UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LÍGIA GARCIA MESQUITA

**“INFLUÊNCIA DA DEPLEÇÃO E SUPLEMENTAÇÃO
MITOCONDRIAL NO PROCESSO DE APOPTOSE EMBRIONÁRIA”**

Pirassununga

2010

LÍGIA GARCIA MESQUITA

**“INFLUÊNCIA DA DEPLEÇÃO E SUPLEMENTAÇÃO
MITOCONDRIAL NO PROCESSO DE APOPTOSE
EMBRIONÁRIA”**

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

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.
Co-orientador: Prof. Dr. Lawrence Charles Smith.

Pirassununga

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

M582i Mesquita, Lígia Garcia
Influência da depleção e suplementação mitocondrial
no processo de apoptose embrionária / Lígia Garcia
Mesquita. -- Pirassununga, 2010.
102 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

1. Bovinos 2. Mitocôndria 3. Apoptose
4. Suplementação 5. Depleção 6. Zigotos. I. Título.

"O que chamamos de inspiração é a capacidade de reter e ampliar, com um toque próprio e único, um flash ou insight, uma coisinha de nada que atravessa o nosso pensamento e pode fugir. Porém, boa parte dessa inspiração é fruto da nossa capacidade de concentração, de disciplina, de esforço mental e até de teimosia. Precisamos não de um dia bonito de céu azul, mas de uma boa dose de paciência para produzir alguma coisa interessante, para organizar raciocínios, transformar barro em tijolos e tijolos em casas."

Maria Ester de Freitas

"O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano"

Isaac Newton

"A cada dia que vivo, mais me convenço que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando do sofrimento, perdemos também a felicidade"

Carlos Drummond de Andrade

Dedico:

Aos meus amados pais, **Carlos e Cidinha**, por nunca permitirem que eu desista de meus sonhos, por não me deixarem enfraquecer diante dos obstáculos encontrados, pelo amor incondicional, pela imensa sabedoria nos ensinamentos da vida e paciência. Amo vocês!

*Aos meus amados irmãos,
Cíntia, Kátia e Carlos Eduardo pelo
amor, paciência, atenção e torcida!*

*A minha avó, **Augusta** pela
acreditar em mim e pelas rezas e
amor infinito.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder vida, por me dar a chance de estudar a vida, por me fazer feliz nesta vida.

À minha família..amo muito vocês!

Aos meus pais, **Carlos e Cidinha**, meus “ouro de mina” sempre presentes em cada momento dessa longa caminhada, pelo suporte incondicional em todos os campos da minha vida. Esta vitória também é de vocês!!!

À minhas irmãs **Cíntia e Kátia** e meu irmão **Dudu**, pedaços de meu coração, grandes doadores de amor incondicional.

Aos meus tios **Tadeu e Teresa**, as minhas primas **Débora e Vanessa** pela torcida constante e por acreditarem em mim.

Aos meus sobrinhos **Thales, Guilherme e Rafael**, pela alegria que trazem em minha vida, pela crença em mim e no meu trabalho e por compreenderem longos períodos de ausência.

Aos meus cunhados **Téo, Vado e Fabi**, por completarem a minha vida

Aos meus avós falecidos, **Lucinda, Salvador e Serafim**, meus anjos da guarda que me guiam em todos os meus caminhos, que me ajudam a conseguir tudo que desejo e a minha avó Nini, que com suas preces, faz com que eu consiga tudo que almejo em minha vida.

Ao meu namorado **Neto**, por me dar paz e tranquilidade para completar esta longa jornada, pelo carinho e dedicação, por me fazer uma pessoa mais feliz e melhor por estar ao seu lado todos os dias.

À família **Pereira de Godoy**, por me acolherem, pelo carinho nos momentos de ausência de minha família.

A minha grande companheira **Sol**, que apesar de não entender os grandes momentos de solidão em nossa casa, sempre está disposta a me dar amor e trazer felicidade.

Ao meu irmãozinho **Pedro (Pedrinho)** pelo imenso carinho em todos os momentos da minha vida aqui em Pirassununga, pela dedicação e imensa amizade.

Ao amigo **Dr. Paulo Adona (Paul)** que sempre com suas poucas palavras falava muito..rs..pelo apoio científico e emocional, pelo companheirismo, amizade..você faz muita falta meu amigo!

Aos amigos **Paula e Sancho**, que mesmo longe me suportavam ao telefone com conversas ora científicas ora para desabafo (na maior parte das vezes, não é?), adoro muitão vocês e obrigada pelo carinho.

Aos amigos **Tiago e Fabiana (Martini)** pelo carinho e atenção e imensa disponibilidade em me ajudar sempre.

A amiga **Kátia**, pelo zelo e grande carinho, por acreditar em mim e em meu trabalho.

Ao amigo **Juliano**, por me ajudar e participar da “balada da mitocôndria”, pelo carinho e disposição em me ajudar.

A amiga **Lindsay**, que depois de muitos “ôis”, se tornou a frozita..obrigada pela amizade, pelo carinho e força.

A minha amiga e teacher **Patrícia (Pati)**, pelo carinho, compreensão, companheirismo e paciência pelos muitos momentos de ausência, e que ainda teve que participar diretamente desta tese, me levando para Ribeirão para fazer minhas análises.

As minhas eternas amigonas **Marcella Millazzoto (Maza) e Paula Lopes** pela eterna confiança em meu trabalho e em mim, pelo amor e amizade mesmo com a distância que nos separa, além de estarem presentes em todas as fases de minha vida.

Ao amigo **Rodrigo Barreto**, pela ajuda na organização deste trabalho.

Aos amigos, **Angélica, Rodrigo (Bixo), Paulinho, Zé Rodrigo, Lucas (Clodô), Simprão, Luciano, Lindsay, Roberta, Naiara, Natália e Paty** pela força e pelo carinho.

Ao amigo **Hernan**, pelo carinho e por participar de muitos momentos de alegria durante este doutorado.

A amiga **Tânia Godoy**, pelas correções na qualificação e pela amizade.

Aos amigos **Osni e Fábria**, pela grande torcida e carinho e pelo imenso zelo comigo. Muito obrigada mesmo!

A amiga **Profa. Dra. Flávia Verechia**, pelo carinho e pela ajuda no concurso que me trouxe grande experiência na minha vida.

Ao amigo **Prof. Dr. Heidge Fukumasu**, pela humildade e disponibilidade em me ajudar, pela força na parte das análises de tempo real quando muitas vezes eu não acreditava que funcionaria e pela ajuda na análise dos dados.

A amiga **Profa Dra. Cláudia Lima Verde Leal**, grande amiga e minha futura supervisora, que com sua humildade, transmite seu infinito conhecimento. Muito obrigada pela disponibilidade, pelo carinho e atenção.

Ao Prof. **Dr. Felipe Perecin**, que digo com todas as letras que este trabalho é meu e seu, já que sem você este trabalho não teria sido feito. Muito obrigada pela disponibilidade em me ajudar nas infinitas noites de manipulação de oócitos e pela ajuda na qualificação e análise estatística. Muito obrigada mesmo.

A **Dra. Simone Méo** pelas importantes sugestões e idéias na qualificação.

A **Giovana** pela ajuda, apoio na aprendizagem e execução das técnicas laboratoriais.

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

Ao **Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles** pela orientação, ensinamentos e estímulo ao meu amor a ciência e pesquisa nestes 6 anos de convivência. Muito Obrigada!

Ao **Prof. Dr. Lawrence Charles Smith**, pela orientação e discussões neste trabalho.

A todos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Morfo-fisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e Histologia Animal, **Adriana K. Tarouco, Alexandre Barreto, Aline S. M. César, Andrea B. V. José, Christina R. Ferreira, Carlos Eduardo Ambrósio, Cláudia L. V. Leal, Fabiana Bressan, Felipe C. Braga, Flávia Verechia, Flávio P. Júnior,**

Giovana K. F. Merighe, Gisele Z. Mingotti, Helena J. Alves, Isabele P. Emanuelli, Kátia L. Schwartz, Lindsay Gimenes, Luciano Remy, Minos E. de Carvalho, Marcos Roberto Chiaratti, Moysés S. Miranda, Nilton P. dos Santos, Paula Ripamonte Figueiredo, Paulo Adona, Paulo Sergio Monzani, Pedro Ratto, Raquel Z. Puelker, Renata Camila Cabral, Rodrigo Barreto, Silvia F. Carambula, Sylvia S. Cortezzi e Tiago H. C. de Bem e às estagiárias Pati (Rosa) e Babi. Agradeço pela contribuição que fizeram em minha vida científica e pessoal.

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

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos**, por proporcionar a realização do Doutorado e pela oportunidade na atividade discente durante o doutoramento.

A **todas as pessoas** que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste trabalho, meu sincero agradecimento. Durante o doutoramento obtive muitas realizações científicas e pessoais, onde acredito que pude superar todos os obstáculos encontrados e aprendi muito com eles. Nesta longa trilha, agradeço as minhas amizades, que me ensinaram a conhecer e conviver com pessoas diferentes, com os acontecimentos desfavoráveis, que me deram força, coragem e determinação para lutar, todos os dias, por meus objetivos e por tudo aquilo que acredito.

RESUMO

Estudos realizados com zigotos bovinos submetidos a uma diminuição de cerca de 50% do conteúdo mitocondrial não apresentaram efeito deletério ao desenvolvimento embrionário in vitro. Este modelo foi desenvolvido pela centrifugação de zigotos após a fecundação in vitro (FIV), retirada do extrato citoplasmático rico em mitocôndrias (ECRM) e posterior introdução de 20-30% de ooplasto (FERREIRA, 2006). Sabendo-se que esse modelo biológico permite o desenvolvimento embrionário em condição de depleção mitocondrial, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da remoção e da suplementação mitocondrial em estágio de zigoto visando compreender a importância da organela no processo de desenvolvimento e morte celular programada (MCP). Este trabalho descreve a transferência de mitocôndrias entre zigotos bovinos. Para tanto, foi desenvolvido um sistema de reconstrução de embriões bovinos capaz de gerar indivíduos depletados e suplementados de mitocôndrias. O extrato citoplasmático rico em mitocôndrias (ECRM) dos zigotos centrifugados foi retirado do oócito doador, para gerar um zigoto depletado (D). Posteriormente, foi retirado um volume citoplasmático de aproximadamente 7,1% para gerar um embrião receptor. Com a quantidade retirada do zigoto depletado (doadores), foi realizada a suplementação de zigotos biopsados (receptores), formando assim, o grupo suplementado (S). A depleção mitocondrial causou uma diminuição na quantidade de DNAm_t que foi recuperada antes das 72 horas de cultivo possivelmente, devido a um aumento na expressão de mtTFA. Os genes anti-apoptóticos BCL₂ e PI3K tiveram sua expressão aumentada nos embriões depletados. A suplementação e depleção mitocondrial resultaram em uma diminuição na taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de 8 células e na formação de blastocistos. A técnica suplementação mitocondrial por meio de micromanipulação não apresentou efeito sobre a quantidade de DNAm_t e atividade mitocondrial estimada pelo potencial de membrana interna mitocondrial (Ψ_{mm}), apresentando um aumento no Ψ_{mm} apenas às 168 horas em consequência do aumento da expressão de COXI e mtTFA. A suplementação e a depleção geraram efeitos negativos na quantidade de núcleos totais e os embriões suplementados apresentaram uma maior taxa de fragmentação de núcleos provavelmente, por um desbalanço de fatores pró e anti-apoptóticos.

Palavras-chave: apoptose, bovinos, depleção, mitocôndria, suplementação e zigotos.

ABSTRACT

Studies developed with bovine zygotes submitted to a decrease of about 50% of the mitochondrial content did not present a deleterious effect on in vitro embryonic development. This model was developed by the centrifugation of zygotes after in vitro fertilization (IVF), removal of the mitochondria enriched cytoplasm fraction (MECF) and posterior introduction of 20-30% ooplasm (FERREIRA, 2006). Knowing that this biological model allows the development of embryos with mitochondrial depletion, the objective of this study was to evaluate the effect of the mitochondrial removal and supplementation in zygotes aiming to understand the organelle importance in the development and programmed cellular death process (PCD). Therefore, we developed a reconstruction model capable to generate mitochondrial depleted and supplemented embryos. The MECF of the centrifuged zygotes was removed from the donor's oocyte (depleted group-D). To prepare the supplemented group (S), a biopsy of approximately 7.1% of the cytoplasm was removed from the recipient zygote for the supplementation with MECF derived from the donor. Mitochondrial depletion caused a decrease of DNAm amount that was replenished before 72 hours possibly due to an increase of mtTFA, BCL₂ and PI3K expression and no effects in Ψ_{mm} . The technique of mitochondrial supplementation by micromanipulation showed no effect on the mitochondria DNA amount and activity estimated by mitochondrial membrane potential (Ψ_{mm}). The Ψ_{mm} increased at 168ha in consequence of an increase in COXI and mtTFA expression. Mitochondrial depletion and supplementation caused a decrease in embryonic development in the 8-cells stage, on blastocyst production and total cell number. The supplementation resulted in increased rates of fragmented nuclei possibly due to an imbalance between pro- and anti-apoptotic factors.

Keywords: apoptosis, bovine, depletion, mitochondria, supplementation and zygotes.

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1: Representação estágio específica de células TUNEL positivas de embriões bovinos produzidos in vitro em diferentes estágios de desenvolvimento (adaptado Gjorret, 2003) 8

Figura II.2: Via metabólica da proteína PI3K..... 11

Figura II.3: Resumo das vias apoptóticas e dos genes estudados neste trabalho. A via extrínseca ocorre através de receptores de morte como o receptor Fas, que se liga ao FADD, o qual ativa a caspase 8, que pode diretamente ou via mitocondrial ativar a caspase 3, levando a célula ao processo de morte. Na via intrínseca ocorre uma translocação de proteínas pró-apoptóticas do citosol para mitocôndria, resultando na liberação de citocromo c, que por sua vez, liga-se ao fator ativador da apoptose-1 (APAF-1) que ativa a caspase 9. Esta cliva e ativa uma cascata de caspases efetoras como a caspase 3. A proporção celular de fatores anti (BCL₂) e pró-apoptóticos (BAX) determinarão destino da célula. ITM2B tem seu mecanismo de ação no complexo poro de transição de permeabilidade, interagindo com canal iônico dependente de voltagem, levando à perda do potencial de membrana mitocondrial e à liberação de citocromo C, ativando consequentemente as caspase 9 e caspase 3 durante o processo de apoptose. Peroxirredoxinas (PRDXs) são enzimas antioxidantes capazes de reduzir peróxidos de hidrogênio, inibindo a apoptose celular. Fatores de crescimento utilizam a via PI3K-proteína quinase B (PKB) para neutralizar a MCP, já que a PKB interfere na expressão com o ligante de Fas e impede o início do processo de morte, impedindo a ativação da caspase 9, fosforilando BAd e ativando um fator nuclear Kb..... 13

Figura III.1: A PIV foi realizada mediante maturação (MIV) durante 18 horas de oócitos colhidos de ovários de vacas abatidas e em seguida foi realizada a seleção de 1^o corpúsculo polar. A ativação partenogenética foi realizada 26 horas após maturação seguida de centrifugação e microcirurgia. Os zigotos foram divididos em 4 tempos conforme o término da confirmação de fusão do grupo suplementado. Nos tempos de 0, 3 e 72 horas após a fusão, os embriões foram submetidos à coloração pelo mitotracker red ou foram congelados para a realização da técnica de PCR em tempo real. Às 72 horas, foi analisado a taxa de clivagem e 8 células nos diferentes grupos. Às 168 horas, foi realizada a análise de desenvolvimento, e coloração pelo mitotracker red ou TUNEL. Finalmente, parte foi congelada para a realização da técnica de PCR em tempo real 21

Figura IV.1: Grupos experimentais: Os grupos experimentais delineados foram: GRUPO CONTROLE (grupo sem centrifugação e manipulação), GRUPO CONTROLE ASPIRADO (grupo submetido à manipulação sendo retirado uma biópsia de aproximadamente 7,8% do ooplasma), GRUPO CONTROLE CENTRIFUGADO (grupo submetido apenas à centrifugação), GRUPO SUPLEMENTADO (grupo no qual é retirada uma biópsia de aproximadamente 7,8%

do ooplasma para que, este receba o ECRM do grupo depletado) e GRUPO DEPLETADO (grupo submetido à retirada do ECRM) 26

Figura IV.2: Montagem das lâminas para avaliação em microscopia confocal nos tempos de 0 e 3 horas. O zigoto depletado, suplementado e a respectiva biópsia (*obtida do grupo suplementado) foram montados na mesma lâmina; o grupo controle aspirado foi montado o zigoto que sofreu a retirada da biópsia com sua respectiva biópsia e os controles e controles centrifugados foram montados em grupos para a análise em microscopia de confocal 29

Figura IV.3: Esquema da técnica de TUNEL. Quando há a quebra do DNA nas regiões internucleossômicas, evento resultante do processo de apoptose, há exposição dos radicais 3'-OH. A enzima terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) catalisa a polimerização da extremidade 3', da união das caudas poli A com o conjugado fluorescente (FITC) e cauda poli-U, o qual mostrará a fluorescência das quebras das fitas de DNA 30

Figura IV.4: Curva padrão de amplificação para o gene GAPDH, por PCR em tempo real para zigotos em diluições seriadas de 1:4 35

Figura IV.5: Em A e B: Cálculo de eficiência dos genes COX e GAPDH baseado no *slope*. C: Diferença de CT dos dois genes em estudo para a validação da comparação relativa entre ambos..... 36

Figura IV.6: Curva padrão de amplificação para a quantificação de DNAm por PCR em tempo real em diluições seriadas de 10^3 a 10^7 38

Figura V.1. Zigotos com 0 hora, 3,72 e 168 horas de desenvolvimento corados com $0,5\mu\text{M}$ do corante *MitoTracker red® CMXRos* por 30 minutos, fixados e analisados por microscopia confocal. (A) Zigoto controle; (B) Zigoto Controle Centrifugado; (C) Zigoto controle aspirado; (D) Zigoto depletado submetido à centrifugação e retirada do ECRM (zigoto doador) e (E) Zigoto suplementado submetido à retirada de uma biópsia de aproximadamente 7,8% de citoplasma do zigoto e suplementado com o ECRM oriundo do doador (zigoto receptor). A barra em (A) equivale a $75\mu\text{m}$ 46

Figura V.2. Densidades normalizadas da fluorescência do MitoTracker red ® (indicativo de potencial de membrana mitocondrial) em relação ao controle 0 hora de cada repetição dos tratamentos controle, controle centrifugado, controle aspirado, depletado e suplementado. ^{A-B-C} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p<0,05$). ^{a-b-c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p<0,05$)..... 47

Figura V.3. Zigotos controles corados com 0,5 μ M do corante *MitoTracker red® CMXRos* por 30 minutos, fixados e analisados por microscopia confocal. (A) Zigoto controle aspirado com 0 hora; (B) Biópsia retirada do controle aspirado (aproximadamente 7,8% de citoplasma do zigoto) com 0 hora; (C) Zigoto controle aspirado com 3 horas; (D) Biópsia retirada do controle aspirado (aproximadamente 7,8% de citoplasma do zigoto) com 3 horas. A barra em (A) equivale a 75 μ m.....49

Figura V.4: Fotomicrografia de epifluorescência de embriões com 168 horas submetidos à técnica de TUNEL. Na coluna da esquerda (A) coloração pelo Hoechst 33342 e na coluna da direita (B), coloração com FITC (nucleotídeo marcado), respectivamente: controle positivo; controle negativo; amostra controle (sem tratamento); grupo controle aspirado; grupo controle centrifugado; grupo depletado e grupo suplementado. Nas setas, as células que fluorescem verde pela incorporação do nucleotídeo marcado com o corante FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma é *background*.54

Figura V.5: Quantidade relativa e desvio padrão de DNAm_t em relação ao grupo controle no tempo 0 hora estimado pelo PCR em tempo real. As barras de erro na coluna de controle indicam variações entre os embriões de cada repetição. ^{A-B-C} Letras diferentes na no mesmo tempo apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). 1u.a corresponde a 1.166.232,06 cópias de DNAm_t55

Figura V.6: Quantidade relativa e desvio padrão dos genes mtTFA, NRF-1 e COXI em relação ao grupo controle de cada tempo (0, 72 e 168 horas) estimado pelo PCR em tempo real. As barras de desvio na coluna de controle indicam variações entre os embriões de cada repetição. ^{A-B-C} Letras diferentes dentro do mesmo tempo apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)59

Figura V.7: Quantidade relativa e desvio padrão dos genes BAX, BCL e a relação entre eles em relação ao grupo controle de cada tempo (0, 72 e 168 horas) estimado pelo PCR em tempo real. As barras de desvio na coluna de controle indicam variações entre os embriões de cada repetição. ^{A-B-C} Letras diferentes dentro do mesmo tempo apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)60

Figura V.8: Quantidade relativa e desvio padrão dos genes PRDX1, ITM2B e PI3K e a relação entre eles em relação ao grupo controle de cada tempo (0, 72 e 168 horas) estimado pelo PCR em tempo real. As barras de desvio na coluna de controle indicam variações entre os embriões de cada repetição. ^{A-B-C} Letras diferentes dentro do mesmo tempo apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)61

LISTA DE TABELAS

Tabela IV.1: Média do diâmetro do zigoto (Dz), volume da biópsia (Vb) e volume de zigoto (Vz) e porcentagem média do volume retirado nos grupos suplementado e controle aspirado	27
Tabela IV.2. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas para quantificação relativa dos genes relacionados com a morte celular programada.....	33
Tabela IV.3. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas para quantificação relativa dos genes relacionados com a morte celular programada.....	34
Tabela V.1: Números, médias (%) e erros padrão da média dos tratamentos controle (C), controle centrifugado (CC), controle aspirado (Ca), depletado (D) e suplementado (S) dos embriões clivados e com 8 células as 72h.....	41
Tabela V.2: Números, médias (%) e erros padrão da média dos tratamentos controle (C), controle centrifugado (CC), controle aspirado (Ca), depletado (D) e suplementado (S) para as taxas de blastocisto com 168 h cultivados em meio SOF.....	44
Tabela V.3: Porcentagem média das densidades integradas e erro padrão da porcentagem média da fluorescência do MitoTracker red ® (indicativo de potencial de membrana mitocondrial) dos tratamentos controle aspirado e sua respectiva biópsia e biópsia retirada do tratamento suplementado.....	48
Tabela V.4: Fragmentação nuclear estimada pelo TUNEL	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1°CP	1° corpúsculo polar.
6-DMAP	6-dimetilaminopurina
ADP	adenosina difosfato
AIF	fator indutor de apoptose
APAF-1	fator ativador da apoptose-1
ATP	adenosina trifosfato
Bad	Bcl-xL/BCL ₂ promotor associado a apoptose
BCL-2	B cell leukemia/lymphoma 2
BH3	Binding hydrophobic 3
BSA	albumina sérica bovina
C	zigotos ativados partenogeneticamente
Ca	zigotos aspirados
CARD	domínio de recrutamento de caspases
C_b	comprimento da biópsia
CC	zigotos centrifugados
COCs	complexos cumulus oophorus
COX I	citocromo c oxidase I
D	Grupo depletado
D_b	diâmetro da biópsia
DEPC	Dimetil pirocarbonato
Diablo	proteína de Ligação-IAP Direta com baixo pI
DNAMt	DNA mitocondrial
D_z	diâmetro do zigoto
ECRM	extrato citoplasmático rico em mitocôndrias
EROs	espécies reativas de oxigênio
FADD	cadeia de morte associada ao Fas
Fas-L	ligante-Fas
FIV	fecundação in vitro
FTN	fator de necrose tumoral
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

hpi	horas pós-inseminação
ITM2B	Proteína Integral de Membrana 2B
kB	Kilo bases
MCP	morte celular programada
NRF-1	Fator nuclear respiratório-1
OXPHOS	fosforilação oxidativa
PBS	solução salina fosfatada
PI3Ks	Fosfoinosítídeo 3-Kinases
PI3KAC	fosfatidilinositol 3 quinase AC
PIV	Produção in vitro
PKB	PI3K-proteína quinase B
PRDXs	Peroxirredoxinas
PtdIns	L- α -fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PVP	polivinil-pirrolidona
Redox	estado de óxido-redução
RNA_m	RNA mensageiro
S	Grupo suplementado
SSB	<i>Single strand binding protein</i>
SFB	Soro fetal bovino
Smac	segundo ativador mitocondrial de caspase
TdT	terminal desoxynucleotidyl transferase
mtTFA	Fator de transcrição mitocondrial A
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial A
TMZ	transição materno zigótica
TPx	tioredoxinas peroxidases
TUNEL	Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling
V_b	volume das biópsias
V_z	volume dos zigotos
Ψ_{mm}	potencial de membrana interna mitocondrial

SUMÁRIO

<i>Resumo</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>ii</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>vii</i>
<i>Lista de abreviaturas e siglas</i>	<i>viii</i>
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	1
1. <i>Introdução</i>	2
1.1. <i>Justificativa</i>	3
1.2. <i>Hipótese</i>	3
1.3. <i>Objetivos</i>	4
1.3.1. <i>Objetivo Geral</i>	4
1.3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	4
CAPÍTULO II: REVISÃO DE LITERATURA	5
2. <i>Revisão de Literatura</i>	6
2.1. <i>Morte celular programada</i>	6
2.1.1. <i>Morte celular programada em embriões</i>	7
2.1.2. <i>Controle genético da apoptose</i>	9
2.2. <i>Mitocôndria</i>	14
2.3. <i>Potencial de membrana mitocondrial (Ψ_{mm})</i>	18
CAPÍTULO III: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
3. <i>Delineamento Experimental</i>	21
CAPÍTULO IV: MATERIAL E MÉTODOS	22
4. <i>Material e Métodos</i>	23
4.1. <i>Local de experimento</i>	23
4.2. <i>Produção in vitro de embriões bovinos (PIV)</i>	23
4.2.1. <i>Coleta e seleção dos oócitos</i>	23
4.2.2. <i>Maturação in vitro</i>	23
4.2.3. <i>Retirada do cumulus oophorus e seleção do 1º corpúsculo polar dos oócitos bovinos</i>	24
4.2.4. <i>Ativação Partenogenética</i>	24
4.2.5. <i>Microcirurgia</i>	25
4.2.6. <i>Cultivo in vitro</i>	27
4.3. <i>Técnicas utilizadas</i>	28
4.3.1. <i>MitoTracker red®</i>	28

4.3.2. TUNEL (<i>Terminal transferase mediated uracil nick end labeling</i>)	30
4.3.3. <i>Avaliação quantitativa de transcritos</i>	31
4.3.3.1. Extração do RNA total pelo método de trizol.....	31
4.3.3.2 Transcrição reversa.....	32
4.3.3.3 Pré-amplificação do cDNA.....	32
4.3.3.4. PCR em tempo real.....	32
4.3.3.5. Análise dos dados da PCR	34
4.3.4. Determinação do número de cópias de DNAm _t	36
4.3.4.1. Lise dos embriões	36
4.3.4.2. Quantificação do número de cópias de DNAm _t	36
4.4. <i>Análise Estatística</i>	38
CAPÍTULO V: RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5. <i>Resultados e Discussão</i>	41
5.1. <i>Avaliação do Desenvolvimento Embrionário</i>	41
5.2. <i>Avaliação do Ψmm pela coloração MitoTracker red®</i>	45
5.3. <i>Avaliação do número total de núcleos e fragmentação</i>	52
5.4. <i>Quantificação de cópias de DNAm_t</i>	55
5.5. <i>Expressão Gênica</i>	58
CAPÍTULO VI: RESUMO DOS RESULTADOS	65
6. <i>Resumo dos Resultados</i>	66
CAPÍTULO VII: CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS FINAIS	68
7. <i>Conclusões e Comentários Finais</i>	69
CAPÍTULO VIII: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8. <i>Referências</i>	71

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O papel principal da mitocôndria está na produção de adenosina trifosfato (ATP) a partir da adenosina difosfato (ADP) e piruvato pela cadeia respiratória, entretanto, recentemente esse conceito foi ampliado pela constatação de que a mitocôndria é também responsável por inúmeras vias de sinalizações intracelulares (CHANDEL; SCHUMACKER, 1999) e suas atividades dependem do equilíbrio entre o DNA nuclear e mitocondrial (CUMMINS, 2004).

Para o sucesso da fertilização e desenvolvimento embrionário é necessário que haja replicação mitocondrial para a manutenção de uma quantidade apropriada de mitocôndria funcionais, a transcrição para a síntese do mtRNA, e a tradução para biogênese mitocondrial durante a oogênese (HSIEH *et al.* 2004).

A utilização de células desprovidas de DNA mitocondrial ou células ρ^0 contribuiu para a caracterização do papel das mitocôndrias nas vias de sinalização da apoptose. As células ρ^0 sobrevivem e se multiplicam exclusivamente com o ATP oriundo da glicólise, já que não são capazes de realizar o processo de fosforilação oxidativa (CHANDEL; SCHUMACKER, 1999). Essas células são resistentes a vários estímulos pró-apoptóticos e ainda conservam o potencial de membrana mitocondrial por diferentes mecanismos relacionados à enzima ATP sintetase e o transportador funcional de adenina (BUCHET; GODINOT, 1998).

Em bovinos, não se observou efeito deletério ao desenvolvimento embrionário *in vitro* após diminuição de cerca de 50% do conteúdo mitocondrial em zigotos. O modelo envolveu a centrifugação de zigotos 10-12 h após a FIV, retirada do ECRM e posterior introdução de 20-30% de ooplasto (FERREIRA, 2006).

Sabendo-se que esse modelo biológico permite o desenvolvimento embrionário em condição de depleção mitocondrial, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito da remoção e da suplementação mitocondrial em estágio de zigoto visando compreender a importância da organela no processo de desenvolvimento e de morte celular programada.

1.1. Justificativa

Foi observado que embriões bovinos com cerca de 50% de depleção mitocondrial estabelecida na fase de zigoto se desenvolvem até o estágio de blastocisto (FERREIRA, 2006), possivelmente devido à energia estocada no citoplasma do oócito pela produção de energia pela organela e finalmente, a possibilidade de replicação mitocondrial.

Entretanto, a mitocôndria tem papel central no processo de MCP, e modificações na concentração citoplasmática destas organelas podem levar a alteração no processo de sobrevivência celular.

O modelo embrionário permite estudar a importância da organela no processo de morte durante diferentes fases de demanda de fosforilação oxidativa, durante o período onde não é observada MCP (antes de 72hpi; MEIRELLES *et al.* 2004) e durante o período de morfogênese dependente de MCP (abertura da blastocela; THOMPSON *et al.* 2000).

Neste trabalho, dois modelos foram utilizados no embrião bovino, o modelo de depleção descrito anteriormente (CHIARATTI *et al.* 2010) e um modelo original de suplementação com extrato rico em mitocôndria em zigotos com o intuito de favorecer o entendimento do processo de controle de síntese de organelas durante o desenvolvimento embrionário.

1.2. Hipótese

As mitocôndrias são importantes para o desenvolvimento embrionário e uma variação na quantidade desta organela altera o potencial de desenvolvimento embrionário. Este efeito é mediado pela necessidade das funções desta organela e seu desbalanço pode gerar uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial ou ativação de vias que levam ao processo de apoptose embrionária.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo Geral:

Estudar o efeito da remoção e da suplementação mitocondrial em zigotos bovinos no desenvolvimento embrionário, durante os processos de replicação e transcrição mitocondrial e no mecanismo de morte celular programada.

1.3.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar o Ψ_{mm} em embriões submetidos à depleção ou suplementação mitocondrial no estágio de zigoto.
- Avaliar a capacidade de desenvolvimento embrionário e qualidade dos blastocistos produzidos a partir de zigotos submetidos à depleção ou suplementação mitocondrial no estágio de zigoto.
- Avaliar a quantidade de DNAmT nos diferentes grupos 0, 72 e 168 horas após manipulação.
- Avaliar a expressão dos genes anti-apoptóticos (BCL-2) e dos genes pró-apoptóticos (BAX, PRDX 1, ITM2B e PI3KAC) nos diferentes grupos 0, 72 e 168 horas após manipulação.
- Avaliar a expressão dos genes nucleares NRF-1 e TFAM e mitocondrial COXI nos diferentes grupos 0, 72 e 168 horas após manipulação.

CAPÍTULO II

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Morte celular programada*

Apoptose é um processo de morte celular programada que elimina células durante o processo de desenvolvimento e após danos celulares com um pequeno ou nenhum efeito sobre as células circunvizinhas (SOTO; SMITH, 2009).

O termo apoptose (do grego apo=separação, ptôsis=queda), adotado pela primeira vez por KERR *et al.*, na década de 70, designa a forma fisiológica de morte celular que ocorre segundo programa genético que desencadeia processo de autodigestão controlada, em consonância com a remoção de células lesadas, senescentes ou imprestáveis, sem alteração do microambiente celular (PAROLIN; JAMES, 2001).

Morfologicamente, a célula apresenta um encolhimento, ocorrem alterações no núcleo celular devido à ação de endonucleases que degradam o DNA, resultando em um núcleo picnótico e condensação de cromatina (MATWEE; BETTS, KING, 2000). Com isso, o núcleo colapsa e fragmenta-se, e as bolhas formadas pelo citoplasma separam a célula em fragmentos com membrana, partes do núcleo e organelas intactas chamadas corpos apoptóticos (BETTS; KING, 2001).

Existem enzimas presentes no citosol das células animais denominadas caspases que se encontram na forma de pró-enzimas inativas, tornando-as ativas após clivagem proteolítica em resíduos de ácido aspártico (PAROLIN; JAMES, 2001). Elas se ativam quando a célula recebe um estímulo de estresse causando dano no DNA ou privação de suporte nutricional (KUMAR; VAUX, 2002).

Esse grupo de enzimas pode agir em 2 pontos no processo de morte, como iniciadoras (caspase 8, 9 e 12) que contêm domínios que as unem em receptores de morte e as efetoras (caspases 3, 6 e 7) que degradam as proteínas celulares (BETTS; KING, 2001).

O processo de MCP pode ser deflagrado através de duas vias, as quais ativam as proteases, caspases. A via extrínseca ocorre através dos receptores de morte presentes na superfície celular, como os membros da família para o

fator de necrose tumoral (FTN), entre eles, o receptor Fas. Este se liga a uma proteína adaptadora presente no citosol chamada cadeia de morte associada ao Fas (FADD). O complexo formado resulta na ativação da caspase 8, que pode diretamente ou via mitocondrial ativar a caspase 3, levando a célula ao processo de morte (THORBURN, 2004).

A via intrínseca ocorre por liberação de proteínas mitocondriais devido a uma disfunção mitocondrial como lesão DNA, alterações de vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução de pH, estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação de fatores de crescimento. Na presença de estresse, ocorre translocação de proteínas pró-apoptóticas do citosol para mitocôndria resultando na liberação de citocromo c, presente no espaço intermembrana (PAROLIN; JAMES, 2001).

O citocromo c, por sua vez, liga-se ao fator ativador da apoptose-1 (APAF-1) que contém um domínio de recrutamento de caspases (CARD), que ativa a caspase 9. Esta cliva e ativa uma cascata de caspases efetoras como a caspase 3, a qual cliva substratos intracelulares que causam mudanças morfológicas durante o processo de apoptose, como externalização da fosfatidilserina, fragmentação DNA, quebra de membrana nuclear e formação dos corpos apoptóticos (WANG, 2001).

2.1.1 Morte celular programada em embriões

MCP é uma característica comum em embriões desenvolvidos *in vivo* e *in vitro* (MATWEE; BETTS, KING, 2000), embora ambos apresentem diferenças quanto à morfologia, número total de células, alocação da massa celular interna, expressão de genes específico e incidência de anormalidades cromossômicas (KNIJN *et al.* 2003; BADR *et al.* 2007). Oócitos derivados de abatedouro ou adquiridos por punção intravaginal apresentam apenas 30% de competência para o desenvolvimento embrionário (KNIJN *et al.* 2003).

A maioria dos embriões no período pré implantacional são mosaicos com células normais e anormais e, o processo de apoptose representa um ponto de checagem para eliminar as células nocivas, entretanto, uma ativação anormal do processo de MCP neste ponto de desenvolvimento, poderá ocasionar danos na sobrevivência embrionária (GJORRET *et al.*, 2003).

Oócitos e embriões em estágio de clivagem apresentam maquinaria molecular, como, os membros da família BCL₂ e caspases, para o processo de apoptose, entretanto, o processo não ocorre antes da compactação, durante o desenvolvimento embrionário (BYRNE et al, 1999; GJORRET *et al.*, 2003), pois é nesta fase que ocorre o início do estágio de diferenciação celular e o tempo de cultivo embrionário é maior (Figura II.1; MATWEE; BETTS, KING, 2000).

Blastocistos bovinos com baixa atividade de caspase apresentam maior probabilidade de eclodir que blastocistos com alta atividade de caspase e a capacidade de sobrevivência do blastocisto após transferência está relacionado com a baixa atividade de caspase (JOUSAN *et al.* 2008).

Figura II.1: Representação estágio específica de células TUNEL positivas de embriões bovinos produzidos in vitro em diferentes estágios de desenvolvimento (adaptado Gjorret, 2003).

Em bovinos, a passagem pelo quarto ciclo celular coincide com o período de maior ativação do genoma. Neste período ocorre grande perda embrionária provavelmente ligada a MCP (MEIRELLES et al, 2004). Antes deste período, os embriões parecem induzir competência para o processo de apoptose e ativam genes que suprimem o processo no desenvolvimento embrionário (MATWEE; BETTS, KING, 2000).

Esta resistência pode ser adquirida pela presença de inibidores herdados maternamente, baixos níveis de caspase ou citocromo c por imaturidade mitocondrial, baixos níveis de transcritos responsáveis pelo processo de morte, durante as primeiras fases de desenvolvimento (MATWEE; BETTS, KING, 2000; KNIJN *et al.* 2003).

2.1.2 Controle genético da apoptose

Durante o período pré-implantacional de desenvolvimento, o processo de apoptose é regulado por genes pró e anti-apoptóticos (MELKA *et al.* 2009). A família das proteínas BCL₂ pode ser caracterizada em dois principais grupos de proteínas de acordo com a capacidade de promover (Bax, Bak, Bad, Bim, Bcl-xS, Bok, Bik, Blk, Hrk, Bnip3, Bim) ou prevenir o processo de apoptose (BCL₂, BCLxL, BCLw, A1, MCL-1; SOTO; SMITH, 2009). As três funções principais destas proteínas são dimerização, atividade formadora de poro ou canal de íons e ligação a outras proteínas (PAROLIN; JAMES, 2001).

A proporção celular de fatores anti e pró-apoptóticos é melhor indicativo da sensibilidade celular ao processo de morte quando comparado à expressão individual de cada membro e esta taxa irá determinar o destino da célula (NAGATA, 1997).

Quando a célula recebe um estímulo de morte, fatores pró-apoptóticos presentes no citosol, sofrem mudanças de conformação e entram na membrana mitocondrial externa e interagem com canais iônicos, facilitando sua abertura, permitindo assim, a saída de proteínas pró-apoptóticas como citocromo c (BETTS; KING, 2001). Com a ativação das caspases, há a clivagem de substratos específicos, incluindo proteínas nucleares e do citoesqueleto (MATWEE; BETTS, KING, 2000).

Já quando a célula recebe um estímulo de sobrevivência, fatores anti-apoptóticos localizados nas membranas mitocondriais, ligam-se ao Bax prevenindo a liberação do citocromo c ou fechando os canais de voltagem (BETTS; KING, 2001). Portanto, o balanço das proteínas é responsável pela manutenção da homeostase celular (NAGATA, 1997).

Embriões bovinos que apresentam expressão elevada do gene Bax estão correlacionados com diminuição da taxa de desenvolvimento. A alta

expressão de BCL₂ é encontrada em oócitos e embriões de boa qualidade e a baixa expressão são encontrados em embriões fragmentados (SOTO; SMITH, 2009).

As fosfatidilinositol 3 quinases (PI3Ks) são uma família de enzimas capazes de catalisar a fosforilação da porção 3'-OH do anel inositol produzindo 3 produtos lipídicos: PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂ e and PtdIns(3,4,5)P₃ (CANTRELL, 2001). Estas enzimas são compostas por duas subunidades, uma regulatória/adaptadora e outra catalítica, comumente denominadas de *p85* (isoformas α e β) e *p110* (isoformas α , β e δ), respectivamente (RIPAMONTE, 2005).

A ativação das PI3Ks por agonistas extracelulares envolve sua translocação para a membrana plasmática com intuito de adquirir substratos lipídicos (WYMAN; PIROLA, 1998). Durante a ativação, sinais positivos ou negativos na cascata de sinalização são importantes para a homeostase. A rota de degradação da PI3K depende da desfosforilação causada pelas enzimas da família da fosfatase inositol 5 (CANTRELL, 2001).

As PI3Ks têm papel fundamental em processos fisiológicos como metabolismo, crescimento e migração celular devido às mudanças no citoesqueleto, proliferação, proteção contra apoptose, transporte de membrana e secreção, e ainda está envolvido na patogenia do câncer e doenças inflamatórias, metabólicas e cardiovasculares (Figura 11.2; VANHAESEBROECK *et al.* 1997; WYMAN; ZVELEBIL; LAFFARGUE, 2003).

Fatores de crescimento utilizam a via PI3K-proteína quinase B (PKB) para neutralizar a MCP. A PKB interfere na expressão com o ligante de Fas e impede o início do processo de morte impedindo a ativação da caspase 9, fosforilando Bad e ativando um fator nuclear kB. Portanto, a ativação de PI3K é imprescindível para a sobrevivência celular, e sua atividade mínima sustenta o crescimento e proliferação durante o desenvolvimento (WYMAN; ZVELEBIL; LAFFARGUE, 2003).

Figura II.2: Via metabólica da proteína PI3K

A proteína integral de membrana 2B é um membro de uma família de proteínas integrais de membrana tipo II, na qual existem mais dois membros, ITM2A e ITM2C. Esta molécula divide o domínio BH3 presente nos membros da família BCL₂ e é considerada uma molécula pró-apoptótica, já que induz o processo de MCP via mitocondrial (FLEISCHER; REBOLLO, 2004).

ITM2Bs estão localizadas na mitocôndria e seu mecanismo de ação ocorre no complexo poro de transição de permeabilidade, interagindo com canal iônico dependente de voltagem ou que as próprias proteínas integrais formem poros levando a perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação de citocromo c e conseqüentemente a ativação da caspase 9 e caspase 3 durante o processo de apoptose (FLEISCHER; AYLLON; REBOLLO, 2002b).

Algumas proteínas de domínio BH3 podem promover o processo de morte através de dois processos que são a inativação de proteínas da família BCL-2 ou modificando moléculas pró-apoptóticas. As ITM2Bs induzem MCP inibindo a atividade de proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 (FLEISCHER *et al.* 2002a).

Ripamonte (2005) mostrou a presença da ITM2B nos grupos de embriões 8 células de desenvolvimento, rápido e lento, e ausência nos embriões 4 células. Esta distribuição é um indicativo de que no início da transcrição do genoma bovino, a molécula ITM2B pode estar interagindo com o

BCL-2, em uma associação pelo domínio BH3 compartilhado por ambos e dependendo do balanço entre estas duas moléculas, induzir a morte ou não.

Muitos laboratórios de produção in vitro de embriões expõem os embriões e oócitos a atmosferas de 20% O₂, sendo o ideal 5-7% O₂, como é encontrada no oviduto. Outros fatores como a luz visível e restos de metais pesados também são encontrados no meio de cultura, os quais aumentam a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem induzir danos nos embriões (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001).

Oócitos e embriões bovinos possuem sistemas anti-oxidantes com o intuito de controlar os níveis de EROs e de proteção contra o estresse oxidativo (LEYENS; KNOOPS; DONNAY, 2004). Peroxirredoxinas (PRDXs) ou tioredoxinas peroxidases (TPx), são enzimas antioxidantes recentemente descobertas, capazes reduzir peróxidos diretamente, ex. peróxido de hidrogênio e diferentes alquil hidroperóxidos. As peroxirredoxinas são importantes na inibição da apoptose celular induzida pelo peróxido de hidrogênio (NORDBERG; ARNÉR, 2001; Figura II.3).

Figura II.3: Resumo das vias apoptóticas e dos genes estudados neste trabalho. A via extrínseca ocorre através de receptores de morte como o receptor Fas, que se liga ao FADD, o qual ativa a caspase 8, que pode diretamente ou via mitocondrial ativar a caspase 3, levando a célula ao processo de morte. Na via intrínseca ocorre uma translocação de proteínas pró-apoptóticas do citosol para mitocôndria, resultando na liberação de citocromo c, que por sua vez, liga-se ao fator ativador da apoptose-1 (APAF-1) que ativa a caspase 9. Esta cliva e ativa uma cascata de caspases efetoras como a caspase 3. A proporção celular de fatores anti (BCL₂) e pró-apoptóticos (BAX) determinarão destino da célula. ITM2B tem seu mecanismo de ação no complexo poro de transição de permeabilidade, interagindo com canal iônico dependente de voltagem, levando à perda do potencial de membrana mitocondrial e à liberação de citocromo C, ativando consequentemente as caspase 9 e caspase 3 durante o processo de apoptose. Peroxirredoxinas (PRDXs) são enzimas antioxidantes capazes de reduzir peróxidos de hidrogênio, inibindo a apoptose celular. Fatores de crescimento utilizam a via PI3K-proteína quinase B (PKB) para neutralizar a MCP, já que a PKB interfere na expressão com o ligante de Fas e impede o início do processo de morte, impedindo a ativação da caspase 9, fosforilando BAD e ativando um fator nuclear K_b.

Até o momento, são conhecidas 6 peroxirredoxinas de mamíferos e estas tem papel fundamental não apenas como antioxidantes mas também, na proliferação celular, diferenciação, resposta imune e controle de apoptose e dos processos óxido-redução (LEYENS; DONNAY; KNOOPS, 2003).

Os PRDXs apresentam diferentes padrões de expressão durante o desenvolvimento embrionário. Transcritos de PRDX-1 e PRDX-5 foram encontrados durante todo desenvolvimento como a maioria das enzimas antioxidantes em bovinos. Isso pode ocorrer devido a um acúmulo de transcritos herdados maternalmente nos oócitos ou transcrição embrionária nas fases mais iniciais (LEYENS; KNOOPS; DONNAY, 2004).

2.2. Mitocôndria

A mitocôndria é o centro bioenergético e metabólico das células eucariotas (FLEISCHER; REBOLLO, 2002) e tem papel fundamental para os oócitos fornecendo ATP para os processos de fertilização e desenvolvimento embrionário antes da implantação. O processo de respiração mitocondrial em bovinos é correlacionado com a taxa de desenvolvimento embrionário (JEONG *et al.* 2009).

A mitocôndria é herdada maternalmente, possui a capacidade de autorreplicação (VAN BLERKOM; SINCLAIR; DAVIS, 1998) e é responsável pela produção da maioria da energia celular, em forma de ATP, através do processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS; CUMMINS, 2004).

A função mitocondrial é dependente de uma comunicação estável entre o DNA nuclear (DNAn) e 16,5kb de DNA presentes dentro da mitocôndria (DNAm). Entre os 80 peptídeos no processo de OXPHOS, 13 são codificados pelo DNAm e os peptídeos restantes são codificados pelo DNAn (CHIARATTI *et al.* 2010).

O DNAn codifica a maioria das proteínas da cadeia respiratória, todas as proteínas que regulam a replicação e transcrição do DNAm, como também, as proteínas necessárias para a biogênese mitocondrial (apoptose e esteroidogênese; SHADEL; CLAYTON, 1997; KAMEYAMA *et al.*, 2007).

Embriões e oócitos bovinos possuem diferentes quantidades de DNAm devido a uma variação interoocitária destacadas em 2 estudos que reportam

que a média de número de cópias de DNAm varia de 138.000 a 314.000 em oócitos não fertilizados (SANTOS; EL SHOURBAGY; ST JOHN, 2006; EL SHOURBAGY *et al.* 2006).

Assim sendo, muito se tem especulado sobre uma possível correlação do número de cópias com o potencial do oócito em se tornar um blastocisto competente a implantar-se no útero. Há uma correlação entre a quantidade de mitocôndria e produção de energia na célula, pois o DNAm é responsável por sintetizar algumas enzimas envolvidas no processo de OXPHOS (FERREIRA *et al.* 2007). Há uma forte associação entre número de mitocôndrias, baseada no número de cópias de DNAm e sucesso na fertilização (HUA *et al.* 2007).

Santos (2006) e colaboradores reportaram que oócitos de boa qualidade apresentavam alta quantidade de DNAm e conseqüentemente, altas taxas de fertilização quando comparadas aos oócitos de baixa qualidade. Existem outros estudos que mostram que a quantidade de mitocôndrias é um importante indicador da qualidade de oócito (REYNIER *et al.* 2001; MAY-PANLOUP *et al.* 2005; EL SHOURBAGY *et al.* 2006).

Para o sucesso da fertilização e desenvolvimento embrionário é necessário que haja replicação mitocondrial para a manutenção de uma quantidade apropriada de mitocôndria funcionais, a transcrição para a síntese do mtRNA, e a tradução para biogênese mitocondrial durante a oogênese (HSIEH *et al.* 2004).

A transcrição do genoma mitocondrial tem início em diferentes fases de desenvolvimento dependendo da espécie, sendo que em bovinos ocorre entre 8 e 16 células. Os mecanismos moleculares para a ativação da transcrição do DNAm durante a embriogênese não são bem entendidos até o momento (MAY-PANLOUP *et al.* 2005).

O citocromo c oxidase (COX I) é sintetizado pelo DNAm e compõe um dos complexos enzimáticos existentes na mitocôndria responsáveis pela OXPHOS (HATEFI, 1985) e vem sendo bastante utilizado para a avaliação da função mitocondrial (ALCOLEA *et al.* 2007).

O fator nuclear respiratório-1 (NRF-1) é um fator de transcrição nuclear que contribui para a expressão e função da cadeia respiratória e para a transcrição e replicação do DNAm (SCARPULLA, 1997).

O NRF-1 e NRF-2 regulam expressão da maioria de genes nucleares envolvidos na biogênese mitocondrial, tal como os genes que codificam subunidades dos complexos respiratórios, fator de transcrição mitocondrial A, B1 e B2 (TFAM, TFB1M e TFB2M respectivamente), os fatores de replicação mitocondrial como *single strand binding protein* (SSB) e outras proteínas necessárias para a função mitocondrial (ALCOLEA *et al.* 2007).

O mtTFA ou Tfam dentre os fatores codificadores nucleares, é considerado o mais importante no controle da replicação e transcrição do DNAm (SMITH; THUNDATHIL; FILION, 2005). Esta proteína tem função dependente da sua concentração, e outra função relatada é o empacotamento do DNAm (ALCOLEA *et al.* 2005).

A síntese do mtTFA ocorre no núcleo e este é importado pela mitocôndria onde parece dar condições para a transcrição do DNAm que se inicia numa região específica desta molécula denominada *displacement loop* (D-loop; SCARPULLA, 1997).

Depois de iniciada, a transcrição pode ser levada a termo ou ser interrompida por ação de uma RNase específica (RNase MRP) que produz fragmentos de RNA com 50 a 90 nucleotídeos (LEE; CLAYTON, 1998). Estes fragmentos se mantêm estávelmente ligados a uma das fitas de DNAm dando suporte para o início da replicação. Por este motivo a replicação do DNAm é totalmente dependente de sua transcrição.

Em ratos, há um aumento na expressão de NRF-1 e mtTFA no estágio de 8 células, embora a replicação mitocondrial ocorra apenas nos estágios finais de desenvolvimento (MAY-PANLOUP *et al.* 2005). Em contraste, já foi relatado que mtTFA pode apresentar uma alta expressão quando a quantidade de DNAm é reduzida (SCARPULLA, 1997). Sugere-se que mtTFA pode regular os níveis de DNAm ou que a expressão de mtTFA pode ser regulada devido a um feedback iniciado pela depleção de DNAm (POULTON; HOLT, 1994).

Há uma relação entre o volume citoplasmático e a quantidade de DNAm, visto que o volume é um importante indicador de competência oocitária. Oócitos humanos com falhas de desenvolvimento os quais apresentam baixa quantidade de citoplasma, não apresentam volume

citoplasmático suficiente para produzir número de divisões e diluições requeridas para sustentar o desenvolvimento embrionário (EL SHOURBAGY *et al.* 2006).

A transferência de citoplasto foi utilizada com sucesso para solucionar este problema, no entanto, o conteúdo transferido possui uma mistura de RNAs, proteínas, mitocôndria e outras organelas, portanto, a falha de desenvolvimento pode ocorrer em consequência de insuficiência de fatores citoplasmáticos ou pelo número insuficiente de mitocôndrias para suportar a função metabólica (EL SHOURBAGY *et al.* 2006).

O isolamento e transferência de mitocôndrias entre oócitos aumentaram a produção de ATP nos oócitos receptores e a sua atividade se manteve (VAN BLERKOM; SINCLAIR; DAVIS, 1998). Além disso, microinjeção de pequenas quantidades de mitocôndrias em camundongos preveniu o início do processo de MCP em 64% dos oócitos injetados (PEREZ *et al.* 2000).

Embriões bovinos apresentam variações metabólicas durante o desenvolvimento, sendo que até o estágio de 8 células, os embriões utilizam piruvato e oxigênio pelo processo de OXPHOS (HARVEY *et al.*, 2004). Esta fase é importante para os embriões bovinos, pois este ciclo requer mais tempo e é neste momento, que ocorre a transição materno zigótica (TMZ), período em que os embriões concluem a ativação do genoma e precisam transcrever seu próprio RNAm para continuar o desenvolvimento (MEIRELLES *et al.* 2004).

No estágio de 8 células observa-se um aumento do potencial de membrana mitocondrial, possivelmente relacionado com mudanças na morfologia mitocondrial, juntamente com a ativação do genoma embrionário (SATHANANTHAN; TROUNSON, 2000).

A diferenciação mitocondrial é detectada bioquimicamente pelo aumento da utilização de glicose, consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono e produção de ATP (VANBLERKOM; SINCLAIR; DAVIS, 1998). As variações na estrutura mitocondrial coincidem com a mudança dos substratos metabólicos do piruvato e lactato para glicose e mudanças de atividade metabólica (ACTON *et al.* 2004).

Thompson (2000) e colaboradores observaram que os embriões bovinos apresentam particularidades na mudança metabólica durante o desenvolvimento embrionário, pois estes necessitam da produção de ATP via

OXPHOS em todos os estádios de desenvolvimento para um funcionamento apropriado do estágio de óxido-redução do embrião.

Além da função de produção de energia, como mencionado anteriormente, a mitocôndria tem papel fundamental na regulação do processo de MCP, já que age como reservatório de proteínas ativadoras e efetoras do processo de MCP como citocromo c, segundo ativador mitocondrial de caspase (Smac)/ proteína de Ligação-IAP Direta com baixo pI (Diablo), fator indutor de apoptose (AIF), endonuclease G e pró-caspases 2, 3, 8 e 9 (PARONE; JAMES; MARTINOU, 2002, FLEISCHER; REBOLLO, 2004). A permeabilização da membrana mitocondrial causa a liberação destes fatores provocando a morte da célula (FLEISCHER; REBOLLO, 2004).

2.3. Potencial de membrana mitocondrial (Ψ_{mm})

A energia liberada durante as reações de oxidação na cadeia respiratória mitocondrial é armazenada como um gradiente eletroquímico que consiste de um potencial elétrico de membrana mitocondrial (Ψ_{mm}), negativo dentro de cerca de 180-200 mV, e de um gradiente de próton de uma unidade. Esta energia é capaz de conduzir a síntese de ATP para ser utilizada como combustível nos processos celulares (COSSARIZZA, 2009).

O Ψ_{mm} é utilizado como indicador de atividade mitocondrial (XU *et al.* 2003) e pode ser utilizado na compreensão de processos fisiológicos e patológicos no qual a função mitocondrial (movimentação de prótons) está envolvida (BARACCA *et al.* 2003; VANBLERKOM; DAVIS; ALEXANDER, 2003).

Mudanças no Ψ_{mm} ocorrem por movimentações de prótons através da membrana mitocondrial interna durante o processo de OXPHOS. Em condições fisiológicas, há uma extrusão ativa de prótons pela respiração e consumo passivo destes pela ATP sintetase durante a síntese de ATP (BARACCA *et al.* 2003).

Diferenças no Ψ_{mm} dentro ou entre células podem refletir em diferenças na função mitocondrial ou níveis de atividade, portanto, um alto Ψ_{mm} está relacionado com a melhor função mitocondrial, já uma diminuição de

Ψ_{mm} está relacionado com a liberação de citocromo c da mitocôndria, que juntamente com dois fatores citosólicos, APAF-1 e pró-caspase 9, ativa a caspase 3, ocorrendo assim MCP (ZHAO *et al.* 2009).

A membrana interna atua como um sistema polarizado internamente, com cargas negativas que funcionam como sítio de ligação para corantes lipofílicos utilizados para se determinar o Ψ_{mm} (MIRANDA *et al.* 2005). Corantes catiônicos podem ser distribuídos pela matriz mitocondrial em resposta a uma diferença de Ψ_{mm} , sendo o acúmulo destes, uma consequência da carga e solubilidade dos mesmos à membrana interna lipídica e ao espaço intermembrana (BARACCA *et al.* 2003).

Entre os corantes lipofílicos mais utilizados encontram-se o MitoTracker Red® CMXRos que passa passivamente por difusão pela membrana plasmática e acumula-se apenas em mitocôndrias metabolicamente ativas. Sondas não fluorescentes do mitotracker irão se acumular na mitocôndria e reagir com o grupo thiol dos peptídeos e proteínas para formar um conjugado fluorescente aldeído fixado, que poderá ser visualizado em microscopia confocal com o intuito de visualizar o embrião como um todo, através de várias secções e sua reconstrução em uma imagem 3D da estrutura (REYNAUD *et al.* 2001).

Quantificação mitocondrial utilizando imagens digitais individuais feitas em cortes em embriões inteiros e examinadas em uma ampliação elevada em microscopia confocal resolvem problemas como os de sobreposição de organelas ou as que se encontram em posição transversal. No entanto, quantificação mitocondrial com sondas fluorescentes pode ser limitada, já que proporções consideráveis de mitocôndrias em oócitos podem ser inativadas nos blastocistos (“mitocôndrias escuras”; VANBLERKOM, 2008).

CAPÍTULO III

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura III.1: A PIV foi realizada mediante maturação (MIV) durante 18 horas de oócitos colhidos de ovários de vacas abatidas e em seguida foi realizada a seleção de 1º corpúsculo polar. A ativação partenogénica foi realizada 26 horas após maturação seguida de centrifugação e microcirurgia. Os zigotos foram divididos em 4 tempos conforme o término da confirmação de fusão do grupo suplementado. Nos tempos de 0, 3, 72 e 168 horas após a fusão, os embriões foram submetidos à coloração pelo mitotracker red. Nos tempos de 0, 72 e 168 horas após a fusão, os embriões foram avaliados quanto à expressão dos genes apoptóticos BAX, BCL₂, ITM2B, PI3KAC, PRDX1 e GAPDH e quanto à expressão de genes relacionados com a atividade de mitocôndria NRF-1, TFAM e COXI utilizando PCR em tempo real. Além disso, foi realizada a quantificação de DNA mitocondrial nestes mesmos tempos. Às 72 horas, foi analisado a taxa de clivagem e 8 células nos diferentes grupos. Às 168 horas, foi realizada a análise de desenvolvimento, e coloração de TUNEL.

CAPÍTULO IV

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga. As análises de microscopia confocal foram realizadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.2. Produção in vitro de embriões bovinos (PIV)

A PIV foi realizada a partir da aquisição de oócitos viáveis para maturação, ativação partenogenética e cultivo embrionário. Logo após o término da ativação (29h após o início da maturação), os zigotos foram submetidos à micromanipulação e para colheita de biópsias do ECRM, na tentativa de se produzir zigotos suplementados (que receberão estas biópsias) e zigotos depletados (que foram submetidos à extração destas). A técnica será descrita detalhadamente no item 4.2.5. No decorrer deste trabalho, a palavra zigoto referência um embrião contendo 1 célula produzido partenogeneticamente.

4.2.1. Coleta e seleção dos oócitos

Os complexos *cumulus oophorus* (COCs) foram obtidos a partir de ovários de vacas zebuínas ou mestiças oriundos de abatedouros localizados na cidade de Ipoã-SP (206 km do laboratório). Para o experimento, foram utilizados COCs de qualidade 1 e 2.

4.2.2. Maturação in vitro (MIV)

Os COCs foram maturados em meio TCM-199 com sais de Earles tamponado com NaHCO_3 (GIBCO BRL®), suplementado com glutamina, 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato (22 $\mu\text{g/mL}$), amicacina (83,4 $\mu\text{g/mL}$) e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de FSH, 50 $\mu\text{g/mL}$ de LH e 1 $\mu\text{g/mL}$ de 17 β estradiol. A maturação foi realizada em microgotas de 90 μl de meio, cobertas com óleo mineral e incubados a 38,5°C, 5% CO_2 em ar e com máxima umidade, durante 26 horas.

4.2.3. Retirada do cumulus oophorus e seleção do 1º corpúsculo polar dos oócitos bovinos

A fim de melhorar a taxa de ativação partenogenética, 18h após do início da maturação decidiu-se realizar a seleção dos oócitos que apresentaram a extrusão do 1º corpúsculo polar. Os oócitos foram retirados das gotas de maturação e as células do *cumulus oophorus* foram removidas mediante sucessivas pipetagens em solução de hialuronidase (0,1%) diluída em solução salina fosfatada (PBS) sem cálcio e magnésio (PBS simples). Em seguida, os oócitos desnudos foram selecionados sob lupa estereomicroscópica em meio TCM199 com sais de Earle, glutamina, NaHCO_3 e tampão HEPES, suplementado com 10% de SFB, piruvato ($22\mu\text{g/mL}$), amicacina ($83,4\mu\text{g/mL}$), quanto à presença do 1º corpúsculo polar (1ºCP). Somente os que apresentam extrusão do 1ºCP e o citoplasma homogêneo foram selecionados para a ativação. Após a seleção, os oócitos retornaram para as gotas de maturação até o momento da ativação e da microcirurgia (como será descrito no item 4.2.5).

4.2.4. Ativação Partenogenética

Os oócitos selecionados quanto à extrusão do 1º corpúsculo polar foram ativados partenogeneticamente às 26h após o início da maturação dos oócitos bovinos pela exposição por 5 minutos a Ionomicina ($5\mu\text{M}$) em TCM-199 tamponado com Hepes e suplementado com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA-SIGMA®), $22\mu\text{g/mL}$ de piruvato de sódio e $83,4\mu\text{g/mL}$ de amicacina. Em seguida, os mesmos foram lavados em TCM-199 tamponado com Hepes e saturado com 3% de BSA e finalmente, incubados por 3h em 2mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) diluída em meio de cultivo SOF (meio SOF suplementado com 30mg/mL de BSA e 2,5% de soro fetal bovino). Após a ativação, os embriões foram colocados em meio SOF sem a presença de SFB, acrescido de 0,5% de BSA em estufa 5% de CO_2 em ar para o início da micromanipulação.

4.2.5. Microcirurgia

Após 3 horas do início da ativação partenogenética, os zigotos foram incubados em 200µL de SOF suplementado com 10% SFB + 7,5µg/mL citocalasina B em microtubos de 1,5mL durante 30 min e centrifugados a 10.000XG durante 15 min para que as frações citoplasmáticas fossem individualizadas. Após este procedimento, os zigotos doadores e receptores foram incubados em meio de cultivo contendo 7,5µg/mL citocalasina B por 10 minutos e transferidos para a gota de micromanipulação com 300µL de meio HSOE suplementado com 10% de SFB + 7,5µg/mL citocalasina B sob óleo mineral em placa de poliestireno de 60mm. Os procedimentos de micromanipulação foram realizados em microscópio invertido (Leica DMIRB, Wetzlar, Alemanha) equipado com micromanipuladores e microinjetores. O extrato citoplasmático rico em mitocôndrias (ECRM, TATHAM *et al.* 1996) dos zigotos centrifugados foi retirado do oócito doador, sendo considerado este o grupo depletado (D). Foi retirada do grupo receptor uma biópsia aproximadamente 7,8% para a suplementação com ECRM oriundo do doador. Com a quantidade retirada do zigoto depletado (doadores), foi realizada a suplementação de zigotos biopsados (receptores), formando assim, o grupo suplementado (S). Como controles do experimento foram utilizados zigotos ativados partenogeneticamente (C). Para testar efeito da centrifugação e da remoção de citoplasma na mesma quantidade da biópsia do ECRM sobre o perfil apoptótico e desenvolvimento embrionário, outros dois grupos foram formados, o grupo de zigotos centrifugados (CC) e dos zigotos aspirados (CA). A figura IV.1 mostra os grupos experimentais. Os zigotos depletados, os suplementados e sua respectiva biópsia foram processados individualmente para futuras análises e comparações. O zigoto controle aspirado também apresenta o processamento individual juntamente com a biópsia.

Figura IV.1: Grupos experimentais: Os grupos experimentais delineados foram: **GRUPO CONTROLE** (grupo sem centrifugação e manipulação), **GRUPO CONTROLE ASPIRADO** (grupo submetido à manipulação sendo retirado uma biópsia de aproximadamente 7,8% do ooplasma), **GRUPO CONTROLE CENTRIFUGADO** (grupo submetido apenas à centrifugação), **GRUPO SUPLEMENTADO** (grupo no qual é retirada uma biópsia de aproximadamente 7,8% do ooplasma para que, este receba o ECRM do grupo depletado) e **GRUPO DEPLETADO** (grupo submetido à retirada do ECRM).

O grupo suplementado foi submetido à eletrofusão para a incorporação do ECRM oriundo do oócito doador ao ooplasma do oócito receptor. A eletrofusão foi realizada em manitol e os parâmetros de voltagem utilizados foram um pulso de 1V por 10s de corrente alternada e um pulso de 1,75KV/cm por 45µs de corrente direta. A taxa de fusão foi observada 30 minutos após a fusão.

O volume dos zigotos (V_z) e das biópsias (V_b) foram calculados com base nas seguintes fórmulas (D_z equivale ao diâmetro do zigoto, D_b ao diâmetro da biópsia e C_b ao comprimento da biópsia, tabela IV.1). O diâmetro dos zigotos foi previamente medido e a média utilizada foi de 2,3 unidades de medida, sendo que cada unidade possui 50µm. O diâmetro da pipeta foi de 15µm, que compreende ao diâmetro interno da micropipeta de injeção e o comprimento da biópsia foi de 7 unidades de medida, portanto utilizando as equações abaixo, o volume retirado foi de aproximadamente 7,1% do citoplasma:

$$V_z (\mu m^3) = 4/3 \times \pi \times (D_z/2)^3$$

$$V_b (\mu m^3) = \pi \times (D_b/2)^2 \times C_b$$

Tabela IV.1: Média do diâmetro do zigoto (D_z), volume da biópsia (V_b) e volume de zigoto (V_z) e porcentagem média do volume retirado nos grupos suplementado e controle aspirado.

Grupos	Média do D_z	Média do V_z	Média do V_b	% de Volume Retirado
Suplementado	2,36	858.939,37	61.850,25	7,20
Controle Aspirado	2,38	877.954,09	61.850,25	7,04

4.2.6. Cultivo in vitro

As análises de desenvolvimento foram divididas em 4 tempos: tempo 0 hora são os zigotos que foram processados após a confirmação da fusão do grupo suplementado; tempo 3 horas são os zigotos que foram processados 3 horas após a confirmação da fusão do grupo suplementado; tempo 72 horas são os zigotos que foram processados 72 horas após a confirmação da fusão do grupo suplementado; tempo 168 horas são os zigotos que foram processados 168 horas após a confirmação da fusão do grupo suplementado.

Não foi utilizado o grupo de 3 horas para a análise de tempo real e quantificação de DNAm. Os zigotos que foram submetidos a cultivo embrionário (tempo 3, 72 e 168 horas) foram cultivados in vitro em meio SOF (fluido sintético de oviduto) sem a presença de SFB, acrescido de 0,5% de BSA em 5% de O₂. Decorridas 72 horas após fusão, estes foram avaliadas as taxas de clivagem e de embriões 8 células. Outros embriões foram destinados ao cultivo até 168 horas após fusão e foi realizada a avaliação do desenvolvimento embrionário.

4.3. Técnicas utilizadas

4.3.1 Mitotracker red ®

A coloração foi utilizada com intuito de avaliar o potencial de membrana mitocondrial. Biópsias embrionárias, zigotos de todos os grupos e em diferentes tempos, foram incubados no escuro por 30 minutos a temperatura de 37°C em meio SOF 2,5% SFB + 0,5% BSA acrescido de 500nM de *Mitotracker*® CMXRos. Após este período, os embriões foram fixados por 1 h em 2% de paraformaldeído (Sigma ®) diluído em PBS simples com 0,1% de polivinil-pirrolidona (PVP; Sigma ®), lavados três vezes em PBS simples com 10 mg/mL de BSA (solução de bloqueio), permeabilizados em PBS simples com 0,5% de triton X-100 (v/v), 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de PVP (solução de lise) por 1 h e por fim, incubados por 10 min em solução de bloqueio.

Os embriões obtidos, conforme descrito anteriormente (figura IV.1), foram montados em lâminas com lamínulas utilizando-se um protetor de fluorescência (Vectashield, Vector®), sendo as últimas vedadas com esmalte. As lâminas foram separadas por grupos para os tempos de 0 e 3 horas, sendo que cada uma possuía o zigoto depletado (doador do ECRM), suplementado (receptor do ECRM do zigoto depletado) e a biópsia retirada do zigoto suplementado. No grupo controle aspirado, o zigoto com sua respectiva biópsia encontram-se na mesma lâmina (figura IV.2). Para os tempos de 72 e 168 horas, os zigotos foram montados em grupo, já que estes não possuíam a respectiva biópsia. A análise foi realizada no microscópio de varredura laser confocal Leica DMIRE_2 (LEICA®) e laser LEICA TCS SP2 SE para visualização das mitocôndrias marcadas com *Mitotracker*® CMXRos (excitação

579 nm e emissão 599 nm) nos diferentes planos focais do embrião. As imagens foram capturadas e avaliadas com o software Leica Confocal (LEICA®) e aumento de 400x.

O resultado da densitometria da imagem foi estimado pelo software ImageJ 1.37v (NIH, EUA). Com a análise neste software, obteve-se a densidade integrada média que corresponde à tonalidade média de pixel em escala de cinza multiplicada pela área do embrião. Cada grupo foi normalizado com o grupo controle de cada repetição, ou seja, de cada dia de leitura no microscópio. As porcentagens médias das densidades integradas das biópsias foram calculadas pela média do controle aspirado somado com a média das biópsias dos respectivos controles de cada repetição.

Figura IV.2: Montagem das lâminas para avaliação em microscopia confocal nos tempos de 0 e 3 horas. O zigoto depletado, suplementado e a respectiva biópsia (*obtida do grupo suplementado) foram montados na mesma lâmina; o grupo controle aspirado foi montado o zigoto que sofreu a retirada da biópsia com sua respectiva biópsia e os controles e controles centrifugados foram montados em grupos para a análise em microscopia de confocal.

4.3.2 TUNEL (*Terminal transferase mediated uracil nick end labeling*)

A técnica de TUNEL (do inglês, *Terminal deoxynucleotil transferase Uracil Nick End Labeling*) identifica *in situ*, a fragmentação internucleossômica do DNA (figura IV.3).

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

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

Os embriões do tempo de 168 horas foram lavados em PBS acrescido de 1mg/mL de polivinil-pirolidona (PVP) e fixados em paraformaldeído 3,7% durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a lavagem em PBS/PVP, os embriões foram permeabilizados em solução 0,5% de triton X-100 e 0,1% citrato de sódio em PBS durante 1 hora em temperatura ambiente e lavados em PBS acrescido de PVP. Grupos de embriões fixados e permeabilizados foram subdivididos em 3 grupos: controles positivos, negativos e amostras experimentais. O controle positivo foi tratado com 3U/mL DNase (FPLCpure™, Amersham Biosciences) em solução com 400mM de TRIS-HCl, 50mM de MgCl₂ e água ultrapura por 1 hora a 37°C. Após lavagem, o controle positivo e as amostras foram incubadas em microgotas da mistura de reagentes de

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

4.3.3. Avaliação quantitativa de transcritos

Biópsias embrionárias e embriões foram congeladas em 1µL de solução de PBS acrescida de PVP e RNase Out (1U/µL; RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen™, 40U/µL) e em seguida, foi imersa em nitrogênio líquido e estocados a -80⁰C até o momento da extração de RNA.

4.3.3.1 Extração do RNA total pelo método de trizol

O RNA foi extraído com Reagente TRIzol® (Invitrogen™), segundo protocolo abaixo: a amostra foi homogeneizada com 110µL de solução contendo 100µL de TRIzol®, 1µL de acrilamida linear (Ambion®, 5mg/mL) e 9 µL de água e incubados a 5 minutos a temperatura ambiente. O trizol manteve a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares e a acrilamida linear auxiliou na precipitação do RNA durante processos de coprecipitação. Após este procedimento, adicionou-se 20 µL de clorofórmio (Synth) misturado por inversão, seguida de incubação a temperatura ambiente por 3 minutos. A amostra foi centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4⁰C. A adição do clorofórmio auxiliou na separação das fases aquosa e orgânica. O RNA foi removido da fase aquosa (70 µL), precipitado com 70 µL de álcool isopropílico (Synth) seguido de uma incubação por 10

minutos a temperatura ambiente e 10 minutos a -20°C e centrifugação a $12000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Removeu-se o sobrenadante e foi feita uma lavagem com etanol (Synth) 75% (100 μL), seguido de uma centrifugação a $5000 \times g$ por 5 minutos a 4°C . Após este procedimento, removeu-se o sobrenadante e realizou-se a eluição em 5 μL água tratada com DEPC.

4.3.3.2 Transcrição reversa

O RNA foi incubado 5 minutos a 70°C com 0,5 μL de hexâmeros randômicos (pd(N)₆ Random Hexamer, Amershan Biosciences, Piscataway, NJ, EUA; 0,5 μg) e imediatamente resfriado a 4°C , para a adição de 0,5 μL da enzima de transcriptase reversa (40U; ImProm-II™ Reverse Transcriptase, Promega®, Madison WI, EUA) e reagentes: tampão 5x (2 μL), MgCl_2 (3mM), 0,5mM de cada dNTP, 0,5 μL de inibidor de RNase (RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen™, 40U/ μL) em um volume final de 4,7 μL de solução para 5 μL de RNA. As amostras foram incubadas a 42°C por 60 minutos, aquecidas a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima e armazenadas a -20°C até o momento de uso.

4.3.3.3 Pré-amplificação do cDNA

Utilizando-se o kit Taqman PreAmp Master Mix (Applied Biosystems), o cDNA foi pré amplificado utilizando-se os *primers* que serão descritos nas tabelas IV.2 e IV.3. Para os *primers* do sistema TaqMan®, não foram adicionados as sondas, apenas os pares de oligonucleotídeos. Para a pré-amplificação foi necessário o preparo de um pool de todos os genes utilizados neste trabalho na concentração de 450nM. Para a reação de pré-amplificação, utilizou-se 1 μL do mix de *primer*, 4 μL de cDNA e 5 μL do TaqMan® PreAmp Master Mix (2x). A reação teve início com uma desnaturação a 95°C por 10 minutos e 14 ciclos de 95°C por 15 segundos, 57°C por 45 segundos e 60°C por 4 minutos.

4.3.3.4. PCR em tempo real

As amplificações foram realizadas em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System). Nas reações para a quantificação dos genes BAX, BCL₂, ITM2B, PI3KAC, PRDX1,

gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores e sondas Taqman®, sintetizadas pela Applied Biosystems. Os oligonucleotídeos iniciadores e sondas dos referidos genes estão apresentados na tabela IV.2. Nas reações de amplificação, foi utilizado TaqMan® 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,9 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,25 µM da sonda TaqMan® em reação de 20µL. A reação teve início com incubação a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi avaliada em duplicata para cada gene. Toda reação de PCR continha um controle negativo.

Tabela IV.2. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas para quantificação relativa dos genes relacionados com a morte celular programada.

Gene	Seqüência (5´- 3´)
<i>GAPDH</i>	AAGGCCATCACCATCTTCCA CCACTACATACTCAGCACCAGCAT VIC-AGCGAGATCCTGCCAACATCAAGTGG-TAMRA
<i>PI3KCA</i>	CCCAAGAATGCACAAAGACAAGA GCCGAATAGCTAGATAAGCCTTGTA 6FAM-CTGAAACCTCTCAAATTC-MGBNFQ
<i>PRDX1</i>	CCAGATGGTCAGTTCAAGGATATCA ACAAAGGTGAAGTCAAGTGGGTAAA 6FAM-CTGACTACAAAGGAAAATAT-MGBNFQ
<i>BAX</i>	CGCCGAGATGTCCAGTCA TGGCGAAGCGTTCCCT 6FAM-CCTGACGCCCTTCACC-MGBNFQ
<i>BCL</i>	CTCCCCGAGAGGTCTTTTTCC CCCGGCCCCAGTTGAAG 6FAM-TTGCCGTCAGAAAAC-MGBNFQ
<i>ITM2B</i>	GTCCCAGAGTTTGCAGATAGTGA GGAATCACATAGCACTTATCCAGGTT 6FAM-CATGACTTCAACAAGAACT-MGBNFQ

Para a análise dos genes NRF-1, TFAM, COXI e GAPDH foi utilizado Power SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 0,15mM, 0,20mM, 0,20mM e 0,15mM de cada par de oligonucleotídeos iniciadores (NRF-1, TFAM, COXI e GAPDH, respectivamente), em reação de 20mL. As condições de termociclagem incluíram um passo inicial a 50°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 95°C por 10 minutos e 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, 57°C por 45 segundos e 60°C por 1 minuto. A curva de dissociação foi iniciada em 60°C com +0,1°C de incremento até atingir 95°C. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na quantificação dos genes NRF-1, TFAM, COXI e GAPDH estão descritos na tabela IV.3. Cada amostra foi avaliada em duplicata para cada gene. Toda reação de PCR continha um controle negativo.

Tabela IV.3. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas para quantificação relativa dos genes relacionados com a morte celular programada.

Gene	Seqüência (5´- 3´)
<i>GAPDH</i>	AAGGCCATCACCATCTTCCA CCACTACATACTCAGCACCAGCAT
<i>NRF1</i>	CCCAAAGTGGAGCACATGG GTTAAGTATGTCTGAATCGTC
<i>MTTFA</i>	CAAATGATGGAAGTTGGACG AGCTTCCGGTATTGAGAC
<i>COXI</i>	AAATAATATAAGCTTGTGACTCC TCCTAAAATTGAGGAACTCC

4.3.3.5. Análise dos dados da PCR

Para a validação dos genes, consideraram-se os dados das curvas-padrão com zigotos, em 5 diluições seriadas de 1:4 (figura IV.4). A partir da inclinação da curva ou “slope”, pôde-se calcular a eficiência de amplificação ($E = 10^{(-1/\text{slope})-1}$) em cada gene estudado. Após este cálculo, o gene alvo e endógeno foram comparados por diferença de CT e realizaram-se mais uma curva, onde o slope da comparação entre os genes deveria ser menor que 0,1

para que os genes comparados pudessem ser considerados com a mesma eficiência (figura IV.5).

Figura IV.4: Curva padrão de amplificação para o gene GAPDH, por PCR em tempo real para zigotos em diluições seriadas de 1:4

Figura IV.5: Em A e B: Cálculo de eficiência dos genes COX e GAPDH baseado no *slope*. C: Diferença de CT dos dois genes em estudo para a validação da comparação relativa entre ambos.

Para todos os genes, foi estabelecida a mesma linha de “threshold” no ponto médio da amplificação exponencial. As razões de expressão foram normalizadas pela razão de expressão do controle endógeno (*GAPDH*). As diferenças nas freqüências dos transcritos dos genes foram calculadas pelo método comparativo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para isso, foi realizado primeiramente a média as duplicatas das amostras e a diferença entre a média dos Ct do gene alvo e gene endógeno (ΔCt). Após isso, fez-se a média dos ΔCt para o grupo controle (ΔCt médio) e foi feita a diferença entre ΔCt e ΔCt médio para cada amostra. E assim, finalizou-se com a seguinte fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Após este cálculo, houve a normalização dos dados com a média do controle de cada tempo estudado.

4.3.4. Determinação do número de cópias de DNAm_t

4.3.4.1 Lise dos embriões

O DNA total dos embriões estocados foi obtido com base no protocolo descrito por Wan (2002). Resumidamente, os embriões foram digeridos a 55 °C por 60 min utilizando-se 2,0 µg de proteinase K e 1,0% de triton X-100 (v/v) em solução tampão para PCR (*Taq* DNA Polymerase, Invitrogen®) em um volume final de 5 µL. A proteinase K foi em seguida inativada a 100 °C por 5 min. O volume de 5 µL de lisado foi por fim diluído 10 vezes em água milli-Q.

4.3.4.2 Quantificação do número de cópias de DNAm_t

Para determinação do número de cópias de DNAm_t das amostras foi utilizada uma curva padrão construída a partir de uma quantidade conhecida de plasmídeo bacteriano contendo parte do DNAm_t como inserto.

Para amplificação do DNAm_t foi utilizado um termociclador de PCR em tempo real ABI-7500 (Applied Biosystems) e um sistema TaqMan® composto pelos oligonucleotídeos senso (5'-3') GCC CTA GAA CAG GGC TTA GT e anti-senso (5'-3') GGA GAG GAT TTG AAT CTC TGG e pela sonda (5'-3') AAG GTG GCA GAG CCC GGT AAT TGC portadora do fluorocromo *reporter* FAM (6-carboxi-fluoresceína), ligado à extremidade 5', e do *quencher* BHQ1 ligado à extremidade 3'. A reação de PCR foi realizada na presença de 0,9 µM de cada *primer*, 125 nM da sonda e 10 µL de Mastermix (TaqMan® Universal PCR Mastermix, Applied Biosystems) com concentração de 10 nM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 nM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada dNTP, 0,625 U de AmpliTaq Gold DNA polimerase e 0,25 U de AmpErase UNG, em volume final de reação de 20 µL. A amplificação foi realizada utilizando-se 5 µL do volume de lisado e cada amostra foi avaliada em duplicata. As condições de reação foram 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 50 ciclos a 95 °C por 20 s e 63 °C por 1 min. Em cada corrida uma curva padrão com concentração inicial igual a 10⁷ cópias seguida por diluição serial de 1:10 até 10³ também foi amplificada (figura IV.6).

Figura IV.6: Curva padrão de amplificação para a quantificação de DNAm por PCR em tempo real em diluições seriadas de 10^3 a 10^7 .

4.4. Análise Estatística

O efeito dos tratamentos suplementado e depletado sobre o potencial de desenvolvimento a blastocisto foram avaliados em relação ao controle considerando-se 11 repetições por tratamento. A taxa de embriões clivados até 72 horas, taxa de 8 células e taxa de blastocistos às 168 horas foram expressos em relação ao número total de zigotos cultivados. Como não respeitam as premissas de um teste paramétrico, foi utilizado o teste de qui-quadrado. Um nível máximo de 5% de significância foi admitido.

Na análise de confocal, foi avaliada a atividade mitocondrial em relação ao controle considerando-se 6 repetições para 0 hora, 4 repetições para 3, 72 horas e 168 horas. Foi considerado delineamento inteiramente casualizado, sendo os fatores principais (tempo) e tratamento (controle centrifugado, controle aspirado, suplementado e depletado). As porcentagens médias das densidades integradas de cada tratamento (centrifugado, aspirado, depletado e suplementado) foram normalizadas em relação ao grupo controle as 0 horas de cada repetição. As porcentagens média das densidades integradas das biópsias foram calculadas pela média do controle aspirado somado com a média das biópsias dos respectivos controles. Como os dados respeitaram as premissas de um teste paramétrico, foram comparados entre os tratamentos

por ANOVA seguido de teste de Tukey para comparação de médias. Um nível máximo de 5% de significância foi admitido.

Para análise de TUNEL, foi avaliada a quantidade de núcleos fragmentados e núcleos totais em relação ao controle considerando-se 3 repetições por tratamento. Foi considerado delineamento inteiramente casualizado sendo as variáveis, núcleos fragmentados e números totais de núcleos. Como os dados respeitaram as premissas de um teste paramétrico, foram comparados entre os tratamentos por ANOVA seguido de teste de Tukey para comparação de médias. Um nível máximo de 5% de significância foi admitido.

Para as análises de tempo real de expressão gênica, todos os genes foram corrigidos pelo controle do respectivo dia para cada um dos genes estudados. Foi utilizado o procedimento PROC GLM do programa computacional *Statistical Analysis System* (SAS, 1995). Como os dados respeitaram as premissas de um teste paramétrico, foram comparados entre os tratamentos por ANOVA seguido de teste de Duncan para comparação de médias entre os diferentes tempos. Um nível máximo de 5% de significância foi admitido.

Para as análises de tempo real para quantificação de DNAm_t, as amostras foram normalizadas com o controle as 0 horas de desenvolvimento e foram analisados conforme foi descrito acima para a expressão gênica.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do desenvolvimento embrionário

Na tabela V.1 são apresentadas às taxas de clivagem e taxas de desenvolvimento embrionário até 72 horas para os cinco tratamentos propostos. Ao todo 1077 embriões foram produzidos visando determinar as taxas de desenvolvimento até o estágio de 8 células e taxas de clivagem. Parte destes embriões foi destinada à coloração pelo mitotracker red® e parte para a estimativa de frequência dos transcritos em tempo real.

Tabela V.1: Números, médias (%) e erros padrão da média dos tratamentos controle (C), controle centrifugado (CC), controle aspirado (Ca), depletado (D) e suplementado (S) dos embriões clivados e com 8 células as 72h.

Grupos	Número de oócitos	Embriões clivados		Embriões 8 células	
		Numero (N)	%*	Numero (N)	%**
C	290	243	83,01±3,83 ^{A, B}	147	52,50±4,86 ^A
CC	188	144	76,20±6,23 ^{B, C}	75	41,59±6,43 ^{B, C}
Ca	207	178	85,28±4,81 ^A	99	49,28±6,38 ^{A, B}
D	226	177	77,69±3,93 ^B	85	36,98±6,64 ^{B, C}
S	166	113	66,48±6,45 ^C	54	33,15±4,58 ^C

* Taxa de clivados calculada pelo número de zigotos

** Taxa de 8 células calculada pelo número de zigotos

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

O grupo C (83,01±3,83) não apresentou diferença na taxa de clivagem ($p > 0,05$) quando comparado aos grupos CC (76,20±6,23), Ca (85,28±4,81) e D (77,69±3,93), apresentando apenas diferença com o grupo S (66,48±6,45). Quanto à taxa de formação de embriões com 8 células, o grupo C (52,50±4,86) não apresentou diferença ($p > 0,05$) quando comparado ao grupo Ca (49,28±6,38), embora apresentou diferença quando comparado aos grupos CC (41,59±6,43), D (36,98±6,64) e S (33,15±4,58). Na taxa de clivagem e desenvolvimento até o estágio de 8 células, observa-se no grupo suplementado um efeito de transferência do ECRM.

A mitocôndria tem papel importante no desenvolvimento embrionário. Alguns autores sugerem que o número de mitocôndrias presentes no oócito

maturado é correlacionado com a competência de desenvolvimento a blastocisto (DUMOLLARD; DUCHEN, CARROLL, 2007), entretanto esta teoria foi contraposta recentemente (CHIARATTI *et al.* 2010)

Neste período de avaliação, os embriões bovinos estão no período de transição materno zigótica, como já foi relatado por muitos autores (VANBLERKOM; SINCLAIR; DAVIS, 1998; HARVEY *et al.* 2004; MEIRELLES *et al.* 2004; ACTON *et al.* 2004).

É neste período que a mitocôndria sofre processo de diferenciação estrutural (subcelularmente, as mitocôndrias passam de esféricas, com poucas cristas para alongadas com aumento de número de cristas) e mudanças metabólicas (aumento de atividade e níveis de produção de ATP), para que o embrião possa prosseguir seu desenvolvimento (VANBLERKOM; SINCLAIR; DAVIS, 1998; SATHANANTHAN; TROUNSON, 2000).

El Shourbagy e colaboradores (2006) descreveram que o embrião de camundongos apresentam ausência de replicação de DNAm_t durante a clivagem. Em contrapartida, existem relatos que a replicação pode ocorrer apenas em embriões em estágio de eclosão (VANBLERKOM; SINCLAIR; DAVIS, 1998). Estudos tendo como modelo animal o camundongo mostrou que as taxas de DNAm_t mantêm-se constante sugerindo que a taxa de síntese e degradação são semelhantes, havendo portanto, um “turnover” mitocondrial até o período de eclosão (MCCONNELL; PETRIE, 2004).

Os embriões bovinos apresentam um diferente comportamento em relação à replicação mitocondrial. Smith e colaboradores (2005) mostraram que a amplificação do DNA mitocondrial ocorre após o período de compactação, sendo que, o número de cópias se mantém constante, possivelmente, por haver um “turnover”.

Embora a replicação se mantenha constante em camundongos, existe um pequeno período (de 1 a 2 células), em que o DNA mitocondrial pode ser alterado por fatores ambientais (MCCONNELL; PETRIE, 2004). Comparando estes achados com embriões bovinos, este período seria entre 4-8 células, período próximo à ativação do genoma embrionário.

Neste trabalho, a manipulação do ECRM entre os embriões bovinos reduziu a taxa de clivagem e número de 8 células nos grupos depletados e suplementados provavelmente por ser um período particular do embrião

bovino, em que este requer reservas mitocondriais maiores para realizar suas mudanças morfológicas e metabólicas e apresenta sensibilidade na replicação do DNAm.

Os embriões suplementados sofreram a retirada citoplasmática e a suplementação com ECRM. A retirada de citoplasto não apresentou efeitos, já que o grupo controle aspirado apresentou taxas semelhantes de clivagem e 8 células quando comparados com o controle.

Entretanto, a suplementação com ECRM ocasionou um efeito negativo sobre o desenvolvimento. Há a possibilidade de ter ocorrido um "desligamento" do excesso de mitocôndrias, restando apenas algumas mitocôndrias que conseguem manter a homeostase celular e ainda mantêm o potencial de membrana alto (como será apresentado no decorrer deste trabalho). El Shourbagy e colaboradores (2006) mostraram que há a necessidade de número suficiente de mitocôndrias para manter a função metabólica da célula.

Alternativamente, com o aumento na quantidade de organelas, pode ter ocorrido um aumento na quantidade de EROs, causando assim uma diminuição nas taxas de clivagem e 8 células, visto que, a mitocôndria é um dos maiores produtores de EROs e o aumento pode acarretar em morte (WANG *et al.* 2009)

Na tabela V.2 são apresentadas às taxas de desenvolvimento embrionário até 168 horas para os cinco tratamentos propostos. Ao todo 2341 embriões foram produzidos visando determinar as taxas de desenvolvimento embrionário para os diferentes tratamentos. Parte destes embriões foi destinada à estimativa do Ψ_{mm} de mitotracker red®, para a técnica de TUNEL e para a estimativa de expressão gênica.

Tabela V.2: Números, médias (%) e erros padrão da média dos tratamentos controle (C), controle centrifugado (CC), controle aspirado (Ca), depletado (D) e suplementado (S) para as taxas de blastocisto com 168 h cultivados em meio SOF.

GRUPOS	Número de zigotos	Blastocistos	
		Numero (N)	%*
C	687	274	40,51 ± 4,04 ^A
CC	392	124	31,85 ± 4,97 ^B
Ca	397	165	41,81 ± 4,44 ^A
D	507	110	21,04 ± 4,34 ^C
S	358	67	19,09 ± 5,04 ^C

* Taxa de blastocistos calculada pelo número de zigotos

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

O grupo C (40,51 ± 4,04) não apresentou diferença na taxa de blastocisto ($p > 0,05$) quando comparado ao grupo Ca (41,81 ± 4,44). O grupo C e Ca apresentaram diferença na taxa de blastocisto ($p > 0,05$) quando comparados aos grupos D (21,04 ± 4,34) e S (19,09 ± 5,04). O grupo CC (31,85 ± 4,97) apresentou diferença na taxa de blastocisto ($p > 0,05$) quando comparado aos demais grupos. Na taxa desenvolvimento a blastocisto, observa-se uma diferença significativa na taxa de blastocisto ($p > 0,05$) quando há a comparação entre os grupos CC e D; Ca e S; respectivamente, mostrando assim um efeito da centrifugação e da transferência do ECRM.

Sabe-se que a remoção de citoplasma de zigotos afeta o desenvolvimento a blastocisto bem como o número total de células (WESTHUSIN *et al.* 1996)

Diversos autores sugerem que a quantidade de mitocôndrias e/ou de DNAm^t afeta a competência do oócito em ser fecundado e gerar um embrião viável (REYNIER *et al.* 2001; TAMASSIA *et al.* 2004; EL SHOURBAGY *et al.* 2006). Este efeito pode ocorrer durante o crescimento e maturação do oócito (VAN BLERKON; DAVIS; LEE, 1995; STOJKOVIC *et al.* 2001; SPIKINGS; ALDERSON; ST JOHN, 2006) ou ao longo do desenvolvimento pré-implantação (THOMPSON *et al.* 2000).

Não foi determinada a quantidade máxima de mitocôndrias que podem ser transferidas sem comprometer a integridade ou potencial de desenvolvimento dos oócitos, embora fossem relatados efeitos letais em embriões de camundongos com hipermetabolismo mitocondrial

(VANBLERKOM, SINCLAIR; DAVIS, 1998). É importante enfatizar que não se sabe o efeito dos componentes citoplasmáticos e macromoléculas que são levados juntamente com o ECRM no desenvolvimento embrionário.

Existem controvérsias quanto à correlação positiva entre competência de desenvolvimento e quantidades de DNA mitocondrial e atividade de ATP em bovinos, pois existem fatores como o haplótipo que também podem influenciar a competência embrionária (SMITH; THUNDATHIL; FILION, 2005).

Além disso, como já foi observado anteriormente com o grupo suplementado, pode ter ocorrido um aumento das EROs, levando consequentemente a uma diminuição no potencial de desenvolvimento a blastocisto.

5.2. Avaliação do Ψ_{mm} pela coloração MitoTracker red®

Foi realizada a coloração com *MitoTracker red®* visando estimar a atividade mitocondrial. A técnica foi aplicada em zigotos e biópsias 0 e 3 horas após a fusão do grupo suplementado e em embriões após 72 e 168 horas de cultivo. A figura V.1. contém dados das densidades normalizadas da fluorescência do MitoTracker red ® em relação ao controle 0 hora de cada repetição dos tratamentos controle, controle centrifugado, controle aspirado, depletado e suplementado. A tabela V.3 contém dados de porcentagem das médias das densidades integradas normalizadas nos tratamentos controles aspirado e sua respectiva biópsia, além da biópsia retirada do grupo suplementado. As figuras V.2 e V.3 mostram os resultados da coloração dos zigotos submetidos à coloração de *MitoTracker red®*.

Figura V.1. Zigotos com 0 hora, 3,72 e 168 horas de desenvolvimento corados com 0,5μM do corante *MitoTracker red® CMXRos* por 30 minutos, fixados e analisados por microscopia confocal. (A) Zigoto controle; (B) Zigoto Controle Centrifugado; (C) Zigoto controle aspirado; (D) Zigoto depletado submetido à centrifugação e retirada do ECRM (zigoto doador) e (E) Zigoto suplementado submetido à retirada de uma biópsia de aproximadamente 7,8% de citoplasma do zigoto e suplementado com o ECRM oriundo do doador (zigoto receptor). A barra em (A) equivale a 75 μm.

Figura V.2: Densidades normalizadas da fluorescência do MitoTracker red ® (indicativo de potencial de membrana mitocondrial) em relação ao controle 0 hora de cada repetição dos tratamentos controle, controle centrifugado, controle aspirado, depletado e suplementado. ^{A-B-C} Letras diferentes na mesma linha apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). ^{a-b-c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela V.3.: Porcentagem média das densidades integradas e erro padrão da porcentagem média da fluorescência do MitoTracker red ® (indicativo de potencial de membrana mitocondrial) dos tratamentos controle aspirado e sua respectiva biópsia e biópsia retirada do tratamento suplementado.

Tratamentos	N*	0H**	N*	3H**
Controle Aspirado	24	90,40±7,11 ^A	8	89,30±6,78 ^A
Biópsia controle aspirado	18	10,98±1,65 ^B	6	11,35±2,84 ^B
Biópsia suplementado	15	12,18±1,57 ^B	11	8,87±1,01 ^B

* número de embriões analisados nos diferentes grupos

** média da porcentagem da densidade integrada calculada com a razão de cada densidade pela média do controle de cada repetição.

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

Figura V.3. Zigotos controles corados com 0,5µM do corante *MitoTracker red*® CMXRos por 30 minutos, fixados e analisados por microscopia confocal. (A) Zigoto controle aspirado com 0 hora; (B) Biópsia retirada do controle aspirado (aproximadamente 7,8% de citoplasma do zigoto) com 0 hora; (C) Zigoto controle aspirado com 3 horas; (D) Biópsia retirada do controle aspirado (aproximadamente 7,8% de citoplasma do zigoto) com 3 horas. A barra em (A) equivale a 75 µm.

Os estudos iniciais sobre a intensidade de fluorescência medidas entre os oócitos e as biópsias indicam que aproximadamente 10% (tabela V.3) do potencial de membrana mitocondrial estavam presentes na biópsia tanto do embrião do Ca quanto na biópsia do grupo que receberá o ECRM (grupo S). Estes dados em comparação aos 7,5% do citoplasma retirado indicam que a técnica utilizada para medir a atividade mitocondrial é válida, principalmente dado há relatos da distribuição das organelas no citoplasma, sendo que as mitocôndrias distribuídas periféricamente (TARAZONA, 2006) poderiam ser responsáveis pela pequena diferença entre o volume estimado da biópsia de 7,5 e 10% do Ψ_{mm} da biópsia

A análise da figura V.2 permite observar que houve diferença entre os tempos 0, 3, 72 e 168 horas nos diferentes tratamentos. O Ψ_{mm} é determinante de atividade mitocondrial e suas funções estão relacionadas principalmente com produção de ATP e manutenção da atividade da fosforilação oxidativa (VANBLERKOM; DAVIS, 2007). Um aumento do Ψ_{mm} resultante do aumento da quantidade de organela, conseqüentemente poderia levar a um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS), visto que, a mitocôndria é um grande produtor deste (GENOVA *et al.* 2004).

Baixas concentrações de EROS são importantes para regular o funcionamento das células, particularmente em embriões na fase de pré-implantação (HARVEY, 2007). Portanto, a produção aumentada de EROS é desfavorável para o desenvolvimento embrionário por alterar a atividade metabólica do embrião (estado de óxido-redução, HARVEY *et al.* 2002).

Todos os grupos apresentaram uma redução do potencial de membrana entre os tempos 0, 3 e 72 horas, sendo encontrada uma diferença ($p>0,05$) entre os tempos 0 e 3 horas e 0 e 168 horas. Tarazona e colaboradores (2006) relataram que 92% dos embriões apresentaram atividade reduzida ou intermediária até as 50 horas de desenvolvimento.

Esta baixa atividade foi atribuída a uma proteção adaptativa do embrião contra as EROs que são eliminadas graças à produção de glutathionas e peroxidases produzidas e armazenadas durante a maturação *in vitro*. Caso a atividade se mantivesse elevada, o embrião morreria por não poder eliminar o excesso de EROs produzidos (TAMASSIA *et al.* 2004), dados estes que corroboram com os resultados apresentados neste trabalho.

Entre 72 e 168 horas, todos os tratamentos apresentaram um aumento no potencial de membrana mitocondrial, confrontando com os dados da literatura que indicam que o embrião mantém um limiar de atividade de OXPHOS e reduz a atividade mitocondrial. A partir da ativação do genoma embrionário, a maior fonte energética do embrião advém do processo glicolítico (TARAZONA *et al.* 2006).

No entanto, sabe-se que os embriões bovinos são dependentes do processo de OXPHOS em todos os estádios de desenvolvimento (THOMPSON *et al.* 2000) para a síntese protéica, produção de blastocle (LEESE, 1991; THOMPSON, 1996) e para um funcionamento apropriado do estágio de óxido-redução do embrião. Portanto, possivelmente os embriões aumentaram o Ψ_{mm} com intuito de melhorar a função energética embrionária, já que o Ψ_{mm} está relacionado com a atividade fosforilativa mitocondrial (ZHAO *et al.* 2009).

Vale ressaltar que os embriões produzidos neste trabalho foram cultivados com baixa tensão de oxigênio (5% O₂) e no trabalho de Tarazona e colaboradores (2006) não foi mencionado a tensão de oxigênio trabalhada.

O grupo suplementado apresentou um aumento do Ψ_{mm} às 168 horas, causando assim, um aumento da quantidade de EROs (TARAZONA, 2006), possivelmente relacionado com o aumento do número de células com fragmentação de DNA (TUNEL positivas; tabela V.4.)

O grupo centrifugado apresentou uma redução de Ψ_{mm} , provavelmente porque nos primeiros horários após centrifugação foi sinalizado para o núcleo a polarização das mitocôndrias, e após as 3 horas de cultivo, dada a existência de regiões sem mitocôndrias, foi sinalizado a necessidade de maior atividade mitocondrial para a sobrevivência. Nas biópsias (tabela V.3.), mesmo sem controle nuclear, o Ψ_{mm} se manteve até 3 horas (período estudado), não reduzindo sua atividade provavelmente, por possuir substratos suficientes para manter o Ψ_{mm} .

No grupo depletado, embora tenha sido retirado o ECRM, um mecanismo de compensação rapidamente restabeleceu o Ψ_{mm} , nos primeiros horários após a manipulação. Às 168 horas, os embriões depletados apresentaram um aumento do Ψ_{mm} , embora menor que do grupo suplementado, indicando um efeito da depleção/suplementação sobre o desenvolvimento embrionário.

No grupo aspirado, durante a manipulação do citoplasto pode ter ocorrido à aspiração de mitocôndrias que resultou em uma redução da atividade com 168H. VanBlerkom (2008) relatou que a quantificação mitocondrial com sondas fluorescentes pode ser limitada, pois proporções consideráveis de mitocôndrias em oócitos podem estar inativadas nos blastocistos (“mitocôndrias escuras”). Esta baixa atividade pode explicar a diminuição de Ψ_{mm} no grupo aspirado e também poderia justificar a manutenção do Ψ_{mm} no grupo suplementado.

5.3. Avaliação do número total de núcleos e fragmentação

Foram avaliadas as médias de núcleos totais e taxa de núcleos positivos de embriões em dia 7 de desenvolvimento (tabela V.4 e figura V.4).

Tabela V.4: Fragmentação nuclear estimada pelo TUNEL.

GRUPOS	Número de embriões	Média de Núcleos Totais*	Taxa de núcleos Positivos*
Controle	37	137,86 $\pm$ 6,70 ^A	10,53 $\pm$ 1,31 ^{A,B}
Centrifugado	40	126,63 $\pm$ 7,38 ^{A,B}	6,57 $\pm$ 1,08 ^B
Aspirado	44	112,27 $\pm$ 5,30 ^{B,C}	10,11 $\pm$ 1,25 ^B
Depletado	14	101,64 $\pm$ 12,37 ^C	11,20 $\pm$ 1,60 ^{A,B}
Suplementado	19	102,21 $\pm$ 7,75 ^C	16,08 $\pm$ 2,44 ^A

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

*média $\pm$ erro padrão

A média de núcleos totais do grupo controle (137,86 $\pm$ 6,70) foi semelhante ao grupo centrifugado (126,63 $\pm$ 7,38) e diferiu ($p > 0,05$) dos grupos aspirado (112,27 $\pm$ 5,30), depletado (101,64 $\pm$ 12,37) e suplementado (102,21 $\pm$ 7,75). Quanto à taxa de núcleos TUNEL positivos, o grupo suplementado (16,08 $\pm$ 2,44) apresentou maior taxa de fragmentação, juntamente com os grupos controle (10,53 $\pm$ 1,31), aspirado (10,11 $\pm$ 1,25) e depletado (11,20 $\pm$ 1,60) e diferiram ($p > 0,05$) do grupo centrifugado (6,57 $\pm$ 1,08). Conclui-se que a manipulação das mitocôndrias (D e S) e a manipulação do citoplasma (CA) do zigoto diminuem a quantidade de núcleos totais e a centrifugação sem a

suplementação com ECRM diminui a taxa de fragmentação nuclear nos blastocistos.

Thouas e colaborador (2004) mostraram em zigotos de camundongos com injúria mitocondrial sub-letal induzida por fotossensibilização que há uma redução significativa do número total de células dos blastocistos, bem como aumento das taxas de aborto, redução do peso fetal entre outros efeitos após transferência intra-uterina dos embriões.

Westhusin e colaboradores (1996) mostraram que a remoção de citoplasma de zigotos afeta o desenvolvimento a blastocisto bem como o número total de célula. Estes dados corroboram com os dados obtidos neste trabalho que mostraram que tanto os embriões que sofreram apenas retirada de citoplasma, como aqueles que foram manipulados visando alterar o número de mitocôndrias apresentaram uma diminuição no número de células totais.

Quanto ao aumento da taxa fragmentação no grupo suplementado, é possível que tenha ocorrido um maior estresse oxidativo nos zigotos que receberam mitocôndrias oriundas de outro zigoto (receptor) aumentando a taxa de fragmentação e reduzindo o número de núcleos totais.

VanBlerkom (2008) lançou a hipótese de que o aumento da quantidade da organela é necessário para um maior desenvolvimento é falha, já que a mitocôndria sofre alterações durante seu período de pré-implantação com o intuito de regular sua atividade metabólica.

Kasimanickam e colaboradores (2006) descreveram que o processo de fragmentação nuclear está associado a um aumento na produção de EROs e quando há uma atividade antioxidante alta, o desenvolvimento celular melhora por não haver um excesso de enzimas em atividade e por haver um balanço de EROs. A diminuição da fragmentação celular encontrada no grupo controle centrifugado pode estar relacionada com um aumento na atividade antioxidante dos embriões como será descrito a seguir, reduzindo assim a quantidade de EROs.

Figura V.4: Fotomicrografia de epifluorescência de embriões com 168 horas submetidos à técnica de TUNEL. Na coluna da esquerda (A) coloração pelo Hoechst 33342 e na coluna da direita (B), coloração com FITC (nucleotídeo marcado), respectivamente: controle positivo; controle negativo; amostra controle (sem tratamento); grupo controle aspirado; grupo controle centrifugado; grupo depletado e grupo suplementado. Nas setas, as células que fluorescem verde pela incorporação do nucleotídeo marcado com o corante FITC. A coloração verde que aparece no citoplasma é *background*.

5.4. Quantificação de cópias de DNAm

Foi realizada a quantificação de DNAm pelo PCR tempo real com o intuito de complementar as informações relativas à quantidade de mitocôndrias. A técnica foi aplicada em zigotos e em embriões após 72 e 168 horas de cultivo. A figura V.5 contém a quantidade relativa de DNAm em relação ao grupo controle do tempo 0 hora dos grupos estudados.

Figura V.5: Quantidade relativa e desvio padrão de DNAm em relação ao grupo controle no tempo 0 hora estimado pelo PCR em tempo real. As barras de erro na coluna de controle indicam variações entre os embriões de cada repetição. ^{A-B-C} Letras diferentes na no mesmo tempo apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). 1u.a corresponde a 1.166.232,06 cópias de DNAm.

A quantidade relativa de DNAm às 0 horas de desenvolvimento do grupo controle aspirado ($0,97 \pm 0,29$) foi semelhante ($p > 0,05$) ao grupo suplementado ($1,04 \pm 0,46$). No mesmo tempo, o grupo CC ($1,32 \pm 0,38$) apresentou diferença ($p > 0,05$) quando comparado ao D ($0,78 \pm 0,31$). O grupo controle ($1,0 \pm 0,40$) diferiu ($p > 0,05$) apenas dos grupos CC e D. Às 72 horas

de desenvolvimento, o grupo controle aspirado ($0,86 \pm 0,47$) foi semelhante ($p>0,05$) ao grupo suplementado ($1,34 \pm 0,48$). No mesmo tempo, o grupo CC ($1,16 \pm 0,36$) não apresentou diferença ($p>0,05$) quando comparado ao D ($1,01 \pm 0,31$). O grupo controle ($1,42 \pm 0,50$) diferiu ($p>0,05$) apenas do grupo CA.

Às 168 horas de desenvolvimento, o grupo controle aspirado ($1,30 \pm 0,62$) foi semelhante ($p>0,05$) ao grupo suplementado ($1,22 \pm 0,46$). No mesmo tempo, o grupo CC ($1,89 \pm 0,76$) não apresentou diferença ($p>0,05$) quando comparado ao D ($1,34 \pm 0,73$). O grupo controle ($1,76 \pm 0,55$) foi semelhante ($p>0,05$) a todos os grupos estudados.

May-Panloup e colaboradores (2005) descreveram que o número de moléculas de DNAm acumuladas no oócito até o final da oogênese é bastante variável. Esta variação pode ser encontrada em oócitos oriundos de um mesmo animal ou de animais diferentes, e sendo assim, a análise do DNAm no oócito e após a fertilização *in vitro* é importante para elucidar a variação existente no embrião ao longo do tempo (TAMASSIA *et al.* 2004).

O grupo suplementado, logo após a avaliação da fusão, apresentou um aumento de DNAm de apenas 4% ($1,04 \pm 0,46$) quando comparado ao grupo controle ($1,0 \pm 0,40$) e de 7% quando comparado ao CA ($0,97 \pm 0,29$). É importante enfatizar que este grupo recebe o ECRM oriundo do grupo depletado no mesmo momento e, portanto, era esperado que houvesse uma suplementação na mesma proporção da depleção mitocondrial, que apresentou uma redução de 30% da quantidade de DNAm ($0,70 \pm 0,31$) quando comparado ao controle e 62% quando comparado ao grupo CC ($1,32 \pm 0,38$).

Acredita-se que com a retirada do citoplasto contendo o ECRM dos embriões do grupo depletado para a suplementação do grupo S, possa ter ocorrido um aumento do estresse oxidativo neste ECRM já que não havia um controle nuclear e não havia tradução, pela ausência de ribossomos, até a fusão com o zigoto. Este estresse pode ter gerado a degradação de mitocôndrias e consequentemente, a redução da quantidade de DNAm.

Na membrana mitocondrial, existe um fosfolípido, cardiolipina, que é normalmente associado ao citocromo c. Quando há um aumento na quantidade de EROs ocorre a peroxidação da cardiolipina, mudança conformacional na membrana mitocondrial, diminuição da atividade do sistema de OXPHOS, fazendo com que a ligação entre citocromo c e membrana torna-se fraca,

induzindo a ativação da cascata do processo de apoptose (YURKOVA *et al.* 2008).

Surpreendentemente, no grupo centrifugado houve um aumento de DNAm_t. Este aumento pode indicar que o zigoto tem toda a maquinaria necessária para realizar a replicação do DNAm_t no início do desenvolvimento embrionário corroborando com o efeito descrito no trabalho de Ferreira e colaboradores (2009).

Com a avaliação ao longo do tempo, observa-se 3 padrões de replicação mitocondrial. O grupo controle e depletado apresentaram um crescimento linear ao longo do desenvolvimento. Os grupos centrifugado e aspirado apresentaram uma diminuição da quantidade de DNAm_t às 72 horas e que foi compensada às 168 horas de desenvolvimento. E o grupo suplementado apresentou um aumento às 72 horas de desenvolvimento seguido por uma redução da quantidade de DNAm_t às 168 horas.

Chiaratti e colaboradores (2010) relatam que embriões mecanicamente depletados foram capazes de se desenvolver normalmente até o estágio de blastocisto e restabeleceram a quantidade de DNAm_t no estágio de blastocisto. Estes dados corroboram parcialmente com os dados deste trabalho em que os embriões depletados foram capazes de restabelecer a quantidade de DNAm_t até o estágio de blastocisto.

Surpreendentemente ocorreu o restabelecimento na quantidade de DNAm_t antes do estágio de blastocisto, como relatado por Chiaratti e colaboradores (2010). Esta replicação pode ter sido antecipada pela baixa quantidade de oxigênio utilizada neste trabalho (5% de O₂), diferentemente, da utilizada no trabalho citado acima (20% O₂), para a manutenção da sobrevivência deste grupo de embriões.

Os embriões suplementados apresentaram inicialmente um aumento inferior ao esperado e não significativo, na quantidade de DNAm_t, embora com 168 horas, a quantidade de DNAm_t apresentou-se inferior em comparação ao grupo centrifugado.

Os grupos centrifugado e aspirado apresentaram uma diminuição da quantidade de DNAm_t às 72 horas. Smith e colaboradores (2005) descreveram que há uma perda de DNAm_t com as clivagens até a AGE e que mudanças em fatores replicacionais e transcrpcionais ocorrem com 8 células. Às 168 horas

houve uma sinalização de replicação, resultando em um aumento do número de cópias do DNAm, embora não significativo em relação ao controle.

O grupo aspirado apresentou uma baixa quantidade de DNAm às 72 horas que pode ser explicada pelo embrião ainda não restabelecer a quantidade de DNAm, devido à aspiração do citoplasma realizada no momento 0 hora. Já às 168 horas, houve o restabelecimento do número de cópias do DNAm.

5.5. Expressão Gênica

A figura V.6. apresenta a expressão relativa dos genes relacionados à atividade mitocondrial e nuclear. As figuras V.7. e V.8. apresentam a expressão relativa dos genes ligados a MCP. Todos os genes tiveram sua expressão em relação ao gene GAPDH. Como houve uma grande variação do gene endógeno ao longo do desenvolvimento, optou-se pela normalização pelo grupo controle de cada tempo. O grupo controle centrifugado às 72 horas não foi apresentado, pois houve falha na obtenção de RNA neste grupo.

Figura V.6: Quantidade relativa e desvio padrão dos genes mtTFA, NRF-1 e COXI em relação ao grupo controle de cada tempo (0, 72 e 168 horas) estimado pelo PCR em tempo real. As barras de desvio na coluna de controle indicam variações entre os embriões de cada repetição. ^{A-B-C} Letras diferentes dentro do mesmo tempo apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Figura V.7: Quantidade relativa e desvio padrão dos genes BAX, BCL e a relação entre eles em relação ao grupo controle de cada tempo (0, 72 e 168 horas) estimado pelo PCR em tempo real. As barras de desvio na coluna de controle indicam variações entre os embriões de cada repetição. ^{A-B-C} Letras diferentes dentro do mesmo tempo apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Figura V.8: Quantidade relativa e desvio padrão dos genes PRDX1, ITM2B e PI3K e a relação entre eles em relação ao grupo controle de cada tempo (0, 72 e 168 horas) estimado pelo PCR em tempo real. As barras de desvio na coluna de controle indicam variações entre os embriões de cada repetição. ^{A-B-C} Letras diferentes dentro do mesmo tempo apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Uma vez que os genes de expressão constitutiva correlacionam-se à quantidade total de poli (A) RNAm, houve uma grande variação do gene endógeno ao longo do desenvolvimento. Esta variação já era esperada, já que foi descrito por Gilbert (2009) que o embrião bovino apresenta uma diminuição da quantidade de RNA às 72 horas e após a ativação do seu próprio genoma, há um aumento da quantidade de RNAm.

Para a avaliação dos experimentos, foi feito um controle de experimento (C) e, além disso, um controle para testar efeito da centrifugação (CC), que neste caso, é o controle mais adequado para comparação com o grupo D, já que o mesmo sofre a centrifugação com o intuito de individualizar a porção do ECRM. Foi realizado um controle de remoção de citoplasma, que neste caso seria o melhor controle para o grupo S, já que o mesmo sofre a retirada de uma porção citoplasmática para receber o ECRM.

Os grupos controles não apresentaram grandes alterações ao longo do desenvolvimento quanto à expressão dos genes mitocondriais e apoptóticos.

O desenvolvimento do grupo CA, já foi descrito uma diminuição na quantidade de DNAm às 72 horas de desenvolvimento e uma redução, embora não significativa do fator NRF1 às 72 horas. Esta redução do potencial parece ser refletida no estágio de 168 horas, no qual o grupo apresentou uma redução do potencial de membrana mitocondrial.

Já no controle centrifugado, inicialmente (0 hora) ocorreu um aumento de DNAm, entretanto, este aumento não foi observado nos genes nucleares que controlam a transcrição e replicação mitocondrial. Às 72 horas, o grupo CC não apresentou alterações significativas na expressão de genes apoptóticos e mitocondriais, embora como já foi discutido anteriormente. Com exceção do aumento na taxa de desenvolvimento até 8 células e no bloqueio embrionário, que irá refletir na diminuição de desenvolvimento á blastocisto às 168 horas de desenvolvimento.

Neste mesmo momento, há um aumento na expressão de COX, NRF1, mtTFA e ITM2B em relação ao controle do experimento. Portanto, houve um estímulo para aumentar a atividade mitocondrial refletida pelo aumento da transcrição dos genes mitocondriais, no entanto, este aumento não refletiu na atividade mitocondrial, mensurada pelo potencial de membrana mitocondrial (figura V.2.). Não há elementos que permitam avaliar a causa e consequência

deste aumento de expressão, visto que o período máximo de avaliação neste trabalho foi às 168 horas de desenvolvimento.

Como já discutido, o grupo depletado às 0 hora de desenvolvimento, apresentou uma redução de 30% da quantidade de DNAm quando comparado ao controle e 62% quando comparado ao grupo CC. A expressão de COXI foi mantida e houve um aumento de mtTFA quando comparado aos grupos C e CC. O potencial de membrana mitocondrial foi mantido apesar da depleção, provavelmente pela ação do gene mtTFA.

Houve um aumento na expressão dos genes PI3K e BCL₂ em relação aos grupos C e CC. Este aumento dos genes anti-apoptóticos pode ter ocorrido por um aumento na expressão do gene ITM2B, que não apresentou diferença significativa devido à grande variação encontrada, mas apresentou sua expressão aumentada em aproximadamente 7 vezes em relação ao controle e 2 vezes em relação ao grupo CC. Apesar da tentativa de sobrevivência, houve um bloqueio às 72 horas, no qual o grupo apresentou uma redução na taxa de desenvolvimento a 8 células.

Às 72 horas, houve um aumento na razão entre BAX/BCL₂, que pode estar relacionado à diminuição na taxa de desenvolvimento a blastocistos. Este bloqueio não ocasionou a diminuição no potencial de membrana mitocondrial. Às 168 horas, a quantidade de DNAm equiparou-se aos demais grupos. Um possível efeito da expressão de NRF-1 pode estar ligado a esta observação assim como encontrado no grupo CC. Todavia, os resultados não foram significativos para melhor embasar esta afirmativa.

Analisando o padrão replicacional dos embriões depletados, acredita-se portanto, que o zigoto possua maquinaria, herdada maternalmente, para a replicação mitocondrial, visto que, o grupo depletado apresentou um aumento na quantidade de mtTFA às 0 horas como reflexo do processo de depleção. Alguns fatores podem estar armazenados no citoplasma e automaticamente, são ligados a replicação mitocondrial.

O grupo S, às 168 horas, apresentou um aumento de potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente, deve ter ocorrido um aumento na produção de ATP estimado pelo aumento de COX e do fator de transcrição mitocondrial, na tentativa de promover a sobrevivência embrionária. Como já foi discutido anteriormente, acredita-se que este grupo tenha recebido uma

grande quantidade de EROs ou outros fatores já “down stream” da cadeia de ativação da apoptose, que possivelmente, aumentou e a proporção de BAX/BCL, levando a uma fragmentação nuclear e diminuição do desenvolvimento embrionário.

Já foi relatado que o aumento na quantidade de EROs ou alta expressão de genes pró-apoptóticos da família BCL₂ pode levar a liberação do citocromo c e ativação da cascata de apoptose (WANG *et al.* 2009; THOUAS, 2004).

CAPÍTULO VI

RESUMO DOS RESULTADOS

Legenda da figura VI.1: Efeito da depleção e suplementação durante a fase de zigoto e blastocisto. Em (A); a aspiração do ECRM resultou na redução na quantidade de DNAm_t, embora não houve efeito no potencial de membrana mitocondrial e expressão de COXI, indicativo da plasticidade da organela em preencher a demanda energética do embrião. Imediatamente, houve um aumento na expressão de mtTFA e dos genes anti-apoptóticos BCL₂ e PI3K causando um restabelecimento na quantidade de DNAm_t às 72 horas e uma tentativa de proteção contra o processo de apoptose. Entretanto, os embriões depletados obtiveram baixa taxa de desenvolvimento a blastocisto comparado ao CC e o blastocisto apresentou uma diminuição do número de células e um aumento na expressão de BCL₂ e poucas células TUNEL positivas. Em (B); a transferência do ECRM obtido em (A) surpreendentemente, não causou uma suplementação de DNAm_t e não houve outras diferenças no estágio de zigoto. Entretanto, estes embriões apresentaram baixa taxa de desenvolvimento a blastocisto e um menor número de células quando comparado aos controles. Estes embriões mostraram um aumento na atividade mitocondrial estimado pelo aumento no potencial de membrana mitocondrial e na expressão de COX e mtTFA causando um aumento na proporção de BAX/BCL₂ e um aumento no número de células TUNEL positivas. Estas alterações observadas no grupo suplementado sugerem que as mitocôndrias do ECRM confirmadas no citoplasto (C) podem ter levado um estresse oxidativo pelo aumento da quantidade de EROs. A ausência de antioxidantes em quantidade compatível com o número de organelas, a ausência de núcleo e maquinaria de tradução pode ter levado ao comprometimento das organelas, que justificaria a manutenção do número de cópias do DNAm_t em (B).

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS FINAIS

7.CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS FINAIS

A variação na quantidade de mitocôndria obtida através da depleção e suplementação diminui o potencial de desenvolvimento embrionário. Entretanto, não há um efeito direto da depleção e suplementação sobre o Ψ_{mm} .

Em relação ao processo de apoptose, a depleção aumentou a expressão dos genes anti-apoptóticos BCL2 e PI3K durante o desenvolvimento embrionário. São, no entanto, necessários mais estudos com o intuito de compreender a repercussão de tal aumento na expressão.

Finalmente, houve uma alteração da razão BAX/BCL₂ nos blastocistos produzidos pelo processo de suplementação. Este aumento da relação BAX/BCL₂ foi acompanhado por um aumento na taxa de núcleos apresentando fragmentação do DNA.

Embora o modelo tenha sido criado para estudar o efeito da variação do número de organelas sobre o desenvolvimento embrionário, houve nitidamente um artefato gerado possivelmente durante a produção do citoplasto contendo ECRM.

Esta situação resultou na impossibilidade de se produzir um zigoto contendo um maior número de organelas viáveis estimado pelo número de cópias de DNAm_t. Este problema limitou as possíveis conclusões em relação à suplementação de mitocôndrias no embrião.

Entretanto, a produção de um citoplasto contendo mitocôndrias livre do controle nuclear e de outros extratos citoplasmáticos, pode representar uma oportunidade para estudos da organela após sua reconstrução.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

- ACTON, B.M.; JURISICOVA, A; JURISICA, I; CASPER, R.F. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.10, n.1, p.23-32, 2004.
- ALCOLEA, M.P.; COLOM, B.; LLADÓ, I.; GARCÍA-PALMER, F.J.; GIANOTTI, M. Mitochondrial differentiation and oxidative phosphorylation system capacity in rat embryo during placentation period. **Reproduction**, Cambridge, v.134, p.147-154, 2007.
- BADR, H., G. BONGIONI; ABDOON, A.S.S.; KANDIL, O.; PUGLISI; R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, Cambridge v.15, n.04, p.355-367, 2007.
- BARACCA, A.; G. SGARBI; SOLAINI, G.; GIORGIO, L. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Amsterdam, v.1606, n.1-3, p.137-146, 2003.
- BETTS, D.H.; KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, n.1, p.171-91, 2001.
- BUCHET, K.; GODINOT, C. Functional F₁-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.273, n.36, p.22983-9, 1998.
- BYRNE, A. T; SOUTHGATE, J. ; BRISON, D. R.; LEESE, H. J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, n.117, p.97-105, 1999.

CANTRELL, D.A. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. **Journal of cell science**, London, v.114, n.8, p.1439-1445, 2001.

CHANDEL, N.S.; SCHUMACKER, P.T. Cells depleted of mitochondrial DNA (p^0) yield insight into physiological mechanisms. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.454, p.173-176, 1999.

CHIARATTI, M.R.; BRESSAN, F.F.; FERREIRA, C.R.; CAETANO, A.R.; SMITH, L.C.; VERCESI, A.E.; MEIRELLES, F.V. Embryo Mitochondrial DNA Depletion Is Reversed During Early Embryogenesis in Cattle. **Biology of reproduction**, New York, v.82, p.76-85, 2010.

COSSARIZZA, A. Measure of mitochondrial membrane potential with fluorescent probe JC-1. CD-ROM Series, vol. 3, **Purdue University Cytometry Laboratories Website**.

<http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/flow/vol3/16/data/page13.htm> (acesso em 29 de junho de 2009)

CUMMINS, J. M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v.115, n. 1, p.S23-S29. 2004.

EL SHOURBAGY, S. H., E. C. SPIKINGS; FREITAS, M.; ST JOHN, J.C. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. **Reproduction**, Cambridge, v.131, n.2, February 1, p.233-245. 2006.

FERREIRA, C.R; BURGSTALLER, J.P.; PERECIN, F.; GARCIA, J.M.; CHIARATTI, M.R.; MÉO, S.C.;MÜLLER, M.; SMITH, L.C; MEIRELLES, F.V.; STEINBORN, R. Pronounced segregation of donor mitochondria introduced by bovine ooplasmic transfer to the female germ-line. **Biology of Reproduction**, New York, in press, 2009.

FERREIRA, C.R.; MEIRELLES, F.V.; YAMAZAKI, W.; CHIARATTI, M.R.; MÉO, S.C.; PERECIN, F.; SMITH, L.C.; GARCIA, J.M. The Kinetics of Donor Cell DNAm in Embryonic and Somatic Donor Cell-Derived Bovine Embryos.

Cloning and stem cells, Larchmont, v. 9, n. 4, 2007.

FERREIRA, C.R. **Controle da Herança Mitocondrial Em Embriões Bovinos Micromanipulados**; 2006. 157f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2006.

FLEISCHER, A., AYLLON, V., DUMOUTIER, L., RENAULT, J.C., REBOLLO, A. Proapoptotic activity of ITM2Bs, a BH3-only protein induced upon IL-2-deprivation which interacts with Bcl-2. **Oncogene**, Basingstoke, v. 21, p. 3181-3889, 2002a.

FLEISCHER, A.; AYLLON, V.; REBOLLO, A. ITM2Bs regulates apoptosis by inducing loss of mitochondrial membrane potential. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.32, p.3498-3505, 2002b.

FLEISCHER, A. E A. REBOLLO. Induction of p53-independent apoptosis by the BH3-only protein ITM2Bs. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.557, n.1-3, p.283-287. 2004.

GENOVA, M.L.; PICH, M.M., BERNACCHIA, A.; BIANCHI, B.; BIONDI, A.; BOVINA, C.; FALASCA, A.I.; FORMIGGINI, G.; CASTELLI, G.P.; LENA, Z. G. The Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Relation to Aging and Pathology. **Annals New York academy of science**, New York, v. 1011, p. 86–100, 2004.

GILBERT, I.; SCANTLAND, S.; SYLVESTRE, E.; GRAVEL, C.; LAFLAMME, I.; SIRARD, M.-A.; ROBERT, C. The Dynamics of Gene Products Fluctuation During Bovine re-Hatching Development. **Molecular Reproduction & Development**, New York, v. 76, p. 762-772, 2009.

GJORRET, J. O.; KNIJN, H. M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.; MADDOX-HYTTEL, P. Chronology of Apoptosis in Bovine Embryos Produced In Vivo and In vitro. **Biology of Reproduction**, New York, v.69, n.4, October 1, p.1193-1200. 2003.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. REDOX Regulation of early development. **Reproduction**, Cambridge, v.123, p.479-486, 2002.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; PANTALEON, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, New York, v.71, p.1108-1119, 2004.

HARVEY, A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98 113–128, 2007.

HATEFI, Y. The Mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v.54, p.1015-69, 1985

HSIEH, R.-H.; AU, H.-K.; YEH, T.-S.; CHANG, S.-J.; CHENG, Y.-F.; TZENG, C.-R.; Decreased expression of mitochondrial genes in human unfertilized oocytes and arrested embryos. **Fertility and sterility**, New York, v.81, s.1, p.912-918, 2004.

HUA, S.; ZHANG, Y ; LI, X.; MA, L.; CAO, J.; , DAI, J.; LI, R. Effects of Granulosa Cell Mitochondria Transfer on the Early Development of Bovine Embryos In vitro **Cloning and stem cells**, Larchmont, v.9, n. 2, 2007.

JEONG, W.J.; CHO, S.J.; LEE, H.; DEB, G.; LEE, Y.; KWON, T.; KONG, I. Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. **Theriogenology**, Los Altos, 2009.

JOUSAN, F. D.; DE CASTRO E PAULA, L. A.; BRAD, A.M.; ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Relationship between Group II Caspase Activity of Bovine Preimplantation Embryos and Capacity for Hatching. **The Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.54, n.3, p.217-220, 2008.

KASIMANICKAM, R.; PELZER, K. D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W. S.; THATCHER, C. D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, Los Altos, v. 65, p.1407-1421, 2006

KAMEYAMA, Y.; FILION, F.; YOO, J.G.; SMITH, L.C. Characterization of mitochondrial replication and transcription control during rat early development *in vivo* and *in vitro*. **Reproduction**, Cambridge, v.133, p.423-432, 2007.

KNIJN, H. M., GJORRET, J. O.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VAN DER WEIJDEN, B.C, MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S. J. Consequences of In Vivo Development and Subsequent Culture on Apoptosis, Cell Number, and Blastocyst Formation in Bovine Embryos. **Biology of reproduction**, New York, v.69, n.4, October 1, 2003, p.1371-1378, 2003.

KUMAR, S.; VAUX, D. L. APOPTOSIS: A Cinderella Caspase Takes Center Stage. **Science**, Washington, v.297, n.5585, August 23, 2002, p.1290-1291, 2002.

LEE, D.Y.; CLAYTON, D.A. Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. **J Biol Chem**, v.273: p.30614-30621, 1998.

LEESE, H.J. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. In: MILLIGAN, S.R. **Oxford reviews of reproductive biology**. 13^a ed.: Oxford, UK: Oxford University, p. 35-72, 1991

LEYENS, G.; DONNAY, I; KNOOPS, B. Cloning of bovine peroxiredoxins--gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat,

mouse and primate peroxiredoxins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.136, n.4, p.943-955, 2003.

LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 69, n. 3, p.243-51, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using relative quantitative PCR and the 2-DDC T method. **Methods**, San Diego, v.25, p.402-408, 2001.

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

MAY-PANLOUP, P., CHRETIEN, M. F.; JACQUES, C; VASSEUR, C. ; MALTHIERY, Y; REYNIER, P. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. **Human Reproduction**., Oxford, v.20, n.3, March 1, 2005, p.593-597, 2005.

MCCONNELL, J.M; PETRIE, L. Mitochondrial DNA turnover occurs during preimplantation development and can be modulated by environmental factors. **Reproductive biomedicine online**, Cambridge, v.9, n.4, p.418-24, 2004.

MEIRELLES, F. V., CAETANO, A. R., WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K.; GARCIA, S. M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.82-83, p.13-20, 2004.

MELKA, M. G., RINGS, F. ; HÖLKER, M.; THOLEN, E.; HAVLICEK, V.; BESENFELDER, U.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Expression of Apoptosis Regulatory Genes and Incidence of Apoptosis in Different

Morphological Quality Groups of In vitro-produced Bovine Pre-implantation Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, 2009.

MIRANDA, L.E.C.; VIARO, F.; CENEVIVA, R.; ÉVORA, P. R. B. A atividade respiratória mitocondrial é um bom parâmetro para a lesão por esquia e reperfusão hepática? **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.42, n.2, p.89-94, 2005.

NAGATA, S. Apoptosis by Death Factor. **Cell**, Cambridge, v.88, n.3, p.355-365, 1997.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.38, p.138-144, 2001.

PARONE, P. A., JAMES, D; MARTINOU, J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochimie**, Paris, v.84, n.2-3, p.105-111, 2002.

PEREZ, G. I., TRBOVICH, A. M.; GOSDEN, R.G.; TILLY, J. L. Reproductive biology: Mitochondria and the death of oocytes. **Nature**, London, v.403, n.6769, p.500-501, 2000.

POULTON, J.; HOLT, I.J. Mitochondrial DNA: does more lead to less? **Nature Genitcs**, New York, v.8, p.313-315, 1994.

REYNAUD, K.; NOGUEIRA, D.; CORTVRINDT, R; KURZAWA, R; SMITZ, J. Confocal Microscopy: principles and applications to the field of reproductive biology. **Folia Histochemica et cytobiologia**, Warszawa, v.39, n.2, p. 75-85, 2001.

REYNIER, P., MAY-PANLOUP, P.; **CHRÉTIEN, M-F.; MORGAN, C.J.; JEAN, M; SAVAGNER, F.; BARRIÈRE, P.; MALTHIÈRY, Y.** Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.7, n.5, May 1, 2001, p.425-429, 2001.

RIPAMONTE, P, **Genômica funcional da ativação do genoma e do bloqueio embrionário em bovinos. 2005.** 101f. Tese (doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

SANTOS, T. A.; EL SHOURBAGY, S; ST JOHN, J. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. **Fertility and Sterility**, New York, v.85, n.3, p.584-591, 2006.

SATHANANTHAN, A.H.; TROUNSON, A.O. Mitochondrial morphology during preimplantation human embryogenesis. **Human Reproduction**, Oxford suppl 2, p.148-159, 2000.

SCARPULLA, R.C. Nuclear Control of Respiratory Chain Expression in Mammalian Cells. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 29, n. 2, p.109-119, 1997.

SHADEL, G.S.; CLAYTON, D.A. Mitochondrial DNA Maintenance in vertebrates. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v.66, p.409-435, 1997.

SMITH, L.C; THUNDATHIL, J.; FILION, F. Role of the mitochondrial genome in preimplantation development and assisted reproductive technologies. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 17, p.15-22, 2005.

SOTO, P.; SMITH, L.C. BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine

oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.76, n.7, p.637-646, 2009.

SPIKINGS, E.C.; ALDERSON, J.; ST JOHN, JC. Regulated DNAm replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. **Biology of Reproduction**, New York, v. 76, p. 327-335, 2006.

STOJKOVIC, M., MACHADO, S. A; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, PB.; WOLF, E. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In vitro Fertilization and Culture. **Biology of Reproduction**, New York, v.64, n.3, March 1, p.904-909, 2001.

TARAZONA, A.M.; RODRÍGUEZ, J.I.; RESTREPO, L.F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced in vitro. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v.41, p.5-11, 2006.

TAMASSIA, M., NUTTINCK, F.; MAY-PANLOUP, P.; REYNIER, P.; HEYMAN, Y; CHARPIGNY, G.;STOJKOVIC, M.; HIENDLEDER, S.; RENARD, J.-P.; CHASTANT-MAILLARD, S. In vitro Embryo Production Efficiency in Cattle and Its Association with Oocyte Adenosine Triphosphate Content, Quantity of Mitochondrial DNA, and Mitochondrial DNA Haplogroup. **Biology of Reproduction**, New York, v.71, n.2, August 1, p.697-704, 2004.

TATHAM B.G; SATHANANTHAN, A.H; DHARMAWARDENA, V; MUNESINGHE, D.Y.; LEWIS, I.; TROUNSON, A.O. Centrifugation of bovine oocytes for nuclear micromanipulation and sperm microinjection. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, p. 1499-1503, 1996.

THOMPSON, J.G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. Effect of inhibitors and uncouples of oxidative phosphorylation

during compactation and blastulation of bovine embryos cultured in vitro.

Journal of Reproduction and Fertility, Oxford, v.118, p.47-55, 2000.

THOMPSON, J.G.; PARTRIDGE, R.J.; HOUGHTON, F.D.; COX, C.I.; LEESE, H.J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.06, p.299-306, 1996.

THORBURN, A. Death receptor-induced cell killing. **Cellular Signalling**, Oxford, v.16, n.2, p.139-144, 2004.

THOUAS, G.A.; TROUNSON, A.O. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. **Biology of reproduction**, New York, v.71, n.6, p.1936-42, 2004.

VANBLERKOM, J.; DAVIS, P.W.; LEE, J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. **Human Reproduction**, Oxford, v. 10, p. 415-424, 1995.

VANBLERKOM, J.; SINCLAIR, J.; DAVIS, P. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 10, p.2857-2868, 1998.

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

VANBLERKOM, J.; DAVIS, P. Mitochondrial signaling and fertilization.

Molecular Human Reproduction, Oxford, v.13, n.11 pp. 759–770, 2007.

VANBLERKOM, J. Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and stem cells. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.16, n. 4, p. 553-569, 2008.

VANHAESEBROECK, B., LEEVERS, S. J.; PANAYOTOU, G.; WATERFIELD, M. D. Phosphoinositide 3-kinases: A conserved family of signal transducers. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v.22, n.7, p.267-272, 1997.

WAN, Q.-H. A simple DNA extraction and rapid specific identification technique for single cells and early embryos of two breeds of Bos Taurus. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.77, p. 1-9, 2002.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, New York, v. 15, p. 2922–2933, 2001.

WANG, L.; WANG, D.; ZOU, X.; XU, C. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**. Hangzhou, v.10(7), p.483-492, 2009

WESTHUSIN, M.E.; COLLAS, P.; MAREK, D.; SULLIVAN, E.; STEPP, P.; PRYOR, J.; BARNES, F. Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not quantity of embryos produced by in vitro fertilization and nuclear transplantation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 46, n. 2, p. 243-52, 1996.

WYMANN, M. P.; PIROLA, L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v.1436, n.1-2, p.127-150, 1998.

WYMANN, M. P., ZVELEBIL, M., LAFFARGUE, M. Phosphoinositide 3-kinase signalling - which way to target? **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v.24, n.7, p.366-376, 2003.

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

ZHAO, X.M.; FU, X.W.; YUN-PENG, H.; CHANG-LIANG, Y.; SUO, L.; YAN-PING, W; HUA-BIN, Z.; ANDRAS, D.; SHI-EN, Z. Effect of Vitrification on Mitochondrial Distribution and Membrane Potential in Mouse Two Pronuclear (2-PN) Embryos. **Molecular Reproduction & Development**, New York, 2009.