

**Título:** Apoptose em embriões bovinos em estágio de pré-implantação submetidos ao estresse térmico e ao fator de necrose tumoral- α (TNF- α)⁽¹⁾**Autor:** Bárbara Loureiro**Orientador:** Paulo Fernandes de Lima^(*)**Resumo**

Foi avaliada a hipótese de que o estresse térmico e TNF- α induzem apoptose em embriões bovinos em estágio de pré-implantação através de um mecanismo dependente da caspase-9. O Experimento 1 determinou se o inibidor de caspase-9 z-LEHD-fmk bloqueia os efeitos apoptóticos de estresse térmico e TNF- α . Embriões foram coletados nos dias 4, 5 e 6 após FIV e transferidos para um novo meio contendo 100 μ M z-LEHD-fmk reconstituído em 0,5% (v/v) DMSO ou DMSO apenas, sendo mantidos em 1) 38,5°C por 24 h (controle), 2) 41°C por 15 h seguido de 38,5°C por 9 h ou 3) 38,5°C por 24 h com 10 ng/mL TNF- α de rato. A proporção de blastômeros que apresentaram apoptose foi determinada por TUNEL. O experimento foi repetido 4-5 vezes usando 172-248 embriões/dia. Nos embriões mantidos a 41 °C por 15 h e nos tratados com TNF- α por 24 h na ausência do inibidor z-LEHD-fmk, houve um aumento nas células TUNEL-positivas comparando com os embriões cultivados a 38,5 °C por 24 h (P<0.0001). Entretanto, nos embriões cultivados a 41 °C e os cultivados com TNF- α na presença do inibidor de caspase-9 z-LEHD-fmk não se observou aumento nas células apoptóticas (P < 0,01; Treat. X Inhib. P= 0,01). Não houve efeito em relação ao dia. O Experimento 2 testou os efeitos de diferentes concentrações de z-LEHD-fmk nas respostas apoptóticas dos embriões ao TNF- α . Embriões com ≥ 16 células foram coletados no dia 6 e cultivados z-LEHD-fmk nas concentrações 0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M reconstituído em 0,5% (v/v) DMSO \pm 10 ng/mL TNF- α . Após 24 h a 38,5°C, os embriões foram lavados, fixados e analisados por TUNEL. O experimento foi repetido 4 vezes (176 embriões). A adição de 10 ng/mL TNF- α aumentou a porcentagem de células que foram TUNEL-positivas e este aumento foi bloqueado por todas as concentrações de z-LEHD-fmk (concentração x z-LEHD-fmk; P < 0,05). Para o experimento 3, analisamos se o estresse térmico aumenta a atividade da caspase-9 e se z-LEHD-fmk bloqueia este efeito. Embriões no estágio de mórula ou blastocisto inicial foram coletados no dia 6 e transferidos para um novo meio de KSOM-BE2 contendo 100 μ M z-LEHD-fmk ou DMSO. Estes embriões foram cultivados a 38,5 °C por 24 h ou a 41 °C por 15 h, seguido de 9 h a 38,5 °C. Ao fim do estresse térmico, os embriões foram lavados e incubados em 5 μ M CaspaLux 9-M₁D₂ a temperatura ambiente por 1 h no escuro. A atividade da caspase-9 foi classificada como baixa, média ou alta de acordo com a fluorescência exibida por cada embrião. O estresse térmico aumentou a porcentagem dos embriões classificados como tendo média ou alta atividade da caspase-9 e o inibidor z-LEHD-fmk bloqueou este efeito (tratamento P<0,05; inibidor P<0,001). O experimento foi repetido 5 vezes usando 22-26 embriões por tratamento. No experimento 4, os efeitos do TNF- α na atividade da caspase-9 foram avaliados. Embriões nos estágios de mórula e blastocisto inicial foram coletados no dia 6 e transferidos para um novo meio de KSOM-BE2 contendo 10 ng/mL ou Tris-HCL (veículo) a 38,5°C por 3, 6, 9, 12, and 15 h, após este período a atividade da caspase-9 foi classificada como descrito anteriormente. O experimento foi repetido 8 vezes utilizando 37-39 embriões por tratamento. A proporção de embriões classificados como tendo média ou alta atividade da caspase-9 aumentou nos grupos com TNF- α em todos os períodos, exceto 3 h (tratamento P < 0,02). No Experimento 5 avaliou-se os efeitos do estresse térmico e TNF- α na integridade da membrana da mitocôndria. Embriões com 3 ½ foram selecionados e cultivados em novo KSOM-BE2 \pm 10 ng/mL TNF- α a 38,5 °C por 24 h ou 41 °C por 15 h seguido de 9 h a 38,5 °C. Após os tratamentos, os embriões foram lavados e incubados em 20 nM DiOC₆ por 20 min. Através de fotos avaliou-se a quantidade de unidades fluorescentes por área em cada embrião. Embriões mantidos a 41 °C mostraram uma significativa perda no potencial da membrana quando comparados ao controle (P < 0,05). Embriões cultivados com TNF- α apresentaram uma discreta perda no potencial da membrana, porém, não foi significativa. Conclui-se que a ativação da caspase-9 está envolvida no mecanismo de indução da apoptose pelo estresse térmico e TNF- α em embriões bovinos.

Palavras-chave: Bovino, PIV, MIV, FIV

⁽¹⁾Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco em 24.04.2006.

^(*)Autor para correspondência (paulolima4045@hotmail.com)

Title: Apoptosis in preimplantation bovine embryos submitted to heat stress and tumoral necrosis factor- α - TNF- α ⁽¹⁾**Author:** Bárbara Loureiro**Advisor:** Paulo Fernandes de Lima^(*)**Abstract**

It was tested the hypothesis that heat shock and TNF- α induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9 dependent mechanism. Experiment 1 determined whether the caspase-9 inhibitor, z-LEHD-fmk, blocks the apoptotic effects of heat shock and TNF- α . Embryos were collected on day 4, 5, and 6 after in vitro insemination and were cultured for 24 h in the presence of either 100 μ M z-LEHD-fmk reconstituted in 0.5% (v/v) DMSO or vehicle (DMSO) at either 1) 38.5°C for 24 h (control), 2) 41°C for 15 h followed by 38.5°C for 9 h or 3) 38.5°C for 24 h with 10 ng/mL murine TNF- α . Proportion of blastomeres undergoing apoptosis was determined using TUNEL labeling. The experiment was replicated 4-5 times/day using 172-248 embryos/day. In control embryos heat shock of 41 °C for 15 hours and TNF- α for 24 hours increased TUNEL-positive cells comparing with embryos cultured at 38.5° C for 24 hours (P<0.0001). However, in embryos incubated with the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk there was no increase of apoptotic cells (P< 0.01; Treat. X Inhib. P= 0.01). There was no effect of day or interactions with day. Experiment 2 tested the effects of different concentrations of the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk on apoptotic responses of embryos to TNF- α . Embryos \geq 16 cells were collected on Day 6 and cultured in the presence of different concentrations of the inhibitor z-LEHD-fmk (0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M reconstituted in 0.5% (v/v) DMSO) \pm 10 ng/mL TNF- α . After 24 h at 38.5°C, embryos were washed, fixed, and analyzed by TUNEL. The experiment was replicated 4 times (176 embryos). Addition of 10 ng/mL TNF- α increased the percentage of cells that were TUNEL-positive and this increase was blocked by all concentrations of z-LEHD-fmk (concentration x inhibitor; P<0.05). Comparing the different doses used we could confirm that there is no interaction between caspase-9 inhibitor and other caspases, such as caspase-8. For experiment 3, we analyzed whether heat shock increases caspase-9 activity and whether z-LEHD-fmk blocks this increase. Embryos at the morula or early blastocyst stage were collected on day 6 after insemination and transferred to a new drop of KSOM-BE2 containing 100 μ M z-LEHD-fmk or DMSO vehicle. Embryos were then cultured at either 38.5°C for 24 h or 41°C for 15 h followed by 38.5°C for 9 h. At the end of heat shock, embryos were washed and then incubated in 5 μ M CaspaLux 9-M₁D₂ at room temperature for 1 h in the dark. Caspase-9 activity was then determined by grading the embryos measuring the fluorescence intensity as low caspase activity, medium caspase activity or high caspase activity. Heat shock increased the percent of embryos classified as having medium and high caspase-9 activity and z-LEHD-fmk blocked this effect (treatment P<0.05; inhibitor P<0.001). The experiment was replicated 5 times using 22-26 embryos per treatment. For experiment 4, effects of TNF- α on caspase-9 activity were evaluated. Embryos at the morula or early blastocyst stage were collected on day 6 and transferred to a new drop of KSOM-BE2 containing 10 ng/mL TNF- α or Tris-HCL vehicle at 38.5°C for 3, 6, 9, 12, and 15 h and then caspase-9 activity was measured as described before. The experiment was replicated 8 times using 37-39 embryos per treatment. The proportion of embryos classified as having medium or high caspase activity was increased by TNF- α at all time points except 3 h (treatment P< 0.02). In conclusion, activation of caspase-9 dependent pathways is involved in the induction of apoptosis by heat shock and TNF- α . Experiment 5 evaluated the effects of heat shock and TNF- α on mitochondria membrane integrity. Embryos at day 3 ½ were harvested and cultured in a new drop of KSOM-BE2 \pm 10 ng/mL TNF- α at 38.5 °C for 24 h or 41 °C for 15 h followed by 9 h at 38.5 °C. After the treatments embryos were washed and incubated in 20 nM DiOC₆ for 20 min. Pictures were taken and the membrane depolarization was measured by calculating the units/area on each embryo. Embryos kept at 41 °C showed a significant loss in membrane potencial comparing to controls (P=0.05). However, TNF- α was lower but not significant. In conclusion, activation of caspase-9 dependent pathways is involved in the induction of apoptosis by heat shock and TNF- α . For a further comprehension of this subject we realized a reviewing study of the main effects of heat shock in bovine reproduction.

Key-words: Bovine, IVP, IVM, IVF

⁽¹⁾Master's Dissertation presented at Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária of the Universidade Federal Rural de Pernambuco on 04.24.2006

^(*)Corresponding Author (paulolima4045@hotmail.com)