E. Morphological changes in mouse embryos cryopreserved by different techniques. **Microscopy Research and Technology**, v. 70, n. 4, p. 296-301, 2007.

CUELLO-CARRIÓN, F.; CIOCCA, D. R. Improved detection of apoptotic cells using a modified in situ tunel technique. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 837-839, 1999.

DARZYNKIEWICS, Z.; BEDNER, E.; TRAGANOS, F. Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis. **Methods Cell Biology**, v. 63, p. 527-546, 2001

DARZYNKIEWICS, Z.; JUAN, G.; LI, X. F.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry**, v. 27, p. 1-20, 1997.

DEVREKER, F.; HARDY, K. Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos *in vitro*. **Biology Reproduction**, v. 57, p. 921-928. 1997.

DODE, M.A.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M. A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n.3, p. 288-297, 2006.

DOWNNS, J. A.; NUSSENZWEIG, M. C.; NUSSENZWEIG, A. Chromatin dynamics and preservation of genetic information. **Nature**, v. 447, p. 951-958, 2007.

FLORES PÉREZ, F. I. Es la muerte importante para la vida?, **Veterinaria México**, v. 33, n. 2, p. 161-162, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, São Paulo: Varela, p. 195-226, 2002.

GJORRET, J. O.; KNIJN, H. M.; DIELEMAN, S. J.; AVERY, B.; LARSSON, L. I.; MADDOX-HYTTLE, P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1193-1200, 2003.

GRUTTER, M.G. Caspases: key players in programmed cell death. **Current Opinion Structure Biology**, v. 10, n. 6, p. 649-655, 2000.

GUIMARÃES, C. A.; LINDEN R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative death styles. **European Journal Biochemistry**, v. 271, n. 9, p. 1638-1650, 2004.

HANOUX, V.; PAIRAULT, C.; BAKALSKA, M.; HABERT, R.; LIVERA. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 671-681, 2007.

HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis: Programmede cell death in fetal development. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 64, n. 1, p. 129-133, 1996.

HAO, Y; LAI, L.; MAO, J.; IM, G. S.; BONK, A.; PRATHER, R. S. Apoptosis and *in vitro* development of preimplantation porcine embryos devided *in vitro* or by nuclear transefer. **Biology of Reproduction**, v.69, n. 2, p. 501-507, 2003.

HARDY, K.; HANDYSIDE, A. H.; WINSTON, R. M. The human blastocyst: cell number death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. **Development**, v. 107, p. 597-604, 1989.

HEERDE, W. L.; ROBERT-OFFERMAN, S.; DUMONT, E.; HOFSTRA, L.; DOEVENDANS, P. A.; SMITS J. F. M.; DAEMEN, M. J. A. P.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 459-559, 2000.

HORTA, M. F.; YONG, J. D. Apoptose: quando a célula programa a própria morte. **Ciência Hoje**, v. 25, n. 150, p. 38-45, 1999.

HUANG, X.; HALICKA, H.D.; TRAGANOS, F.; TANAKA, T.; KUROSE, A.; DARZYNKIEWICZ Z. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. **Cell Proliferation**, v. 38, n.4, p. 223-243, 2005.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H. G.; KAUTMANN, P. The apoptosis cascade morphological and immunohistochemical methods for its visualization. **Anatomy & Embryology**, v. 200, n. 1, p. 1-18, 1999.

JAROUDI, S.; SENGUPTA, S. DNA repair in mammalian embryos. **Mutation Research**, v. 635, p. 53-57, 2007.

JEONG, Y. J.; CUI, X.,S.; KIM, B. K.; KIM, I. H.; KIM, T.; CHUNG, Y. B.; KIM, N. H. Haploidy influences Bak and Bcl-xL mRNA expression and increases incidence of apoptosis in porcine embryos. **Zygote**. v. 13, n. 1, p. 17-21, 2005.

JURISICOVA, A.; VARMUZA, S.; CASPER, R. F. Programmed cell death and human embryos fragmentation. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, p. 93-98, 1996.

KAIDI, S.; BERNARD, S.; LAMBERT, P.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 4, p. 1127-1234, 1999.

KANO, M.; TAKEMURA, G.; MISAO, J.; HAYAKAWA, Y.; AOYAMA, T.; NISHIGAKI, K.; NODA, T.; FUJIWARA, T.; FUKUDA, K.; MINATOGUCHI, S.; FUJIWARA, H. **Circulation**, v. 99, p. 2757-2764.

KEEFE, D. L.; LIU, L.; TRIMARCHI, J. Nuclear-cytoplasmic interactions determine apoptosis in preimplantation mouse embryos. **Fertility & Sterility**, Supplement 1, v. 72, n. 3, p. 87-88, 1999.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KITAO, H.; YUAN, Z.M. Regulation of ionizing radiation-induced RAD52 nuclear foci formation by c-Abl-mediated phosphorylation. **Journal Biology Chemistry**, v. 277, n.50, p. 48944-48948, 2002.

LABAT-MOLEUR, F.; GUILLERMET, C.; LORIMIER, P.; ROBERT, C.; LANTUEJOL, S.; BRAMBILIA, E.; NEGOESCU, A. Tunel apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 46, n. 3, p. 327-334, 1998.

LEQUARRE, A. S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; BIES-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v. 63, n.3, p. 841-859, 2005.

LOWE, S. W.; RULEY, H. E.; JACKS, T. P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. v. 74, p. 957-967, 1993.

MACHÁTY, Z.; CAY, B. N.; PRATER, R. S. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 451-455, 1998.

MANJO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. **American Journal Pathology**, v. 146, n. 3-16, p. 235-240, 1995.

MARTIN, D. A.; SIEGEL, R. M.; ZHENG, L.; LENARDO, M. J. Membrane oligomerization and cleavage activate the caspase-8 (FLICE/MACH $\alpha$ 1) death signal. **Journal Biology Chemistry**, v. 273, n.8, p. 4345-4349, 1998.

MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovines embryo. **Zygote**, v. 8, p. 57-68, 2000.

MAO, P. L.; JIANG, Y.; WEE, B.Y.; PORTER, A.G. Activation of caspase-1 in the nucleus requires nuclear translocation of pro-caspase-1 mediated by its prodomain. **Journal Biology Chemistry**, v. 273, n. 37, p. 23621-23624, 1998.

MCMANUS, K. J.; HENDZEL, M. J. ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 5013-5025, 2005.

MEIRELLES, F. V. **Ativação do genoma e bloqueio embrionário**. 2004. 90 f. Tese (Livre Docência em Ciências Básicas) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

MELLO, M. R. B. **Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo**. 2003. 82 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression compared with other species. **Zygote**, v. 8, p. 87-96, 2000.

MEN, H.; MONSON, R. L.; PARRISH, J. J.; RUTLEDGE, J. J. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**, v. 47, n. 1, p. 73-81, 2003.

MIYOSHI, K.; RZUCIDLO, S. J.; PRATT, S. L.; STICE, S. L. Utility of rapidly matured oocytes as recipients for production of cloned embryos from somatic cells in the pig. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 540-545, 2002.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n.11, p. 1367-1379, 2006.

ORMEROD, M. G.; SUN, X. M.; SNOWDEN, R. T.; DAVIES, R.; FEARNHEAD, H.; COHEN, G. M. Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes: a flow cytometric study. **Cytometry**, v. 14, n. 6, p. 595-602, 1993.

OTAEGUI, P. J.; O'NEILL, G.T.; WILMUT, I. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by exposure to strontium as a source of cytoplasts for nuclear transfer. **Cloning**, v. 1, n. 2, p. 111-117, 1999.

OZIL, J. P. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. **Development**, v. 109, n. 1, p. 117-127, 1990.

PAMPFER, S. Apoptosi in rodent pré-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophoblast cell lineages – a review. **Placenta**, v. 21, p. S3-S10, 2000.

PAPADOPOULOS, S.; RIZOS, D.; DUFFY, P.; WADE, M.; QUINN, K.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. **Animal Reproduction Science**, v. 74, n. 1-2, p. 35-44, 2002.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryogenesis a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 2, p. 1169-1177, 2002.

PENA, F. J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal Andrology**, v. 28, n. 2, p. 107-114, 2005.

PEREZ, G. I.; ACTON, B. M.; JURISICOVA, A.; PERKINS, G. A.; WHITE, A.; BROWN, J.; TRBOVICH, A. M.; KIM, M. R.; FISSORE, R.; XU, J., AHMADY, A.; D'ESTAING, S. G.; LI, H.; YOKOYAMA, S.; OKADA, H.; MAK, T. W.; ELLISMAN, M. H.; CASPER, R. F.; TILLY, J. L. Genetic variance modifies apoptosis susceptibility in mature oocytes via alterations in DNA repair capacity and mitochondrial ultrastructure. **Cell Death Differentiation**, v. 14, n. 3, p. 524-533, 2007.

POLEJAEVA, I. A.; CHEN, S. H.; VAUGHT, T. D.; PAGE, R. L.; MULLIS, J.; BALL, S.; DAÍ, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D. L.; COLMAN, A.; CAMPBELL, H. S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, v. 407, p. 86-90, 2000.

POMAR, F. J.; TEERDS, K. J.; KIDSON, A.; COLENBRANDER, B.; THARASANIT, T.; AGUILAR, B.; ROELEN, B.A. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2254-2268, 2005.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction Development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Lesão celular e morte celular. **Patologia estrutural e fundamental**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1994. p. 1-29.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1898-1906, 2004.

SCHULTZ, L. B.; CHEHAB, N. H.; MALIKZAY, A.; HALAZONETIS, T. D. P53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 7, p. 1381-1390, -2000.

SPANOS, S.; RICE, S.; KARAGIANNIS, P.; TAYLOR, D.; BECKER, D. L.; WINSTON, R. M. L.; HARDY, K. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 124, n. 3, p. 353-363, 2002.

VERDUN, R. E.; KARLSEDER, J. Replication and protection of telomeres. **Nature**, v. 447, p. 924-931, 2007.

VORONINA, E.; WESSEL, G. M. Apoptosis in Sea Urchin oocytes, eggs and early embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 4, p. 553-561, 2001.

WARD, I. M.; MINN, K.; JORDA, K. G.; CHEN, J. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. **Journal Biology Chemistry**, v. 278, n. 22, p. 19579-19582, 2003.

WILLINGHAM, M. C. Cytochemical methods for detection of apoptosis. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1101-1109, 1999.

WOOD, G. A.; SARMA, D. S. R.; ARCHER, M. C. Resistance to the promotion of glutathione s-transferase 7-7-positive liver lesions in Copenhagen rats. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 7, p. 1169-1175, 1999.

XU, J. X.; CHAN, S. T.; HO, P.; YEUNG, W. S. Y. Coculture of human oviductal cells maintains mitochondrial function and decreases caspase activity of cleavage-stage mouse embryos. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 1, p. 178-183, 2003.

ZHANG, C. L.; WU, L. J.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Oridonin induces apoptosis of HeLa cells via altering expression of Bcl-2/Bax and activating caspase-3/ICAD pathway. **Acta Pharmacology Sin**, v. 25, n. 5, p. 691-698, 2004.

ZHAO, S.; WENG, Y.C.; YUAN, S.S.; LIN, Y.T.; HSU, H.C.; LIN, S.C.; GERBINO, E.; SONG, M.H.; ZDZIENICKA, M.Z.; GATTI, R.A. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 473-477, 2000.

## ANEXOS A:

A) Meio de Maturação *in vitro*: O meio de maturação consistiu de TCM 199 bicarbonato (TCM), suplementado com:

<b>COMPONENTES</b>	<b>Quantidade</b>
FSH	0,5 ug/mL
LH	0,5 ug/mL
EGF	10ng/ mL
Piruvato de Sódio	0,91 mM
D-glicose	3.05 mM
Cisteína	0,1 mg/mL
Gentamicina	50 µg/mL

## ANEXO B:

## B) MEIO DE CULTIVO (PZM-3)

COMPONENTES	PM	PZM-3
NaCl	58,44	108 mM
KCl	74,55	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1	0,35 mM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246,5	0,4 mM
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	25,07 mM
Na-pyruate (Acido Pirúvico)/ C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Na	110,0	0,20 mM
Ca-(lactate) <sub>2</sub> . 5H <sub>2</sub> O	308,3	2 mM
L-Glutamine/ C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146,15	1 mM
Hypotaurine	109,1	5 mM
Basal medium Eagle amino acids (Sigma B6766) / BME		20 ml/L
Minimum essential Medium nonessential amino acids (Sigma M7145) / MEM		10 ml/L
Gentamicin		0,05 mg/ml
Fatty acid-free BSA		3 mg/ml
Osmolaridade		288 mOsm
Ph		7,3 +/- 0,02

ANEXO C:

C) VALORES DE P

**EXPERIMENTO 1: RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE CLIVAGEM E O POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO ATÉ BLASTOCISTO**

Figura 3. Índice de blastocistos e número médio de núcleos por blastocisto no D6 nos diferentes grupos experimentais

Desenvolvimento embrionário	p< 0.0001
Número de núcleos	p<0.0001

**EXPERIMENTO 2: IMUNODETECÇÃO DE CASPASE 3 ATIVA DURANTE DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS AP**

Figura 5. Quantificação relativa de Caspase 3 ativa por densitometria em embriões de desenvolvimento rápido (R) e lento (L)

Quantidade de Casp+ por grupos R e L no D-2	p< 0.0001
Quantidade de Casp+ por grupos R e L no D-4	p=0.068
Quantidade de Casp+ por grupos R e L no D-6	p=0.612

Tabela 2 – Médias ( $\pm$ EP) de caspase 3 ativa nuclear ao longo do cultivo *in vitro*

% núcleos para Casp3+ por grupos no D-5	p=0.167
% núcleos para Casp3+ por grupos no D-6	p=0.186
% núcleos para Casp3+ por dias (D-5 e D-6) no grupo R	p<0.004
% núcleos para Casp3+ por dias (D-5 e D-6) grupo L	p=0.285

### EXPERIMENTO 3: EFEITO DO INIBIDOR DE CASPASE 3 (z-DEVD-fmk) NA MATURAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS AP.

#### 1ª Etapa - Efeito do inibidor z-DEVD-fmk na MIV

Tabela 3 - Médias ( $\pm$ EP) dos índices de maturação, clivagem e desenvolvimento embrionário após a maturação de oócitos suínos na presença ou ausência de inibidor de caspases (z-DEVD-fmk)

% de MII por tratamento (controle x tratado)	p=0.692
% de clivagem no D-1 por tratamento (controle x tratado)	p=0.368
% de clivagem no D-2 por tratamento (controle x tratado)	p=0.389
% de blastocistos no D-6 por tratamento (controle x tratado)	p=0.168
Número de núcleos no D-6 por tratamento (controle x tratado)	p=0.438

2º Etapa - Efeito do Inibidor z-DEVD-fmk no Início do CIV

% clivagem no D-1 por tratamento	p=0.729
% clivagem no D-2 por tratamento	p=0.789

Figura 9 - Índices de blastocisto e número médio de núcleos por blastocistos no D6 em embriões suínos AP, tratados com o inibidor z-DEVD-fmk no início do cultivo *in vitro*

Índice de blastocisto por tratamento	p<0.007
Número de células por tratamento	p=0.348

3º Etapa - Efeito do Inibidor z-DEVD-fmk no Final do CIV

Tabela 4: – Médias ( $\pm$ EP) Número médio de núcleos e índice de desenvolvimento *in vitro* de embriões suínos AP tratados com o inibidor z-DEVD-fmk no final do cultivo *in vitro*

% blastocisto no D-5 por tratamento	p=0.266
% blastocisto no D-6 por tratamento	p=0.955
Número médio de células no D-5 por tratamento	p=0.537
Número médio de células no D-5 por tratamento	p=0.113

Figura 11 - Quantificação relativa de Caspase 3 ativa em embriões suínos AP tratados e não tratados com z-DEVD-fmk

Sinal de fluorescência de Casp3+ por tratamento no D-5	p<0.0001
Sinal de fluorescência de Casp3+ por tratamento no D-6	P<0.0001

**EXPERIMENTO 4: IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS DE LESÃO E REPARO DO DNA NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS AP**

Tabela 5 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) de núcleos marcados para  $\delta$ H2AX em embriões suínos AP de clivagem lenta e rápida nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro*

% núcleos + para $\delta$ H2AX por grupos no D-4	p=0.087
% núcleos + para $\delta$ H2AX por grupos no D-5	p=0.021
% núcleos + para $\delta$ H2AX por grupos no D-6	p=0.776

Tabela 6 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) do número de pontos de  $\delta$ H2AX pelo número total de células nos D-4, D-5 e D-6 de CIV

% núcleos com pontos >10 pelo número de núcleos por grupo no D-4	p= 0.85
% núcleos com pontos <10 pelo número de núcleos por grupo no D-4	p= 0.68
% núcleos com pontos >10 pelo número de núcleos por grupo no D-5	p<0.05 (p=0.018)
% núcleos com pontos <10 pelo número de núcleos por grupo no D-4	p=0.284
% núcleos com pontos >10 pelo número de núcleos por grupo no D-6	p=0.723
% núcleos com pontos <10 pelo número de núcleos por grupo no D-6	p=0.358

Tabela 7 - Porcentagem da média ( $\pm$  EP) das diferentes proteínas de reparo de DNA no núcleo e índice de marcação citoplasmática em embriões suínos AP nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro*

% núcleo positivo para NSB1 por dia	p<0.0001
Sinal citoplasmático para NSB1 por dia	p<0.0001
% núcleo positivo para Rad52 por dia	p<0.0001
Sinal citoplasmático para Rad52 por dia	p<0.0001

Tabela 8 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) da NSB1 no núcleo e o índice de marcação citoplasmática em embriões suínos AP de clivagem lenta e rápida nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro*

% núcleo positivo para NSB1 por grupo no D-4	p=0.270
% núcleo positivo para NSB1 por grupo no D-5	p=0.176
% núcleo positivo para NSB1 por grupo no D-6	p=0.378
% de núcleo positivo para NSB1 por dia no grupo L	p<0.005 (p= 0.0042)
% de núcleo positivo para NSB1 por dia no grupo R	p<0.0001
Sinal citoplasmático da NSB1 por grupo no D-4	p=0
Sinal citoplasmático da NSB1 por grupo no D-5	p=0
Sinal citoplasmático da NSB1 por grupo no D-6	p=0
Sinal citoplasmático da NSB1 por dia no grupo L	p<0.0001
Sinal citoplasmático da NSB1 por dia no grupo R	p<0.0001

Tabela 9 – Porcentagem da média ( $\pm$  EP) da Rad52 no núcleo e o índice de marcação citoplasmática em embriões suínos AP de clivagem lenta e rápida nos D-4, D-5 e D-6 do cultivo *in vitro*

% núcleo positivo para Rad52 por grupo no D-4	p=0
% núcleo positivo para Rad52 por grupo no D-5	p=0.176
% núcleo positivo para Rad52 por dia no grupo L (D-4 e D-5)	p=0.360
% núcleo positivo para Rad52 por dia no grupo R (D-4 a D-6)	p<0.0001
Sinal citoplasmático da Rad52 por dia no grupo R	p<0.0001
Sinal citoplasmático da Rad52 por dia no grupo L	p=0.319
Sinal citoplasmático da Rad52 por grupo no D-4	p=0
Sinal citoplasmático da Rad52 por grupo no D-5	p=0.190

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)