

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Natana Chaves Rabelo**

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Azadirachta indica*  
A. Juss COMO INIBIDORES REVERSÍVEIS DO CICLO CELULAR  
DE FIBROBLASTOS BOVINOS**

Juiz de Fora

2015

**NATANA CHAVES RABELO**

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Azadirachta indica*  
A. Juss COMO INIBIDORES REVERSÍVEIS DO CICLO CELULAR  
DE FIBROBLASTOS BOVINOS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

**Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo**

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rabelo, Natana Chaves .

Avaliação de extratos vegetais de Azadirachta indica A. Juss como inibidores reversíveis do ciclo celular de fibroblastos bovinos / Natana Chaves Rabelo. -- 2015. 90 p.

Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. Ciclo celular. 2. Transferência Nuclear de Célula Somática. 3. Azadirachta indica. I. Camargo, Luiz Sérgio de Almeida, orient. II. Título.

**NATANA CHAVES RABELO**

**“Avaliação de extratos vegetais de *Azadirachta indica* A.Juss como inibidores reversíveis do ciclo celular de fibroblastos bovinos”**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

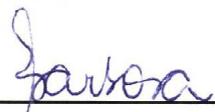
Aprovada em: 27 / 02 / 2015.

**BANCA EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo**

**Orientador**

**EMBRAPA**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dr.ª Nádia Rezende Barbosa Raposo**

**Membro Interno**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dr.ª Wanessa Araújo Carvalho**

**Membro Externo**

**EMBRAPA**

## AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq pelo financiamento e auxílio à pesquisa.

A EMBRAPA e UFJF por tornar este trabalho possível.

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio, pela orientação em todo esse período, pela confiança em mim depositada para a execução deste projeto, e por me auxiliar nos momentos de dúvidas, inseguranças e dificuldades. Obrigada pelos ensinamentos e por tornar este trabalho possível.

A Profa. Nádia, pela colaboração no projeto, por fornecer os extratos do Nim para a realização dos experimentos, pelos conselhos e pela ajuda sempre que possível.

A Carolina Capobiango, por toda a ajuda desde a graduação. Por ter compartilhado comigo cada etapa desde trabalho, por estar sempre disponível para me auxiliar, pela companhia nas madrugadas de experimento, pelos inúmeros cafés, enfim...por todo o esforço dispensado. Este trabalho é nosso e, depois de longos anos e muito esforço, nasceu!

A equipe do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, por todo este tempo de convivência e pelos ensinamentos que cada um me transmitiu. Joel, Myro, Lilian, Bruno, Michele, João Henrique, Sabine: Não só este trabalho, mas também o meu crescimento profissional teve a contribuição de cada um de vocês. Aos graduandos e pós-graduandos que dividiram comigo todas as preocupações e frustrações do dia a dia...e, claro, os momentos de brincadeiras e descontração também! Fernanda, Jasmin, Ivan, Sávio, Thiago, Deividy, e às meninas do "Tuplftchuplat", Carolzinha, Eliza, Thamiris, Vivian e Loriane. Vocês fizeram parte desta conquista, seja através da ajuda nos experimentos, na escrita, na elaboração dos gráficos ou, simplesmente, por ouvirem minhas queixas e lamentações a cada experimento que não deu certo (que não foram poucos!).

Ao meu pai, Galileu, minha mãe, Denize, e minha irmã, Aline. A caminhada fica muito mais fácil com vocês ao meu lado. Todo o apoio, todas as palavras de incentivo ditas nas horas certas, todas as vibrações a cada etapa a ser vencida,

compartilhando comigo cada momento, sem medir esforços para me auxiliar no que fosse preciso. Obrigada por tudo, por me ajudarem a me tornar uma pessoa melhor a cada dia, por guiarem pelo melhor caminho e por todo o amor que me dão! Amo vocês!

Ao Hérman, pelo companheirismo desde o início, por torcer sempre para que tudo desse certo, independente de qual caminho escolhesse. Saber que podia (posso!) contar com você foi muito importante para que conseguisse chegar até aqui. Agradeço seu carinho, sua paciência e sua compreensão! Mais uma etapa vencida com você ao meu lado!

Aos amigos, em especial a Carol, Ju, Thaís, Lyninha, Clara, Maysa e Lê, que estiveram sempre ao meu lado, que me ajudaram em todos os momentos e estiveram sempre torcendo por mim.

Aos familiares que, mesmo distantes, torceram e vibraram para que eu chegasse até aqui e compreenderam meus momentos de ausência.

Aos funcionários e estudantes dos laboratórios de Genética Molecular e Genética Vegetal, pelo auxílio nas análises e disponibilização de equipamentos e materiais.

Enfim, a todos que contribuíram para que eu pudesse concluir esta etapa.

## RESUMO

Erros na reprogramação epigenética no embrião reconstruído pela técnica de Transferência Nuclear de Célula Somática (TNCS) reduzem sua taxa de sucesso. A sincronização do ciclo do oócito receptor com o da célula doadora foi descrito como um dos principais fatores que contribuem para uma reprogramação adequada. Extratos da planta *Azadirachta indica* A. Juss (Nim) demonstraram potencial para inibir o ciclo de células cancerígenas e o crescimento de tumores, o que levou a hipótese de que ele pode ser efetivo, também, em células somáticas doadoras de núcleo para a clonagem. O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de extratos de Nim sobre o ciclo de fibroblastos bovinos, bem como verificar se tais tratamentos diminuem a viabilidade das células ou alteram a expressão de genes de estresse e apoptose. Foram testadas quatro concentrações (50, 100, 200 e 300 µg/mL) dos extratos aquoso, etanólico e hexânico, por 12 ou 24 horas de exposição, utilizando um controle positivo (soroprivação) e um controle com 0 µg/mL. A inibição do ciclo e a reversibilidade foram analisadas por Citometria de Fluxo, a expressão dos genes *HSP70.1A*, *HSBP1*, *HSP27.P1*, *BAX*, *BCL-2* e *WNT5A* avaliada por PCR em tempo real e a viabilidade celular por Azul de Tripán. Os resultados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de *Student Newman Keuls*, com valores de  $P < 0,05$  considerados significativos. Os tratamentos de 100 e 200 µg/mL do extrato etanólico, por 24 horas de exposição, foram os únicos capazes de sincronizar o ciclo das células em G0/G1 de forma reversível ( $88,59 \pm 0,26\%$  e  $88,36 \pm 0,32\%$ , respectivamente), quando comparadas ao controle com 0 µg/mL ( $81,89 \pm 0,43\%$ ), apresentando redução de células em G0/G1 dentro das 12 horas seguintes à exposição ao extrato. Apenas para estes tratamentos, portanto, foi realizada a análise de viabilidade celular e expressão gênica. Para o grupo de fibroblastos tratados com 200 µg/mL houve redução da viabilidade ( $50,16 \pm 2,76\%$ ) em relação aos demais, que foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) entre si. Para os dois tratamentos correu sub-expressão da maior parte dos genes, com exceção de *HSP27* para 100 µg/mL e *HSP70* para 200 µg/mL, quando estes foram comparados ao controle com 0 µg/mL. Com isso, conclui-se que, dentre os tratamentos testados, o melhor seria o extrato etanólico, a 100 µg/mL, por 24 horas de exposição.

Portanto, este tratamento tem potencial para ser testado na produção de embriões pela técnica de TNCS e contribuir para melhorar sua eficiência.

**Palavras-chave:** Sincronização celular. Citometria de Fluxo. Transferência Nuclear com Célula Somática.

## ABSTRACT

Errors in epigenetic reprogramming in reconstructed embryos by technique Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) reduce your success rate. The synchronization of the receiver oocyte cycle with the donor cell was described as one of the main factors that contribute to an appropriate reprogramming. Extracts of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) have demonstrated potential to inhibit the cell cycle of cancerigen cells and growth of tumors, which led to the hypothesis that it may be effective also in nucleus donor somatic cell for cloning. This study aimed to evaluate the effects of Neem extracts on cell cycle of bovine fibroblasts and verify if these treatments reduce the viability of cells and change the expression of stress and apoptosis genes. Were tested four concentrations (50, 100, 200 and 300 µg/mL) of the aqueous, ethanolic, and hexane extract, by exposure to 12 or 24 hours, using a positive control (inhibition serum starvation) and a control with 0 µg/ml . The inhibition and reversibility of cycle were analyzed by Flow Cytometry, the expression of genes *HSP70.1A*, *HSBP1*, *HSP27.P1*, *BAX*, *BCL-2* and *WNT5A* evaluated by real-time PCR, and cell viability by Trypan Blue. The results were subjected to analysis of variance and means were compared by the Student Newman Keuls test, with values  $P < 0.05$  considered significant. The treatments of 100 and 200 µg/ml of the ethanol extract, for 24 hours of exposure, were able to synchronize the cell cycle in the G0/G1 ( $88,59 \pm 0,26\%$  and  $88,36 \pm 0,32\%$ , respectively), compared to the control with 0 µg/ml ( $81.89 \pm 0,43\%$ ), being the only ones that were reversible, returning to cycle within 12 hours after the removal of extract. Just these treatments, therefore, cell viability and gene expression analysis was performed. For the group of fibroblasts treated with 200 µg/mL was reduced the viability ( $50,16 \pm 2,76\%$ ) compared to the others, which were similar ( $P > 0.05$ ) between them. For both treatments ran under expression of most genes, with the exception of HSP27 to 100 µg/mL and HSP70 to 200 µg/mL, when they have been compared to the control with 0 µg/mL. In conclusion, among the treatments tested, the best was the ethanol extract, 100 µg/mL, for 24 hours of exposure. Therefore, this treatment have potential to be tested in the production of embryos by SCNT technique and helping to improve their efficiency.

**Keywords:** Cell Sincronization. Flow Citometry. Nuclear Transfer with Somatic Cell.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema do procedimento de transferência nuclear de célula somática.....	20
<b>Figura 2</b>	Representação das fases do ciclo celular.....	21
<b>Figura 3</b>	Dinâmica da metilação no início do desenvolvimento em clones bovinos.....	29
<b>Figura 4</b>	Árvore de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	36
<b>Figura 5</b>	Produtos obtidos da árvore de Nim.....	37
<b>Figura 6</b>	Gráfico representativo da diferença de porcentagem de células em G0/G1 após exposição ao extrato aquoso.....	51
<b>Figura 7</b>	Gráfico representativo da diferença de porcentagem de células em G0/G1 após exposição ao extrato hexânico.....	53
<b>Figura 8</b>	Gráfico representativo da diferença de porcentagem de células em G0/G1 após exposição ao extrato etanólico.....	55
<b>Figura 9</b>	Histogramas demonstrando a porcentagem de células em G0/G1 em G2 0 hora e 12 horas após exposição ao extrato etanólico.....	61
<b>Figura 10</b>	Gráfico representativo da diferença de porcentagem de células em G0/G1 após exposição ao extrato etanólico.....	51
<b>Figura 11</b>	Curvas de dissociação para os genes de estresse e apoptose.....	65
<b>Figura 12</b>	Gráfico demonstrativo da abundância relativa dos transcritos após exposição ao extrato etanólico.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Principais proteínas reguladoras do ciclo celular.....	24
<b>Tabela 2</b>	Informações dos <i>primers</i> utilizados.....	48
<b>Tabela 3</b>	Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após exposição ao extrato aquoso.....	52
<b>Tabela 4</b>	Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após exposição ao extrato hexânico.....	54
<b>Tabela 5</b>	Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após exposição ao extrato etanólico.....	56
<b>Tabela 6</b>	Porcentagem de células na fase G0/G1 após a retirada dos tratamentos com o extrato hexânico e etanólico.....	58
<b>Tabela 7</b>	Porcentagem de células na fase S após a retirada dos tratamentos com o extrato hexânico e etanólico.....	59
<b>Tabela 8</b>	Porcentagem de células na fase G2 após a retirada dos tratamentos com o extrato hexânico e etanólico.....	60
<b>Tabela 9</b>	Quantificação do RNA total e do cDNA.....	63
<b>Tabela 10</b>	Condições padronizadas da PCR em tempo real.....	64
<b>Tabela 11</b>	Valores da eficiência da reação para cada gene avaliado.....	64

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
cDNA	DNA complementar
CdK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> - Cinase dependente de ciclina
CKI	Inhibitor CdK - Proteína inibidora de CdK
C <sub>t</sub>	<i>Cycle threshold</i>
CTE	<i>Células tronco embrioárias</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido dexoxirribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR	<i>Death Receptor</i> – Receptor de morte celular
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> – Proteína fluorescente verde
HSBP 1	<i>Heat Shock factor binding protein 1</i> – Proteína de ligação ao fator de choque térmico 1
HSF	<i>Heat Shock Factors 1</i> – Fator de Choque térmico 1
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> – Proteína de Choque Térmico
HSP 27.P1	<i>Heat Shock 27kDa protein 1</i>
HSP 70.1A	<i>Heat Shock 70kDa protein 1A</i>
MII	Metáfase II
MPF	<i>Maturation Promoting Factor</i> – Fator Promotor de Maturação
mRNA	RNA mensageiro
NEBD	<i>Nuclear Envelope Breakdown</i> – Rompimento do Envelope Nuclear
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Solução salina de fosfato tamponado
PCC	<i>Premature Chromatin Condensation</i> – Condensação prematura da cromatina
PCNA	<i>Proliferative nuclear cell antigen</i> – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
PRG	Proteína Reguladora de Genes
Rb	Retinoblastoma
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido Ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> – Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
TN	Transferência Nuclear
TNCS	Transferência Nuclear de Célula Somática
WNT 5a	<i>Wingless-related MMTV integration site 5A-like</i>

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	UM BREVE HISTÓRICO DA CLONAGEM.....	18
1.2	PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA TÉCNICA.....	20
1.3	A REPROGRAMAÇÃO EPIGENÉTICA EM CLONES.....	25
1.4	O CICLO DA CÉLULA SOMÁTICA E OS CHECKPOINTS.....	27
1.5	MÉTODOS DE SINCRONIZAÇÃO DA CÉLULA DOADORA.....	30
1.6	ESTRESSE E MORTE CELULAR.....	33
1.7	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	36
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1	COLETA DOS FIBROBLASTOS BOVINOS.....	40
3.2	PREPARO DOS EXTRATOS.....	41
3.3	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DE <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	41
3.3.1	Avaliação do ciclo celular por Citometria de Fluxo.....	42
3.4	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA REVERSIBILIDADE DE AÇÃO DOS EXTRATOS.....	43
3.5	EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	44
3.6	EXPERIMENTO 4: ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	45
3.6.1	Extração do RNA Total.....	46
3.6.2	Síntese do cDNA (DNA Complementar).....	46
3.6.3	Desenho dos <i>Primers</i> Específicos.....	47
3.6.4	PCR em Tempo Real.....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DE <i>Azadirachta indica</i> .....	51
4.1.1	Exposição ao Extrato Aquoso.....	51
4.1.2	Exposição ao Extrato Hexânico.....	53
4.1.3	Exposição ao Extrato Etanólico.....	55

4.2	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA REVERSIBILIDADE DE AÇÃO DOS EXTRATOS.....	56
4.3	EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	61
4.4	EXPERIMENTO 4: ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	62
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A compreensão dos aspectos moleculares e bioquímicos relacionados ao controle da proliferação celular é importante tanto para o estabelecimento de alternativas para o tratamento de tecidos cancerígenos (ELUMALAI *et al.*, 2012), quanto para a sincronização do ciclo de células doadoras de núcleos para a técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS) em animais (OBACK e WELLS, 2004).

A TNCS é uma técnica que tem potencial para contribuir na pesquisa básica através da investigação dos processos celulares de desenvolvimento e de reprogramação nuclear (HEYMAN, 2005), para fornecer um método mais eficiente na geração de animais transgênicos (CIBELLI *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2005) e para auxiliar na multiplicação de animais de maior valor genético ou de espécies em risco de extinção (WELLS *et al.*, 1998). Mais recentemente, vislumbrou-se, ainda, a utilização da técnica para o desenvolvimento de terapias paciente-específicas, denominada “*clonagem terapêutica*” (YANG *et al.*, 2007; TACHIBANA *et al.*, 2013). Entretanto, mesmo com todas estas perspectivas, a taxa de sucesso da técnica, a nível global e em animais domésticos, ainda é muito baixa, em torno de 1-3% de eficiência (WHITWORTH e PRATHER, 2010).

A utilização de bovinos para estudos genéticos auxilia no entendimento dos processos biológicos e moleculares envolvidos no desenvolvimento de embriões. Esta é uma das espécies de maior similaridade genética com humanos, estimando-se que o gado compartilhe cerca de 80% do seu genoma com os seres humanos (ELSIK, TELLAM e WORLEY, 2009) o que o faz ser um modelo experimental alternativo e bastante atrativo.

Uma das grandes dificuldades encontradas após a transferência de um núcleo somático para um oócito receptor é a reprogramação epigenética e a ativação dos genes de pluripotência, que são essenciais para o desenvolvimento do embrião (BOIANI *et al.*, 2002). Quando a célula se encontra em estágio G0, ou início de G1, a cromatina se apresenta mais condensada e a atividade transcricional é reduzida, o que tornaria o genoma mais permissível a uma reprogramação nuclear e a responder melhor aos sinais enviados pelo citoplasma receptor, aumentando a

chance de um desenvolvimento embrionário adequado (OBACK e WELLS, 2004). Vários trabalhos relacionaram o uso de células doadoras quiescentes com o sucesso da técnica (WILMUT *et al.*, 1997; KORFIATIS *et al.*, 2001; KASINATHAN *et al.*, 2001).

Entre os métodos mais utilizados para inibir reversivelmente a proliferação as células doadoras de núcleo em G0/G1, se destacam a soroprivação e a confluência celular (inibição por contato) (WILMUT *et al.*, 1997; HAYES *et al.*, 2005). Alguns agentes químicos, como a roscovitina, olomoucina (ALESSI *et al.*, 1998), estaurosporina (TOLEDO e LYDON, 1997) e butirolactona (BLOOM e PAGANO, 2002) também são frequentemente utilizados. No entanto, os maiores desafios enfrentados por estes métodos são a resistência de uma subpopulação de células à inibição do ciclo e o fato de ocorrer indução de fragmentação no DNA das células expostas aos tratamentos, com a redução da sobrevivência celular (KUES *et al.*, 2000). Deste modo, a busca por novos métodos que sejam eficientes em sincronizar o ciclo de células somáticas em G0/G1, sem interferir na viabilidade das mesmas, continua sendo um desafio para as pesquisas nesta área.

Plantas medicinais têm recebido bastante atenção da comunidade científica, pela possibilidade de fornecerem componentes que sejam efetivos contra doenças e que atuam diretamente em processos biológicos. A planta *Azadirachta indica* A. Juss (Nim) é de origem indiana, pertencente à família Meliaceae e é conhecida como uma das plantas medicinais mais versáteis, por apresentar um amplo espectro de atividades biológicas (SUBAPRIYA e NAGINI, 2005). Atualmente, a árvore de Nim está distribuída pela Ásia, África e outras regiões tropicais do mundo (GIRISH e SHANKARA, 2008).

Mais de 140 compostos bioativos já foram isolados de diferentes partes do Nim (BISWAS *et al.*, 2002), mas as folhas são detentoras da maior parte destas propriedades (SUBAPRIYA e NAGINI, 2005). Os compostos biológicos delas extraídos têm demonstrado atividade bactericida (KOUL *et al.*, 2009), fungicida (POLAQUINI *et al.*, 2006), inseticida e pesticida (BRAHMACHARI, 2004), entre outras. Na última década, extratos de suas folhas demonstraram efeito antiproliferativo em células cancerígenas e inibiram o crescimento de alguns tumores (BARAL e CHATTOPADHYAY, 2004; KUMAR *et al.*, 2006; ROY *et al.*, 2007; ELUMALAI *et al.*, 2012). Kumar *et al.* (2010) sugeriram que este efeito tenha sido provocado pela redução de ciclinas necessárias para o avanço do ciclo da fase G1

para S, e pelo acúmulo das proteínas p53 e p21 que, por sua vez, atuam como inibidoras do ciclo. Portanto, extratos das folhas de Nim poderiam ser igualmente eficientes na inibição do ciclo de outros tipos celulares, como fibroblastos bovinos, visando sua utilização na clonagem.

## 1.1 UM BREVE HISTÓRICO DA CLONAGEM

Inicialmente, a clonagem, ou transferência nuclear (TN), surgiu como um método para estudar mecanismos envolvidos na diferenciação celular (ROBL, 1999). Um dos primeiros trabalhos na área foi realizado por Briggs e King (1952), através da retirada do núcleo de oócitos de rã (*Rana pipens*), aspiração de células de blástulas com o auxílio de uma micropipeta e posterior fusão das duas. Foram reconstruídos 197 embriões, sendo que 27 destes se desenvolveram até o estágio de girino. O trabalho abriu caminho para testes em outras espécies, chegando a ser alcançado com sucesso em mamíferos em 1981, por Illmensee e Hoppe, com o nascimento de três camundongos clones, utilizando, também, células embrionárias como doadoras de núcleo. Posteriormente, o mesmo método foi utilizado para produzir clones em caprinos (WILLASDEN *et al.*, 1986), bovinos (ROBL *et al.*, 1987) e suínos (PRATHER, SIMS e FIRST, 1989).

Entretanto, a pequena quantidade de células (blastômeros) disponíveis e a baixa taxa de desenvolvimento embrionário, limitaram o avanço da técnica. A necessidade do conhecimento do estágio do ciclo da célula doadora no momento da transferência trouxe, ainda, mais um obstáculo (SMITH, WILMUT e HUNTER, 1988; RITCHIE, 2006). Vários grupos iniciaram, então, uma intensa busca por outros tipos celulares que pudessem ser utilizados como doadores de núcleo, visando sua manutenção em cultura e a possibilidade de controlar o ciclo das células.

A produção de um clone utilizando células diferenciadas adultas foi alcançada com sucesso por Campbell *et al.* (1996b), com o nascimento da ovelha Dolly. Foram utilizadas células da glândula mamária como doadoras de núcleo, demonstrando, portanto, que este tipo de célula somática também poderia ser reprogramado para

um estado indiferenciado, suportando o desenvolvimento completo de um indivíduo. Posteriormente, várias espécies de mamíferos foram clonadas utilizando células somáticas, os quais se destacam trabalhos com bovinos (KUBOTA, 2000; KASINATHAN *et al.*, 2001), suínos (KUES *et al.*, 2000) e murinos (WAKAYAMA e YANAGIMACHI, 2001).

Aspectos indesejáveis são observados frequentemente em clones, em geral, como a ocorrência de hidroalantóides, maior incidência da Síndrome do bezerro grande, anomalias placentárias que levam a problemas no desenvolvimento dos fetos e perdas pronunciadas na segunda metade da gestação (WELLS, 2005). A TN, a partir de blastômeros, parece apresentar maior eficiência em termos de número de embriões transferidos e taxa de natalidade, além de gerar indivíduos com menos alterações (ONO e KONO, 2006). Entretanto, células somáticas provenientes de tecidos adultos poderiam ser utilizadas para aumentar a quantidade de embriões reconstruídos, devido à possibilidade de multiplicação em cultura e criopreservação. Desta forma, o número de animais produzidos por cada linhagem celular seria praticamente ilimitado (ALVAREZ, 2009).

As anormalidades observadas em clones se apresentam em decorrência de erros na reprogramação nuclear (como será discutido no tópico seguinte), que ocorre de forma mais drástica em células adultas diferenciadas do que em células embrionárias (NIEMANN *et al.*, 2008). Por isso, células tronco embrionárias também foram indicadas como possíveis doadoras de núcleo (WILMUT *et al.*, 1992), por apresentarem a vantagem do estado menos diferenciado e da possibilidade de multiplicação *in vitro*. Wakayama *et al.*, (1999) utilizaram duas linhagens diferentes de células tronco embrionárias já estabelecidas, gerando um total de 31 camundongos clones, com 14 nascidos saudáveis. Estes resultados foram importantes para murinos, entretanto, em animais de produção, como bovinos, ainda não foi possível isolar células tronco embrionárias verdadeiras, e a grande dificuldade de caracterização biológica e de manutenção em laboratórios, limita a utilização deste tipo celular para estes animais (CAMPBELL, 2005).

As células somáticas têm sido mais utilizadas na reconstrução de embriões por TN em bovinos. No entanto, as células devem ser cultivadas por curtos períodos de tempo, entre passagens de 1 e 10 (LI *et al.*, 2003). Isto porque o cultivo *in vitro* pode danificar o material genético, sendo que a porcentagem de aneuploidia em células cultivadas tende a aumentar de acordo com o período de cultivo

(FRESHNEY, 2000). Ou seja, quanto mais passagens celulares, maior o risco de ocorrência de alterações cromossômicas e genéticas em cultivo *in vitro*, o que poderia reduzir as chances de sucesso da técnica de TNCS.

Cada etapa da técnica de TNCS é de extrema importância, e envolve, resumidamente, a enucleação do oócito receptor estacionado em metáfase II a partir da remoção da região que contém a placa metafásica; obtenção e cultivo prévio de células somáticas do animal doador; fusão do oócito enucleado com a célula doadora de núcleo; ativação partenogenética; cultivo *in vitro* e transferência do embrião para a fêmea receptora (Figura 1) (HEYMAN, 2005).

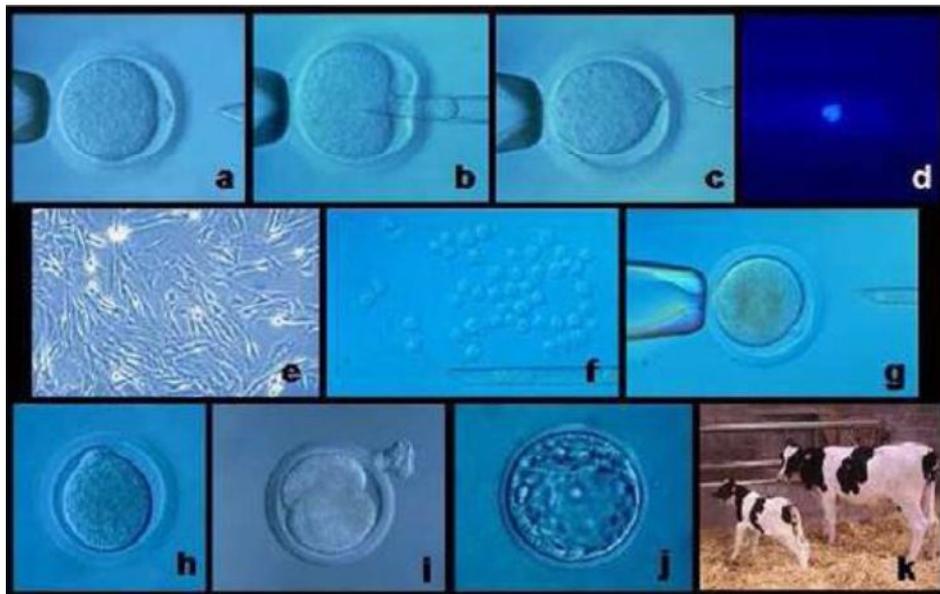


Figura 1. Esquema do procedimento de transferência nuclear de célula somática. a) ócito em metáfase II (MII), b) inserção da micropipeta na região da placa metafásica com aspiração do corpúsculo polar, c) enucleação do oócito, d) controle fluorescente da presença dos cromossomos em MII, e) cultivo de fibroblastos bovinos *in vitro*, f) seleção da célula doadora para TN, g) inserção do DNA no espaço perivitelíneo, h) fusão da célula doadora com o citoplasma receptor, i) primeira clivagem do embrião reconstruído, j) desenvolvimento *in vitro* do blastocisto, k) bezerro clone. Fonte: HEYMAN (2005).

## 1.2 O CICLO DA CÉLULA SOMÁTICA E OS CHECKPOINTS

As células eucarióticas são comumente encontradas em um estado inativo, ou quiescente, chamado G0. Quando existem estímulos positivos externos para a proliferação, a célula retorna à fase G1 e começa a sintetizar os fatores necessários para a progressão do ciclo celular, aumentando a sua massa citoplasmática para garantir a divisão subsequente (QU, MACLELLAN e WEISS, 2003). As fases do ciclo celular são divididas em quatro fases principais: fase G1, onde ocorre a preparação para a replicação do material genético; fase S, na qual ocorre a replicação do DNA, ocupando em torno da metade do tempo de divisão de uma célula de mamífero (10-12 horas); fase G2, com a preparação para a citocinese e fase M (mitose), que por sua vez é subdividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase, resultando na divisão mitótica com a formação de duas células-filhas (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2007; LUKAS, LUKAS e BARTEK, 2004), como demonstrado na Figura 2.

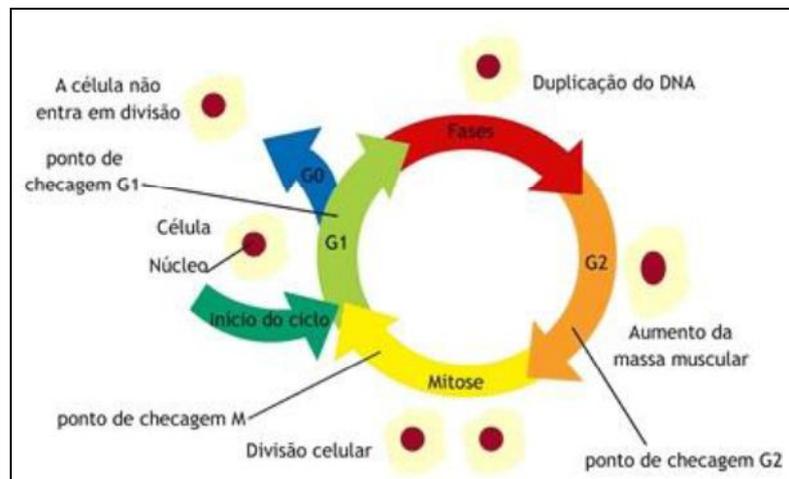


Figura 2. Representação das fases do ciclo celular. Fonte: adaptado de Alberts *et al.* (2004).

O ciclo de uma célula somática envolve uma sequência de processos que controlam a replicação do DNA, com a correta separação e transmissão do material

genético para as células-filhas, para que o desenvolvimento e a manutenção do organismo ocorram adequadamente.

Sabe-se que durante o ciclo celular existem pontos de checagem (ou *checkpoints*), que monitoram os eventos para garantir que a divisão ocorra corretamente. Estes pontos estão localizados na fase G1 (entre a fase M e a fase S), que verifica se os sinais externos estão favoráveis à progressão do ciclo; na fase G2 (entre a fase S e a fase M), que checa se a replicação do DNA está completa e se ocorreu corretamente, para que possa prosseguir; e na fase M, também conhecido como o ponto de verificação de montagem do fuso, que é o principal mecanismo de controle do ciclo celular na mitose, pois garante a segregação cromossômica correta para as células-filhas (QU, MACLELLAN e WEISS, 2003; WEAVER e CLEVELAND, 2005).

Quando as condições externas são desfavoráveis ou quando a célula precisa reparar algum erro, o que ocasionalmente ocorre (como danos no DNA, alterações de bases, não disjunção mitótica, entre outras), os pontos de checagem detectam o erro e proporcionam o tempo necessário para que a célula o corrija e tenha condições de retornar ao processo de divisão (LUKAS, LUKAS E BARTEK, 2004). Caso os danos sejam irreparáveis, a célula entra em processo apoptótico, eliminando, assim, a chance de propagação do erro.

Durante o ciclo celular, proteínas-chave formam complexos ativos que controlam positivamente ou negativamente a sua progressão (ver Tabela 1). As Cinasas dependentes de Ciclinas (CdKs) fazem parte do primeiro grupo, e são de fundamental importância para o processo. Elas só são ativadas quando se ligam às ciclinas, formando o complexo CdK-ciclina, que é responsável por desencadear os processos de fosforilação de muitas proteínas reguladoras da progressão do ciclo. Portanto, o aumento ou a diminuição nos níveis de ciclina são determinantes para a atividade da CdK, sendo que para cada Cdk existe uma ciclina específica (NAKAYAMA e NAKAYAMA, 2006). Por outro lado, existem os fatores que controlam negativamente a progressão do ciclo, a família das proteínas inibidoras de cinases dependentes de ciclina, conhecida como Cip/Kip, tem como representantes a p21 (regulada pela p53), p27 e p57, que são especialmente importantes no processo de bloqueio do ciclo celular (BESSION, DOWDY e ROBERTS, 2008), seja durante o desenvolvimento, a diferenciação ou em resposta a estresses celulares (SHERR e ROBERTS, 1999).

A supressão da atividade de CdK na fase G1 pode ser revertida pela ativação do complexo G1-CdK, que é regulado pela proteínas E2F. Esta proteína se liga á sequências específicas de DNA de promotores de muitos genes responsáveis por codificar proteínas necessárias para a passagem da fase G1 para a fase S. A função da E2F é controlada, principalmente, pela interação com a proteína Retinoblastoma (Rb), uma inibidora da progressão do ciclo celular. Durante a fase G1, a Rb pode se ligar á E2F, bloqueando a transcrição de genes da fase S. Estímulos extracelulares que ativam a divisão, estimulam o acúmulo de G1-CdK ativa, que por sua vez fosforila a Rb, reduzindo sua afinidade por E2F, que em sua forma livre, irá ativar a expressão dos genes responsáveis pela progressão do ciclo, passando da fase G1 para S (CHEN *et al.*, 1989; SHERR E ROBERTS, 1999).

Tabela 1. Principais proteínas reguladoras do ciclo celular. Fonte: adaptado de ALBERTS *et al.* (2004).

<b>NOME GERAL</b>	<b>FUNÇÃO E COMENTÁRIOS</b>
<b>Proteínas-quinases e proteíno-fosfatases que modificam Cdk</b>	
Quinase ativadora de Cdk(CAK)	Fosforila o sitio de ativação das Cdk
Quinase wee I	Fosforila os sítios inibitórios da Cdk; envolvida principalmente no controle da entrada na mitose
Fosfatase Cdc25	Remove os fosfatos inibidores da Cdk; três membros da família (Cdc25,A,B,C) em mamíferos; a Cdc25C é a ativadora da Cdk1 no começo da mitose
<b>Proteínas inibidoras da Cdk (CKIs)</b>	
p27	Suprime as atividades das G1/S-Cdk e S-Cdk em G1; ajuda a retirar células do ciclo celular quando elas finalmente se diferenciam; é fosforilada pela Cdk 2 e desencadeia sua ubiquitinação pela SCF
p21	Suprime as atividades das G1/S-Cdk e S-Cdk seguidas de danos no DNA em G1, é ativada transcricionalmente pela p53
p16	Suprime a atividade da G1-Cdk em G1, frequentemente é inativada no câncer
<b>Ubiquitina-ligase e seus ativadores</b>	
SCF	Catalisa a ubiquitinação das proteínas regulatórias envolvidas no controle de G1, incluindo CKIs (p27): a fosforilação da proteína-alvo normalmente é necessária para sua ativação
APC	Catalisa a ubiquitinação das proteínas regulatórias envolvidas principalmente na saída da mitose, incluindo a securina e M-ciclina; é regulada pela associação com subunidades ativantes
Cdc20	APC – subunidade ativante de todas as células; desencadeia a atividade inicial da APC na transição da metáfase para anáfase; é estimulada pela atividade M-Cdk
Hct I	Mantém a atividade de APC após a anáfase e durante a G1; é inibida pela atividade Cdk
<b>Proteínas reguladoras do gene</b>	
E2F	Promove a transcrição dos genes necessários para a continuidade da G1/S, incluindo os genes que codificam as G1/S-ciclina, as S-ciclina e as S-ciclinas e as proteínas necessárias para a síntese de DNA; é estimulada quando a G1-Cdk fosforila a Rb em resposta a mitógenos extracelulares
p53	Promove a transcrição dos genes que induzem a retenção do ciclo celular (especialmente p21) ou a apoptose em resposta a danos no DNA ou a outros estresses celulares; é regulada pela associação com Mdm2, que promove a degradação da p53

Portanto, o ponto de controle da fase G1 é o alvo dos métodos de inibição do ciclo para a técnica de TNCS, pois a célula só entrará efetivamente no ciclo caso as condições e os estímulos externos sejam positivos. Do contrário, a célula pode permanecer no estado quiescente por tempo indeterminado, até que os estímulos se tornem favoráveis para a proliferação.

### 1.3 PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA TÉCNICA DE TNCS

As aplicações da TNCS estão relacionadas tanto à pesquisa básica aplicada. A utilização da técnica para aumentar a eficiência na produção de animais transgênicos se apresenta como uma das principais aplicações. Por meio da transferência do núcleo de células modificadas geneticamente, Cibelli *et al.* (1998) relataram que dos nove embriões transferidos para fêmeas bovinas, quatro bezerras nasceram saudáveis e expressavam o transgene da  $\beta$ -galactosidase, demonstrando o potencial de eficiência da técnica. A expressão do gene repórter *Green Fluorescent Protein* (GFP) foi observada em bovinos e suínos reconstruídos pela técnica, utilizando-se células transfectadas (BORDINGNON *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008). Fêmeas bovinas resistentes à infecção por *Staphylococcus aureus* também foram obtidas com sucesso pela mesma técnica, sendo os animais produzidos resistentes à mastite, problema que provoca grandes perdas de animais e gera muitos gastos para o produtor (WALL *et al.*, 2005).

Em humanos, tem sido estudada a possibilidade de utilização da TNCS para gerar células tronco embrionárias (CTE) a partir da transferência do núcleo de células somáticas de pacientes (*nuclear transfer-embryonic stem cells - NT-ESCs*). Com isso, os mecanismos das doenças poderiam ser estudados e, futuramente, a técnica poderia ser utilizada em terapias paciente-específicas (YANG *et al.*, 2007). Em estudo recente, realizado por Tachibana *et al.* (2013), células tronco embrionárias foram obtidas com sucesso após o procedimento de TNCS, utilizando-se fibroblastos fetais e oócitos humanos, que demonstraram uma reprogramação nuclear correta.

A clonagem poderia permitir, também, a rápida disseminação de genótipos superiores diretamente para produtores comerciais. Animais com características desejáveis para produtos específicos (ex.: leite ou carne), resistentes a doenças ou a condições ambientais, poderiam ser extremamente úteis na multiplicação de animais superiores mestiços F1. Os ganhos genéticos poderiam ser alcançados através da liberação controlada de animais vivos ou embriões de elite clonados, permitindo a produção de um pequeno número de animais com genética superior para uso na reprodução (WELLS, 2005; OBACK e WELLS, 2007).

A utilização da TNCS para a conservação de espécies em risco de extinção também se tornou uma importante e potencial aplicação para a técnica a partir de trabalhos que conseguiram clonar espécies ameaçadas, mantendo uma pequena população de sobreviventes. Na Nova Zelândia, um grupo provou que isto seria possível após clonarem a única fêmea bovina de uma raça quase extinta chamada *Enderby Island*. Isto permitiu a geração de 20 novas fêmeas que seriam inseminadas artificialmente utilizando-se sêmen criopreservado (antes de instinto) de animais da mesma raça (WELLS *et al.*, 1998). Para isto, é conveniente criopreservar células somáticas dos animais ameaçados de extinção como maneira segura de preservar a biodiversidade (WELLS, 2005).

Entretanto, mesmo diante de todas estas perspectivas (além de várias outras não citadas), muitos pontos da técnica ainda são desconhecidos e difíceis de serem controlados. Por este motivo, ao se falar de animais domésticos, a taxa de sucesso da técnica, no mundo, ainda é muito baixa, em torno de 1-3% de eficiência (WHITWORTH e PRATHER, 2010). Dentre os fatores que interferem no desenvolvimento de embriões reconstruídos por TN, destacam-se a qualidade do citoplasma receptor oocitário, o processo de reconstrução, as condições de cultura, a linhagem da célula doadora de núcleo e, principalmente, a sincronização do ciclo da célula doadora com o oócito receptor (WILMUT *et al.*, 2002). Existe também uma grande especulação a respeito dos fatores dependentes do núcleo doador, como a composição da cromatina, a configuração das histonas, os padrões de metilação e acetilação e a correta manutenção dos *imprintings* gênicos (CAMPBELL, 1999).

Foi relatado por Wilmut *et al.* (1997) que o sucesso da clonagem estaria relacionado à utilização de células doadoras de núcleo estacionadas na fase G0 do ciclo celular, critério utilizado para a geração do primeiro mamífero clonado a partir da TNCS. Segundo Korfiatis *et al.* (2001), foi verificada uma maior taxa de

blastocistos bovinos e caprinos após a transferência de núcleos de células estacionadas nas fases G0/G1 do ciclo, quando comparada aos núcleos em fase M. A necessidade de sincronização da célula doadora foi questionada após a geração de embriões clones a partir de células não sincronizadas em bovinos (CIBELLI *et al.*, 1998) e camundongos (WAKAYAMA e YANAGIMACHI, 2001). Entretanto, o estágio específico da célula doadora não foi avaliado pelos métodos convencionais, o que impede a afirmação de que os embriões produzidos vieram de células em outros estágios do ciclo, que não G0/G1.

Células em G0 estão em estado quiescente, ou seja, em repouso, com o metabolismo celular reduzido, permitindo que a cromatina responda melhor aos sinais enviados pelo citoplasma receptor e seja mais permissiva à reprogramação pós-transferência (CAMPBELL, 1999). Entretanto, Zakhartchenko *et al.* (1999) destacaram que a pré-ativação ou não do oócito receptor interfere na reprogramação de núcleos em G0/G1. Isto porque oócitos presos em metáfase II têm altas concentrações do fator promotor de maturação, que induz o rompimento do envelope nuclear (*nuclear envelope breakdown* - NEBD) e a condensação prematura da cromatina (*premature chromatin condensation* - PCC). É muito provável que este seja um dos motivos para que células estacionadas em G0/G1 (antes da síntese de DNA) sejam mais adequadas e suportem melhor o desenvolvimento embrionário quando não há ativação prévia no citoplasma, sendo que núcleos em S ou G2 se tornam pré-dispostos a sofrer tetraploidia, defeitos cromossômicos ou danos na cromatina, devido à condensação precoce dos cromossomos (COLLAS *et al.*, 1992).

#### **1.4 A REPROGRAMAÇÃO EPIGENÉTICA EM EMBRIÕES CLONES**

A organização da cromatina atua como reguladora da expressão gênica. Ela é extremamente complexa e envolve várias especificidades como a metilação do DNA, composição da lâmina nuclear e subunidades de histonas, bem como modificações pós-traducionais subsequentes (acetilação, fosforilação, metilação, etc.)

(WHITWORTH e PRATHER, 2010). Sabe-se que a metilação do DNA está ligada ao controle de pluripotência (BORGEL *et al.*, 2010), por isso os genes têm de sofrer desmetilação para que ocorra a reprogramação de células somáticas para o estado indiferenciado pluripotente (BHUTANI *et al.*, 2010). Esta forma de regulação pode promover o silenciamento permanente de genes necessários apenas para o início do desenvolvimento embrionário, impedindo sua expressão acidental, o que poderia propiciar uma predisposição à formação de tumores (HOCHEDLINGER *et al.*, 2005).

A maioria dos genes de pluripotência são silenciosos (metilados) também nas células germinativas maduras, o que significa que as marcas epigenéticas devem ser revertidas rapidamente após a fertilização natural, para permitir a re-expressão dos genes associados à pluripotência no embrião (REIK, 2007). Durante o desenvolvimento normal, os embriões passam por uma série de modificações na organização das histonas e alterações nos padrões de metilação do DNA, que são muito bem orquestradas, e desempenham importante papel na expressão do genoma embrionário (BLELLOCH *et al.*, 2006). Portanto, a composição do núcleo muda drasticamente durante a embriogênese, o que também ocorre quando as células sofrem especialização tecido-específica (WHITWORTH e PRATHER, 2010).

O genoma de embriões clonados, entretanto, parece ser uma mistura de sequências metiladas correta e incorretamente (Figura 3). A perturbação da dinâmica dos padrões de metilação durante os primeiros estágios da embriogênese, momento em que o genoma embrionário é gradualmente preparado para ser ativado, parece ser um dos fatores que contribuem para anormalidades persistentes que comprometem o desenvolvimento normal e a sobrevivência da maioria dos animais clonados (BOURC'HIS *et al.*, 2001).

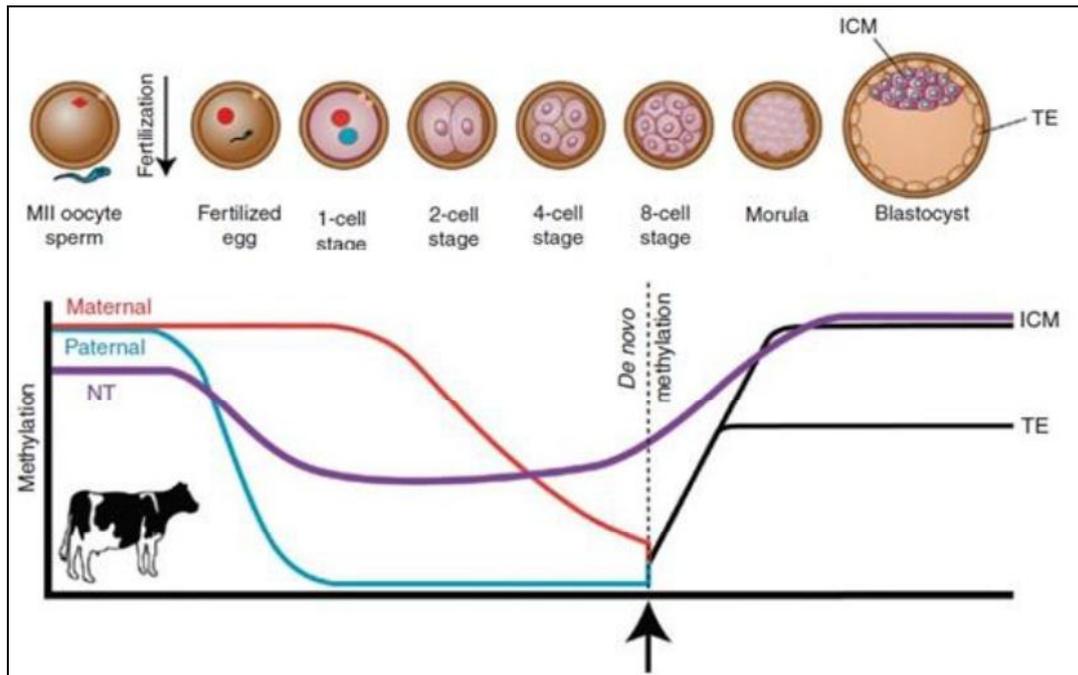


Figura 3. Dinâmica da metilação no início do desenvolvimento em clones bovinos. A desmetilação ocorre até o estágio de 8 células em embriões normais, seguida por *metilação de novo* após essa fase. Em embriões clones, a desmetilação parece ocorrer com menor intensidade, e a *metilação de novo* se torna precoce, em torno do estágio de 4 células. Além disso, em embriões clones não é observada diferença nos padrões de metilação *de novo* entre o trofoblasto (TE) e a massa celular interna (ICM), o que ocorre no desenvolvimento de embriões normais. Fonte: adaptado de YANG *et al.*, (2007).

A resistência das células somáticas à reprogramação reflete a estabilidade do estado diferenciado (PASQUE *et al.*, 2011). De fato, a reprogramação epigenética é mais drástica na TNCS, pois o perfil de expressão de uma célula diferenciada precisa ser reprimido para que um novo perfil específico de um embrião recém-fertilizado seja estabelecido, proporcionando um desenvolvimento embrionário e fetal coordenado. Estima-se que esta modificação inclua o silenciamento da expressão de 8.000-10.000 genes do programa de células somáticas e a ativação de aproximadamente 10.000 genes do programa embrionário (NIEMANN *et al.*, 2008).

Para o sucesso da TNCS, portanto, é necessário que o núcleo da célula doadora seja remodelado para assumir um padrão de núcleo zigótico, sendo que, quando é utilizado um oócito preso em metáfase, este processo é facilitado. O “remodelamento nuclear” resulta na mudança no padrão de genes a serem transcritos, o que se refere à “reprogramação nuclear”. Mais especificamente, o remodelamento é em nível de estrutura física do DNA, enquanto que a

reprogramação vem como resultado destas mudanças estruturais (WHITWORTH e PRATHER, 2010).

Tani, Kato e Tsunoda (2001) compararam o desenvolvimento de blastocistos produzidos por TNCS a partir de oócitos pré-ativados ou não, e relataram que os pré-ativados não suportaram o desenvolvimento a partir do oitavo dia, demonstrando que não são capazes de induzir a reprogramação do núcleo inserido. Além disso, Campbell e colaboradores (1996a) sugeriram que células na fase G0 do ciclo celular e início de G1, favorecem a reprogramação nuclear, pois a cromatina é capaz de redirecionar seu desenvolvimento. A célula doadora ideal não poderia, portanto, estar em processo de proliferação, mas ter a capacidade de se dividir ativamente para suportar o desenvolvimento embrionário (CIBELLI *et al.*, 1998). A inibição do ciclo celular nessas fases em células pode ser alcançada por diferentes métodos, mas devem promover a parada do ciclo celular em estágio específico e serem reversíveis, mantendo a capacidade de proliferação e diferenciação das células após a inserção no citoplasma receptor.

## **1.5 MÉTODOS DE SINCRONIZAÇÃO DO CICLO DA CÉLULA DOADORA**

Conforme descrito anteriormente, a coordenação entre o ciclo celular do oócito receptor com o da célula doadora de núcleo é de grande importância para manter a integridade do DNA e a ploidia do embrião reconstruído por TNCS (CAMPBELL *et al.*, 1996a). Métodos para sincronizar o ciclo das células doadoras, de modo reversível, têm sido bastante explorados por vários grupos de pesquisa. Os métodos mais comuns utilizados para este fim são a privação de soro e a inibição por contato, que promovem a parada do crescimento celular de forma reversível, mas atuam através de mecanismos diferentes (MODIANO *et al.*, 1999; HAYES *et al.*, 2005).

A soroprivação consiste na drástica redução da concentração de soro fetal bovino (SFB) do meio de cultivo das células, o que diminui os mitógenos e os fatores de crescimento essenciais para a proliferação celular, com isso, o complexo cinase

dependente de ciclina (CDK-ciclina) não é ativado, o que faz com que as células permaneçam no estágio G<sub>0</sub> (CONNELL-CROWLEY *et al.*, 1998; DAVIS; HO; DOWDY, 2001), pois não há estímulos externos favoráveis para que as células entrem em divisão.

Segundo Wilmut *et al.* (1997), um dos fatores de maior importância para o sucesso da clonagem da ovelha Dolly foi a sincronização do ciclo das células doadoras pelo método de soroprivação, o que certamente favoreceu a reprogramação nuclear pós-transferência. Zakhartchenko *et al.* (1999), demonstraram que este método foi eficiente também em sincronizar o ciclo de fibroblastos fetais bovinos na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular, e propiciaram melhores taxas de clivagem, de blastocisto e de prenhez. Posteriormente, outros trabalhos também demonstraram sucesso da técnica utilizando este método para sincronizar células doadoras em diferentes espécies (CHO *et al.*, 2002; SOON-CHYE *et al.*, 2004; de BARROS *et al.*, 2010).

Entretanto, a soroprivação em culturas de células de mamíferos reduz a viabilidade celular e aumenta a fragmentação do DNA (KUES *et al.*, 2000). Cho *et al.* (2005) avaliaram que este método aumenta a taxa de células apoptóticas em fetos bovinos, provavelmente pelos danos causados ao DNA destas células (GIBBONS *et al.*, 2002). Maiores perdas gestacionais também foram relacionadas com a exposição das células doadoras à soroprivação (Wells *et al.*, 1999), bem como o aumento na produção de agentes oxidativos, que por sua vez, causaram mudanças no perfil proteico de fibroblastos humanos cultivados nestas condições (BORALDI *et al.*, 2008).

A inibição por contato pode ser alcançada em cultivos de células aderentes, incluindo fibroblastos, células do músculo liso, células endoteliais e epiteliais, entre outras. Características observadas nas células expostas a este método envolvem uma forma de sinalização transmembrana a partir do contato célula-célula, a reorganização do citoesqueleto, além de uma mudança transcricional que inicia e mantém o estado quiescente. Aumentando o contato entre as células aderentes, fatores de crescimento para a proliferação *in vitro* e estímulos mediados pela integrina, são bloqueados (NELSON E DANIEL, 2002; TOMII *et al.*, 2009).

Trabalhos que utilizaram a confluência celular antes da transferência do núcleo obtiveram resultados satisfatórios em relação às taxas de embrião, de gestação e de nascimentos. Gao *et al.* (2003), relataram o desenvolvimento de 49%

de embriões de camundongos que chegaram à fase de mórula/blastocisto provenientes de células confluentes, contra 22% para o grupo obtido por células não confluentes, refletindo também na quantidade de nascidos vivos, sendo 5 e 1, respectivamente. Quando foram comparados os métodos de soroprivação com o de inibição por contato em células bovinas, Hayes *et al.* (2005) não observaram diferenças significativas tanto na porcentagem de células em G0/G1, quanto na taxa de blastocistos pós-transferência dos núcleos somáticos.

No entanto, mesmo que em camundongos os resultados tenham sido satisfatórios quanto à retenção de células em G0/G1, Kasinathan *et al.* (2001) observaram que isto não refletiu no melhor desenvolvimento dos embriões/fetos bovinos, já que nenhum sobreviveu mais que 180 dias de gestação. Uma explicação para o ocorrido seria o fato de que a inibição por contato gera uma subpopulação de células resistentes à parada em G1. Após o repique, as células sincronizadas continuarão a progressão a partir do ponto onde pararam, mas as que tiverem uma resposta retardada irão estabelecer diferentes padrões na progressão para os estágios subsequentes do ciclo, sendo considerado um método assíncrono (DAVIS, HO e DOWDY, 2001).

Além da privação de soro e da inibição por contato, outros trabalhos demonstraram que alguns produtos químicos servem como alternativas para inibir a proliferação celular, agindo principalmente como inibidores de cinases dependente de ciclinas (Cdk) e promovendo o bloqueio reversível do ciclo celular em G1. Alguns exemplos são: roscovitina, olomoucina, estauropurina (ALESSI *et al.*, 1998), butirolactona (BLOOM e PAGANO, 2002) e afidicolina (MIYAMOTO *et al.*, 2007) entre outros.

Um dos químicos mais utilizados em procedimentos de clonagem é a Roscovitina, um inibidor de cinase dependente de ciclina 2 (CDK-ciclina 2) que reduz os níveis das ciclinas A e E. Quando comparada à soroprivação, a roscovitina foi igualmente eficiente na sincronização do ciclo de células da granulosa, em bovinos, principalmente na fase G1, e não demonstrou induzir efeitos negativos de longo prazo sobre a taxa de gestação, a sobrevivência fetal e do bezerro, nem a saúde pós-natal, diferente do observado nos embriões produzidos por células em soroprivação, que conduziram a perdas fetais (GIBBONS *et al.*, 2002).

Mesmo que os efeitos de inibição do ciclo sejam satisfatórios, evidências de indução de apoptose já foram observadas em células de câncer de mama após

exposição à Roscovitina. O tratamento com o agente inibiu a síntese de DNA, induziu eventos celulares precursores da morte celular programada, além de inibir irreversivelmente a atividade proliferativa das células (MGBONYEBI, RUSSO E RUSSO, 1999). Outras linhagens de células cancerígenas (WESIERSKA-GADEK *et al.*, 2008, GARROFÉ-OCHOA *et al.*, 2008, CAPPELLINI *et al.*, 2009) e não cancerígenas (WU *et al.*, 2008) também já demonstraram sofrer danos após exposição ao mesmo tratamento e este efeito pode ser prejudicial ao embrião/feto gerado com o núcleo dessa célula doadora, contribuindo para a imprevisibilidade da técnica de transferência nuclear em gerar embriões, fetos e recém-nascidos viáveis.

Os problemas relatados acima, tanto em relação à dificuldade de inibição total das células (entre 70 e 90% das células, dependendo do agente químico ou método de inibição utilizado), quanto à indução de danos ao DNA e morte celular, são fatores limitantes para o sucesso da técnica de TNCS. Além disso, métodos de produção de embriões clones envolvendo inibidores de Cdk2 (roscovitina e olomoucina) estão patenteados (Stice, S. Effective nuclear reprogramming in mammals using Cdk2 inhibitors; US Patent 6906238, emitida em 14/06/2005), o que pode, em algum momento, limitar o uso de técnicas de transferência nuclear com tais inibidores.

Portanto, a identificação de métodos ou agentes químicos mais eficientes e com menos efeitos prejudiciais às células doadoras, que superem problemas relacionados a patentes, devem contribuir para o avanço da técnica de transferência nuclear com células somáticas e proporcionar melhores resultados pós-transferência.

## **1.6 ESTRESSE E MORTE CELULAR**

Uma célula eucariótica, sob determinadas condições de injúria ou estresse, pode ser capaz de reverter certos danos e retornar ao seu estado normal. Entretanto, quando o estímulo nocivo ultrapassa o limiar de lesão, ocorre a morte celular, que pode ser por necrose ou por apoptose (ROBINS e COTRAN, 2005).

A necrose é um processo de morte celular descontrolado, tendo como características a expansão da célula como um resultado da falha prematura da integridade da membrana (não ocorre aumento de cálcio intracelular), fragmentação do DNA de forma desigual e lesão das membranas lisossomais com o extravazamento das enzimas para o citoplasma. Os componentes celulares são degradados e ocorre o extravazamento para o meio extracelular, danificando tecidos adjacentes e promovendo um processo inflamatório no local (VERMES, HAANEN e REUTELINGSPERGER, 2000).

A apoptose, ou morte celular programada, pode ocorrer como um processo fisiológico normal durante o desenvolvimento embrionário, na manutenção da homeostase dos tecidos normais ou na cicatrização de feridas (RAVICHANDRAN, 2003). Ela é controlada intracelularmente através da ativação de enzimas que degradam o DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. A membrana celular permanece intacta, mas ocorre uma alteração estrutural para sinalizar a célula como um alvo fagocitário. Desta forma, a célula é eliminada rapidamente, antes que o conteúdo citoplasmático extravaze e ocorra o processo de inflamação no local, como observado em morte celular por necrose (ROBINS e COTRAN, 2005).

Quando uma célula está sob condições de estresse, podem ocorrer disfunções fisiológicas, danos estruturais e alterações morfológicas que levem à ativação de toda a maquinaria de morte celular (MOSSER *et al.*, 1997), caso os danos sejam irreparáveis. Alguns genes são responsáveis por codificar para proteínas que agem como indutoras ou repressoras da processo de apoptose, que serão mais expressos ou menos expressos dependendo das condições de estresse.

Representantes da família *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) ajudam a regular a ativação das procaspases. Como inibidora da apoptose, a própria Bcl-2 se destaca, por bloquear a liberação do citocromo c, provavelmente pela formação de heterodímeros com moléculas pró-apoptóticas (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999) sendo, portanto, membro do grupo de reguladores anti-apoptóticos. Como exemplo de proteínas promotoras de apoptose (pró-apoptótica), o grupo das Proteína X associada à Bcl-2 (*Bcl-2-associated X protein*, Bax) é estimulado por sinais apoptóticos, que fazem com que esta proteína seja translocada para as proximidades da mitocôndria, onde sofrerá modificações conformacionais, proporcionando a ligação com a membrana mitocondrial e posterior ativação. Com a

formação de oligômeros destas proteínas, ocorre a penetração na membrana, o que possibilita a liberação do citocromo c (ANTONSSON e MARTINOU, 2000).

Em resposta ao estresse, mudanças adaptativas ocorrem dentro das células, propiciando uma superexpressão de genes relacionados à proteção celular, que evitam a morte (MOSSER *et al.*, 1997). O grupo das Proteínas de Choque Térmico (*Heat Shock Proteins*, HSPs) conferem resistência a uma variedade de estresses celulares (LANDRY *et al.*, 1989) e o seu funcionamento implica, provavelmente, na estabilização e/ou restauração de elementos do citoesqueleto em células estressadas. Dentre estas, estão as HSP27.P1, que parecem estar associadas aos reparos nos filamentos de actina após danos causados por estresse (LAVOIE *et al.*, 1993) e as HSP70.1A, que conferem um potencial termotolerante às células, sendo sintetizadas em resposta a uma exposição prévia à hipertermia, ou a condições de estresse, o que torna a célula mais resistente, bloqueando danos intracelulares e impedindo a ativação das caspases (MOSSER *et al.*, 1997).

Existe outro grupo de fatores que também são expressos em situações de estresse, denominados Fatores de Choque térmico (*Heat Shock Factors*, HSF), que também codificam proteínas de choque térmico e estresse fisiológico (MARIMOTO *et al.*, 1994), onde HSF1 é responsável por ativar a transcrição de alguns genes de resposta ao estresse (NAKAI e MORIMOTO 1993). Entretanto, existem alguns trómeros que podem interagir com esta proteína, tendo um efeito regulatório negativo na sua atividade, como é o caso da ligação do fator 1, que forma a Proteína de Ligação ao Fator de Choque Térmico 1 (*Heat Shock Factor Binding Protein 1*, HSBP 1) (SATYAL *et al.*, 1998).

Em estudos relacionados ao estresse celular, seja ele provocado pelas condições de cultivo, por agentes químicos ou por componentes desconhecidos adicionados ao meio, a avaliação da expressão de outros genes relacionados ao metabolismo celular também se torna importante, pois alterações nos padrões de expressão dependentes das condições a que as células foram submetidas podem ser encontradas. O grupo das proteínas *Network of Proteins* ou WNTs, tem como representantes proteínas com papel essencial no crescimento celular, na diferenciação e em processos apoptóticos (LOGAN e NUSSE, 2004). A WNT 5a tem grande importância na adaptação das células a determinados meios de cultivo, tendo sido avaliada sua expressão em um experimento realizado por Torii *et al.*

(2008), onde este gene se mostrou superregulado e os fibroblastos humanos cultivados sob condições de soroprivação apresentaram efeitos anti-apoptóticos.

### **1.7 *Azadirachta indica* A. Juss**

A planta *Azadirachta indica* A. Juss, mais conhecida como Nim, pertence à família Meliaceae e é nativa da Índia, mas já disseminada pela Ásia, África e outras regiões tropicais. É uma árvore de grande porte, pode chegar até 25 metros de altura e 3 metros de diâmetro, com muitas ramificações, apresentando uma copa bem larga (Figura 4) (GIRISH e SHANKARA, 2008).

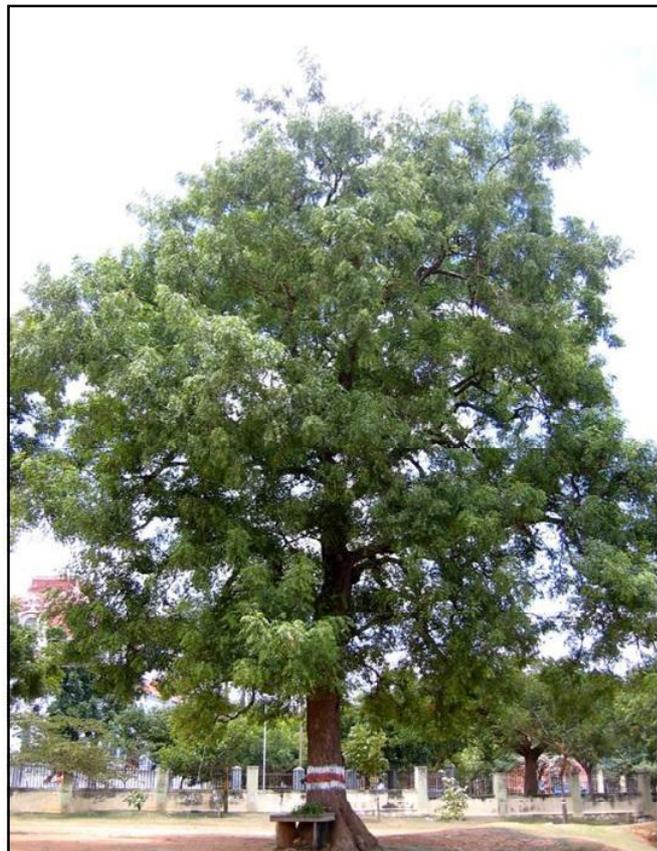


Figura 4. Árvore de *Azadirachta indica* A. Juss (Nim).  
Fonte: GIRISH e SHANKARA (2008).

Durante as últimas décadas, importantes informações sobre a atividade biológica e aplicações medicinais do Nim foram divulgadas, revelando que existem propriedades importantes em praticamente todas as suas estruturas, representada por galhos, folhas, sementes e frutos (Figura 5), o que a torna comercialmente explorável (BISWAS *et al.*, 2002). Entretanto, ainda que todas as partes da planta sejam detentoras de compostos bioativos, as sementes e as folhas são mais acessíveis e possuem compostos mais concentrados, que podem ser facilmente extraídos com solventes aquosos ou orgânicos (hidrocarbonetos, álcoois, cetonas ou éteres) (LEE *et al.*, 1988). De acordo com o solvente utilizado, variados tipos e concentrações de compostos serão extraídos, dependendo da polaridade e afinidade entre eles (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1997; RUSAK *et al.*, 2008).



Figura 5. Produtos obtidos da planta *Azadirachta indica*. (A) galhos, (B) folhas, (C) frutos, (D) sementes (com endocarpo), (E) sementes (sem endocarpo). Fonte: Adaptado de GIRISH e SHANKARA (2008).

Neste contexto, um número de compostos já foi identificado por demonstrar atividade contra várias doenças (GILANI e RAHMAN, 2005). Já foram verificados efeitos imunomodulatório e antiinflamatório, utilizado para o controle glicêmico, tratamento de úlceras, malária, infecções fúngicas, bacterianas e virais, além de demonstrarem propriedades antioxidantes (SUBAPRIYA e NAGINI, 2005).

Vários estudos têm demonstrado, também, o potencial desses constituintes no tratamento do câncer (MOSSINI, 2006). O extrato etanólico induziu a parada do ciclo celular de linhagens de câncer de próstata (KUMAR *et al.*, 2006), o extrato metanólico teve o mesmo efeito em células leucêmicas, (ROY *et al.*, 2007), e a administração dos compostos isolados nimbolide e azadirachtina foram eficientes na inibição de carcinomas bucais de camundongos (KUMAR *et al.*, 2010).

Dentre os grupos de compostos que mais se destacam no Nim, estão os flavonóides, alcalóides e limonóides presentes nas folhas. As vias pelas quais os componentes deste vegetal atuam na proliferação e na sobrevivência das células, ainda não estão bem elucidadas, entretanto, alguns autores demonstraram a ocorrência da modulação de ciclinas, inibição de CDKs e aumento de p53 após a exposição ao composto nimbolide (da classe dos limonóides), podendo ser um dos responsáveis pelo efeito antiproliferativo neste tipo celular (ROY *et al.*, 2007). A indução das proteínas p53 e p21 com inibição das ciclinas B e D foi relatada por Kumar *et al.* (2009a).

Pelo exposto acima, extratos de *A. indica* poderiam ser fortes candidatos a inibidores da proliferação de células doadoras de núcleo para a TNCS. Por isso, o presente trabalho se propôs a avaliar a ação de extratos do vegetal na inibição reversível do ciclo de células somáticas não carcinogênicas, como fibroblastos bovinos, que são utilizados frequentemente como doadores de núcleo para a clonagem. O efeito sobre a viabilidade das células e a possibilidade de indução de processos de estresse e apoptose também foram considerados importantes dentro deste contexto. A identificação de produtos naturais, de larga distribuição na natureza, com potencial para sincronizar o ciclo das células doadoras de núcleo pode vir a contribuir para o sucesso da transferência nuclear somática, contornando os problemas que envolvem os métodos atualmente utilizados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos extratos aquoso, hexânico e etanólico de *A. indica* sobre a inibição do ciclo celular de fibroblastos bovinos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar se os extratos possuem efeito de inibição do ciclo celular nos estágios G0/G1;
- ✓ Avaliar se o efeito de inibição do ciclo celular em G0/G1 seria reversível após a exposição aos tratamentos e
- ✓ Detectar possíveis alterações na viabilidade e na expressão de genes relacionados ao estresse e apoptose das células expostas aos tratamentos cujos resultados anteriores tenham sido satisfatórios.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 COLETA DOS FIBROBLASTOS BOVINOS

A coleta das células foi realizada no Campo Experimental José Henrique Bruschi, localizado em Coronel Pacheco-MG, pertencente a Embrapa Gado de Leite. Utilizou-se uma biópsia da orelha de uma vaca Gir (identificação: 3446), de aproximadamente 1cm<sup>3</sup>, que foi transportada em solução salina de fosfato tamponado (PBS) acrescida de antibiótico (penicilina+estreptomicina) e soro fetal bovino (SFB, SIGMA, SAINT LOUIS, EUA), para o laboratório de Reprodução Animal situado na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora-MG. No laboratório, foi retirada a cartilagem do material coletado e o mesmo foi lavado com a solução de transporte. Após esta etapa, o tecido permaneceu em cultivo no meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, SIGMA) suplementado com 10% de SFB e 0,1% de antibiótico (penicilina + estreptomicina), durante 14 dias.

Ao atingirem 70-80% de confluência, as células foram criopreservadas em solução DMEM com 20% de SFB e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO, SIGMA) na concentração de  $20 \times 10^4$  células/mL. Essas células foram mantidas no Banco de Células Somáticas Bovinas criopreservadas da Embrapa Gado de Leite. A obtenção de células bovinas e formação do Banco de Células foram previamente aprovadas pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, protocolo 08/2014. Assim, um biobanco de células foi preparado para a realização dos experimentos, sendo as células utilizadas sempre em segunda passagem.

### 3.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos aquoso, hexânico e etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss foram gentilmente cedidos pelo Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) laboratório pertencente à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora / Juiz de Fora – MG.

Brevemente, cada um dos três extratos foi preparado de maneira específica, em função do solvente utilizado. O extrato hexânico foi preparado no aparelho de *Soxhlet* até o esgotamento total e, depois, rotaevaporado. Os extratos aquoso e etanólico foram preparados por maceração dinâmica e, posteriormente, o primeiro foi liofilizado e o segundo rotaevaporado para obtenção de um resíduo seco. Depois de concluído o processo, os três extratos foram mantidos em freezer -20°C, até o momento do uso.

A diluição do extrato hexânico foi realizada em PBS, sendo necessário utilizar também 30µl de DMSO+TWIN (1:1, SIGMA). Já para os extratos aquoso e etanólico, foi utilizado somente PBS. Para a diluição de todos os extratos, foi necessário intercalar vórtex e sonicador até a diluição total da massa (máximo de 1min em sonicação), chegando a uma concentração final de 5mg/mL.

### 3.3 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DE *Azadirachta indica*

Para a realização do experimento 1, as células foram descongeladas e semeadas em placas de 6 poços, com meio padrão (DMEM enriquecido com 10% de SFB e 0,1% de antibiótico) e mantidas em estufa incubadora a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade, até atingirem aproximadamente 50% de confluência. Neste momento, os extratos foram adicionados aos meios de cultivo, seguindo as concentrações de 50, 100, 200 e 300 µg/mL para todos os extratos (aquoso, hexânico e etanólico), por um período de 12 ou 24 horas de exposição.

Foram realizadas três repetições, em triplicata, para cada extrato testado. Também foram preparados, paralelamente, um controle positivo (soroprivação), no qual as células foram cultivadas durante três dias em meio DMEM acrescido de 0,5% de SFB e 0,1% de antibiótico, bem como um controle negativo, com 0 µg/mL de extrato, onde as células não foram expostas a nenhum tratamento de inibição, permanecendo em cultivo com meio padrão até o momento da leitura do ciclo celular. Foi certificado que, no momento de preparação das células para avaliação do ciclo celular em Citômetro de Fluxo, as culturas não estivessem em confluência total, já que este também é um método de inibição da proliferação celular. Os experimentos foram feitos de maneira independente para cada extrato.

Após o período de incubação com os devidos tratamentos, os poços foram lavados com PBS (sem  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ ) e as células foram desagregadas enzimaticamente com o uso de Tripsina (0,25%, EDTA SOLUTION, SIGMA), por incubação a 37°C, durante 3 minutos, sendo posteriormente inativada com DMEM + 10% SFB. A suspensão celular foi transferida para tubos de 15mL e centrifugadas a 591g (Centrífuga Excelsa Baby II Modelo 206-R, FANEM, SÃO PAULO, BRASIL), por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 1ml de etanol a 70% (gelado) foi adicionado ao *pellet* para cada  $1 \times 10^6$  células, sob agitação em vórtex, para a fixação das células, que permaneceram nesta solução durante duas horas, à temperatura de 4°C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspenso em 1ml de PBS para uma outra centrifugação de 5 minutos. Esta lavagem seguida de centrifugação foi repetida três vezes. Após descartar o sobrenadante da última centrifugação, 100 µl de Ribonuclease A 0,1 µg/ml, (LUDWING BIOTEC, ALVORADA, BRASIL) foram adicionados a cada tubo, permanecendo à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 10 minutos, para a degradação do RNA. Em seguida, cada amostra foi misturada à 400 µl de Iodeto de Propídio (IP, SIGMA), na concentração de 50 µg/ml, aproximadamente 10 minutos antes do início da leitura, para a marcação do DNA.

As análises foram realizadas no laboratório de Genética Vegetal da Sede da Embrapa Gado de Leite (JUIZ DE FORA, BRASIL), no Citômetro de Fluxo Facs Callibur (BECTON DICKINSON, SAN JOSE, EUA), utilizando os parâmetros FL2-H e FL2-A para a confecção dos histogramas. As porcentagens de células dentro de cada fase do ciclo celular foram calculadas pelo software livre WinMDI versão 2,8 (J. Trotter, <http://facs.scripps.edu/software.html>, 2010), através dos histogramas

gerados pelo Citômetro de Fluxo, determinando as porcentagens de células nos estágios sub-G0/G1, G0/G1, S e G2/M. Posteriormente, os dados foram tabulados para a análise estatística.

As proporções de células em cada fase do ciclo celular (sub-G0/G1, G0/G1, S e G2/M) foram submetidas à análise estatística, onde a comparação foi feita entre as médias dos tratamentos dentro de cada extrato separadamente, ou seja, tratamentos de diferentes extratos não foram comparados. Foi feita uma análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de *Student Newman Keuls* (SNK) por meio do procedimento GLM do programa sistema de análises estatísticas (*Statistical Analysis System – SAS*).

### **3.4 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA REVERSIBILIDADE DE AÇÃO DOS EXTRATOS**

Para a realização do experimento 2, foram selecionados os tratamentos que demonstraram melhores resultados em inibir o ciclo dos fibroblastos de acordo com o experimento 1. A reversibilidade de ação dos extratos foi avaliada a partir da leitura do ciclo celular após a exposição aos tratamentos, seguida de cultivo por 0, 12, 24 ou 36 horas.

As células foram descongeladas e submetidas aos tratamentos após atingirem aproximadamente 50% de confluência, ficando expostas aos extratos por 12 ou 24 horas (conforme descrito anteriormente). Após a retirada dos tratamentos, as células permaneceram em cultivo com meio padrão por 0, 12, 24 ou 36 horas, para que fosse verificada a diferença na porcentagem de células em G0/G1. Assim como no experimento 1, também foram preparados os controles positivo (soroprivação) e negativo (0 µg/mL), sendo feitas três repetições, em triplicata, para cada tratamento. A preparação das células para a leitura do ciclo celular em Citômetro de Fluxo, seguiu os mesmos padrões descritos para o experimento 1 e as análises dos histogramas também foram realizadas da mesma maneira.

As proporções de células em cada fase do ciclo celular (sub G0, G0/G1, S e G2) fornecidas pelo Citômetro de Fluxo em cada repetição também foram submetidos à ANOVA (análise de variância) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de *Student Newman Keuls* (SNK) por meio do procedimento GLM do programa sistema de análises estatísticas (*Statistical Analysis System - SAS*). Entretanto, para o experimento 2, foram comparadas as proporções de células no mesmo estágio do ciclo celular ao longo do tempo: 0, 12, 24 ou 36 horas após a remoção dos extratos, dentro de cada tratamento individual, sem fazer comparações entre extratos ou entre tratamentos.

### **3.5 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR**

Para a realização do experimento 3, foram selecionados os tratamentos que demonstraram melhores resultados em inibir o ciclo dos fibroblastos, de acordo com os resultados obtidos no experimento 1, mas que também tiveram seu efeito revertido, de acordo com resultados obtidos no experimento 2.

A análise de viabilidade celular se deu a partir da taxa de sobrevivência após a exposição aos tratamentos. O cultivo dos fibroblastos foi realizado sob as condições padrão citadas anteriormente, até atingirem 50% de confluência, momento em que foram adicionados os extratos, aos quais as células ficaram expostas por 12 ou 24 horas, dependendo do tratamento. Foram preparados da mesma maneira o controle negativo (0 µg/mL) e o controle positivo (soroprivação). Após a exposição ao extrato, os poços foram lavados com PBS (sem Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup>) e tratados com Tripsina (0,25%, SIGMA), por incubação a 37°C, durante 3 minutos, sendo posteriormente inativada com DMEM + 10% SFB. A suspensão de células foi transferida para tubos de 15 mL para posterior centrifugação por 5 minutos, a 591 G. O sobrenadante foi removido e 1 mL de PBS foi adicionado ao *pellet* para uma segunda centrifugação de 3 minutos. Após a retirada do sobrenadante, o *pellet* foi resuspenso em 200 µl de PBS, para que 50 µl de cada

tubo fosse misturado à 50 µl de Azul de Tripán (0,2%, SIGMA ), de modo a adquirir uma concentração celular de aproximadamente  $5 \times 10^4$  células/mL para a análise.

A viabilidade celular foi avaliada pelo aparelho Cedex XS Analyser (ROCHE, INDIANÓPOLIS - EUA), um contador semiautomático de células que utiliza o método de exclusão por Azul de Tripán, através da contagem de células marcadas/não-marcadas, fornecendo os dados baseados em porcentagens de células viáveis e não-viáveis, sendo necessário apenas 10 µl por amostra para cada análise.

Os dados foram tabulados para a análise estatística, que se deu a partir de análise de variância (ANOVA) sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de *Student Newman Keuls* (SNK) por meio do procedimento GLM do programa Sistema de Análises Estatísticas (*Statistical Analysis System - SAS*). Os tratamentos foram comparados entre si e com os controles (0 µg/mL e soroprivação). Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos e foram apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

### 3.6 EXPERIMENTO 4: ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Para a realização do experimento 4, foram selecionados os tratamentos que demonstraram melhores resultados em inibir o ciclo dos fibroblastos, de acordo com os resultados obtidos no experimento 1, mas que também tiveram seu efeito revertido, de acordo com resultados obtidos no experimento 2, ou seja, os mesmos tratamentos testados no experimento 3. A análise de expressão gênica se deu a partir da quantificação dos transcritos dos genes  *$\beta$ -ACTINA*, *HSP70.1A*, *HSBP1*, *HSP27.P1*, *BAX*, *BCL-2* e *WNT 5A*, que estão envolvidos nos processos de estresse e apoptose.

O cultivo dos fibroblastos foi realizado sob as mesmas condições citadas para os experimentos anteriores, com o descongelamento e cultivo dos fibroblastos em meio padrão, até atingirem 50% de confluência, para que fossem expostos aos respectivos tratamentos. Após a retirada do meio contendo os extratos, cerca de  $2 \times 10^6$  células por tratamento foram imediatamente congeladas em 20µL PBS,

totalizando três repetições por tratamento. Foi utilizado apenas o controle com 0 µg/mL de extrato (negativo). As células permaneceram estocadas em freezer à -80°C até o momento da extração do RNA total.

### **3.6.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL**

Para a extração do RNA foi utilizado o kit comercial *RNeasy Micro Kit* (QIAGEN GMBH, HILDEN, ALEMANHA) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, as células foram lisadas por tampão RLT acrescido de 10% de β-Mercaptoetanol (β-ME). Foi acrescido etanol 70% ao lisado e este foi transferido para a coluna de *Spin* e submetido à centrifugação, por 15 segundos, a 6800 G. Em seguida, foi adicionado o tampão de lavagem RW1 e centrifugado sob as mesmas condições anteriores. Para a purificação da amostra foi adicionado 80 µL de solução de RDD + DNase à membrana do filtro e, após 15 minutos, esta foi lavada novamente com o tampão RW1, seguida do tampão RPE. Logo após, foi adicionado etanol 80% na coluna, para posterior centrifugação por 2 minutos, visando à secagem da membrana onde se encontrava o RNA. Para eluição, foram utilizados 12 µL de água RNase-free. Do volume final de aproximadamente 11 µL, foi retirada uma amostra de 1 µL para quantificar o RNA total (tabela 2), através do aparelho espectrofotômetro (NANODROP ND-1000 , WILMINGTON, EUA).

### **3.5.2 SÍNTESE DO cDNA (DNA COMPLEMENTAR)**

A transcrição reversa para a síntese do cDNA foi realizada com o Kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (INVITROGEN, CARLSBAD, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, 5 µL (~203,7 ng/µL) de RNA total foram utilizados em cada reação de síntese de

cDNA. Uma reação contendo RNA total, primer oligo dT, tampão de ligação e água livre de nuclease foi incubada por 5 minutos a 65°C. Em seguida, 12 µL do mix (2x *First-Strand reaction mix* e *SuperScript III / RNaseOUT Enzyme mix*) foi adicionado à reação que foi incubada a 50°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos. O volume final foi de 20 µL de cDNA por reação, que permaneceu estocado a -20°C até posterior utilização. A quantificação do cDNA de cada repetição foi realizada através do espectrofotômetro (NANODROP ND-1000).

### 3.5.3 DESENHO DOS *PRIMERS* ESPECÍFICOS

Os *primers* ( $\beta$ -ACTINA, HSP70.1A, HSBP1, HSP27.P1, BAX, BCL-2 e WNT 5a) foram desenhados a partir de sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando o programa Prime3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) e a sequência do *primer GAPDH* foi obtida a partir da referência de Mouro *et al.* (2006). Todos os *primers* foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (Coralville, IA, EUA) e estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Informações dos *primers* utilizados

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Temperatura de pareamento	Tamanho do produto (pb)	N° de acesso no GenBank
<i>β-ACTINA</i> (endógeno)	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205	NM_173979
<i>GAPDH</i> (endógeno)	F 5'CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA3' R 5'GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG3'	53°C	237	Mourot <i>et al.</i> , (2006)
<i>HSP70.1A</i>	F 5'CGGAGAAGGACGAGTTTGAG3' R 5'ACATGAGCAATCCAGGAAG3'	59°C	192	NM203322.2
<i>BAX</i>	F 5'TTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA3' R 5'CAGCTGCGATCATCCTCTGCAG3'	64°C	174	NM173894
<i>BCL-2</i>	F 5'TGGATGACCGAGTACCTGAA3' R 5'CAGCCAGGAGAAATCAAACA3'	53°C	120	XM_586976
<i>HSBP.1</i>	F 5'TGCAGGATCTCACCTCAGTG3' R 5' GTTCCAGATTCCAGCGAAGA3'	55°C	236	NM_001113316.1
<i>WNT5a</i>	F 5'GAGAGCGCGCGCATCCTGAT3' R 5' CAGCTGCAGCCAGCACGTCT3'	67°C	135	NM_001205971.1
<i>HSP27.P1</i>	F 5'AGCTGACGGTCAAGACCAAG3' R 5' GGGGACAGAGAGGAGGAGAC3'	57°C	154	NM_001025569.1

Sequência dos *primers* específicos utilizados para o estudo de expressão gênica em fibroblastos bovinos, temperaturas de pareamento, tamanho dos fragmentos e fonte de acesso às sequências no GenBank ou referência bibliográfica.

### 3.5.4 PCR EM TEMPO REAL

A abundância de cDNA de cada amostra de fibroblastos bovinos submetidos aos tratamentos foi realizada utilizando a metodologia de PCR em Tempo-Real. As concentrações de *primers* e cDNA haviam sido previamente padronizadas. Foi utilizado o kit comercial *QuantiTect Sybr Green PCR Kit* (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, cada reação foi preparada com cDNA da respectiva amostra, juntamente com o par de *primers*, Master Mix (HotStarTaq DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Buffer, dNTP mix, incluindo dUTP, SYBR Green I, MgCl<sub>2</sub> e ROX como referência passiva), totalizando um volume final de 25µL. Controles negativos foram preparados, onde o cDNA foi omitido durante a reação e substituído por água ultrapura. Foram feitas reações em triplicata para cada amostra (de todos os tratamentos e controle), das três repetições. Foram utilizadas placas ópticas de reação de 96 poços (*Applied*

*Biosystems*, Foster City, CA, USA), seladas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems), que foram acopladas ao aparelho ABI PRISM® 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Para a amplificação do material, as amostras foram incubadas a 95°C por 15 minutos, seguidas por 45 ciclos de 94°C por 15 segundos, e posterior ligação aos *primers* nas temperaturas específicas para cada um (conforme descrito na Tabela 2) por 30 segundos, finalizando com a extensão da fita a 72°C por 30 segundos.

A quantificação foi realizada utilizando-se o método do  $C_t$  (*cycle threshold*) comparativo, com os resultados expressos relativos a genes de referência endógena e um grupo controle. O  $C_t$  corresponde ao ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*threshold*), servindo como base para comparação entre as amostras. Este limiar foi estabelecido pelo próprio aparelho, em modo automático.

Como a quantificação relativa se baseia na frequência relativa dos transcritos do gene alvo em relação a um gene de expressão constitutiva, os genes de referência endógena foram  $\beta$ -ACTINA e GAPDH por serem amplamente utilizados em trabalhos de expressão gênica em células somáticas. Como grupo calibrador foi utilizado o controle com 0  $\mu$ g/mL de extrato de *A. indica*, onde as células não foram cultivadas em condições normais (DMEM + 10% SFB + antibiótico). Os valores de expressão relativa estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

As análises de quantificação relativa dos genes *B-ACTINA*, *GAPDH*, *HSP70.1A*, *HSBP1*, *HSP27.P1*, *BAX*, *BCL2* E *WNT5A* foram realizadas de acordo com o modelo matemático descrito por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002):

$$\text{Quantificação Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta C_t_{\text{alvo}} (\text{Ct do controle} - \text{Ct da amostra})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta C_t_{\text{Ref}} (\text{Ct do controle} - \text{Ct da amostra})}}$$

Onde:

$E_{\text{alvo}}$  = Eficiência da PCR dos genes alvo

Controle = grupo controle

Amostra = grupo teste

$E_{\text{Ref}}$  = Eficiência da PCR do gene controle endógeno

A partir deste método foi desenvolvido o *Relative Expression Software Tool* (REST®) (PFAFFL, HORGAN e DEMPFLER, 2002) que possui o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST*® (versão 384 - Beta, 2005), o qual foi utilizado para analisar os dados obtidos da quantificação relativa da PCR em tempo real. Esse modelo foi desenvolvido com base em testes de permutação, que são uma alternativa quando testes paramétricos não podem ser usados. Estes testes obtêm resultados a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DE *Azadirachta indica*

#### 4.1.1 EXTRATO AQUOSO

Os tratamentos referentes ao extrato aquoso (50, 100, 200 e 300  $\mu\text{g/mL}$ , por 12 ou 24 horas de exposição) apresentaram, em sua maioria, redução significativa ( $P < 0,05$ ) de células no estágio G0/G1, quando comparados ao controle com 0  $\mu\text{g/mL}$ . Apenas os tratamentos de 50  $\mu\text{g/mL}$ , por 12 e por 24 horas de exposição, e o de 300  $\mu\text{g/mL}$ , por 24 horas de exposição, foram semelhantes a esse controle de 0  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 6). Nenhum dos tratamentos teve eficiência similar ou superior à soroprivação, que apresentou  $89,18 \pm 1,05\%$  de células em G0/G1.

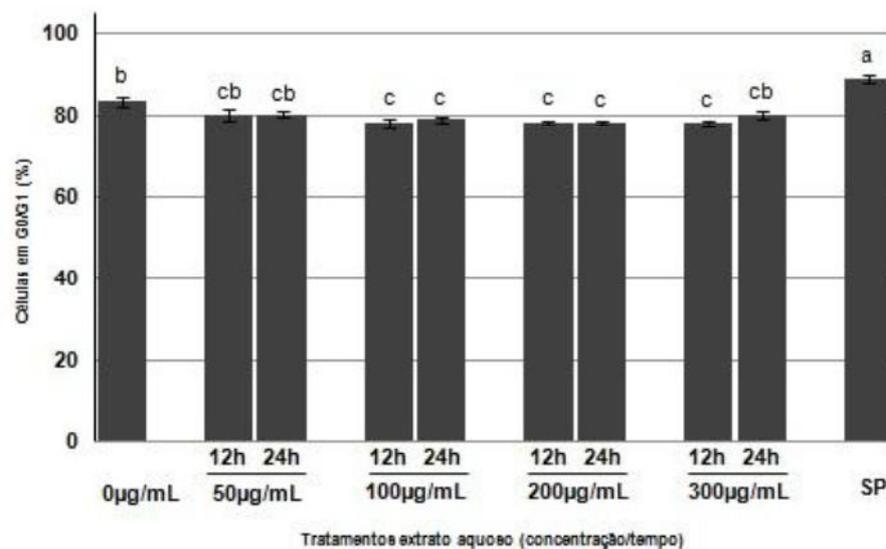


Figura 6. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos são indicadas por letras diferentes <sup>a,b,c</sup>. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média, com  $n=9$  (três repetições em triplicata).

As diferenças encontradas nas porcentagens de células nos estágios S e G2/M, após a exposição aos tratamentos com o extrato aquoso de Nim, se referem às células que não sofreram inibição em G0/G1. Por isto, as diferenças encontradas não tem uma relação direta com a concentração/tempo de exposição ao extrato (Tabela 3).

A subpopulação de células que apresenta fluorescência reduzida em relação à G0/G1, denominada de sub-G0/G1, foi utilizada como uma análise preliminar de morte celular. Foi observado um aumento significativo na porcentagem de células em sub-G0/G1 após exposição aos tratamentos com o extrato aquoso, quando estes foram comparados ao controle com 0 µg/mL. O aumento demonstrou ser diretamente proporcional à concentração administrada, sendo que as concentrações de 200 µg/mL e 300 µg/mL, ambas com 12 e 24 horas de exposição ao extrato, apresentaram valores semelhantes entre si e superiores aos demais. Nesta análise, a soroprivação foi similar ( $P > 0,05$ ) ao controle com 0 µg/mL. Para a visualização dos histogramas referentes aos tratamentos com o extrato aquoso, ver Anexo A.

Tabela 3. Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após exposição ao extrato aquoso.

Tratamentos		% de células em cada fase do ciclo celular			
Ext. Aquoso		Sub-G0/G1	G0/G1	S	G2/M
0 µg/mL		0 <sup>e</sup>	83,73 ± 1,15 <sup>b</sup>	7,31 ± 0,77 <sup>cde</sup>	8,95 ± 0,53 <sup>a</sup>
50 µg/mL	12h	0,93 ± 0,16 <sup>cb</sup>	80,69 ± 1,43 <sup>cb</sup>	11,05 ± 1,31 <sup>ab</sup>	8,03 ± 0,61 <sup>ab</sup>
	24h	0,63 ± 0,11 <sup>cd</sup>	80,55 ± 0,73 <sup>cb</sup>	8,72 ± 0,74 <sup>abcd</sup>	10,11 ± 0,29 <sup>ab</sup>
100 µg/mL	12h	0,94 ± 0,11 <sup>cb</sup>	78,42 ± 1,24 <sup>c</sup>	11,89 ± 1,28 <sup>a</sup>	8,57 ± 0,53 <sup>ab</sup>
	24h	1,36 ± 0,26 <sup>b</sup>	79,24 ± 0,80 <sup>c</sup>	10,38 ± 0,86 <sup>abc</sup>	9,01 ± 0,86 <sup>ab</sup>
200 µg/mL	12h	2,73 ± 0,19 <sup>a</sup>	78,61 ± 0,45 <sup>c</sup>	10,26 ± 0,38 <sup>abc</sup>	8,46 ± 0,32 <sup>ab</sup>
	24h	2,28 ± 0,12 <sup>a</sup>	78,61 ± 0,54 <sup>c</sup>	8,16 ± 0,20 <sup>bcd</sup>	10,97 ± 0,34 <sup>ab</sup>
300 µg/mL	12h	2,26 ± 0,10 <sup>a</sup>	78,27 ± 0,70 <sup>c</sup>	9,58 ± 0,49 <sup>abcd</sup>	9,89 ± 0,34 <sup>ab</sup>
	24h	2,58 ± 0,19 <sup>a</sup>	80,29 ± 1,09 <sup>cb</sup>	7,00 ± 0,18 <sup>de</sup>	10,15 ± 0,95 <sup>ab</sup>
Soroprivação		0,31 ± 0,08 <sup>ed</sup>	89,18 ± 1,05 <sup>a</sup>	5,16 ± 0,85 <sup>ef</sup>	5,30 ± 0,46 <sup>c</sup>

Diferenças significativas entre os tratamentos na mesma coluna estão representadas por letras diferentes <sup>a,b,c,d,e</sup> ( $P < 0,05$ ). Valores representam a média ± erro padrão da média, com n=9 (três repetições em triplicata).

#### 4.1.2 EXTRATO HEXÂNICO

Para os tratamentos referentes ao extrato hexânico (50, 100, 200 e 300  $\mu\text{g/mL}$ , por 12 ou 24 horas de exposição) houve aumento ( $P<0,05$ ) na porcentagem de células em G0/G1 para os tratamentos de 50  $\mu\text{g/mL}$ , por 12 e 24 horas de exposição, 100  $\mu\text{g/mL}$ , por 12 horas de exposição e 200  $\mu\text{g/mL}$ , também por 12 horas de exposição, quando comparados ao controle com 0  $\mu\text{g/mL}$ . Já quando comparados à soroprivação, apenas o tratamento de 100  $\mu\text{g/mL}$ , por 12 horas de exposição, foi igualmente eficiente em estacionar as células em G0/G1 ( $88,42\pm 0,86\%$  e  $87,85\pm 0,51\%$ , respectivamente), sendo que nenhum tratamento apresentou porcentagem superior a ele (Figura 7).

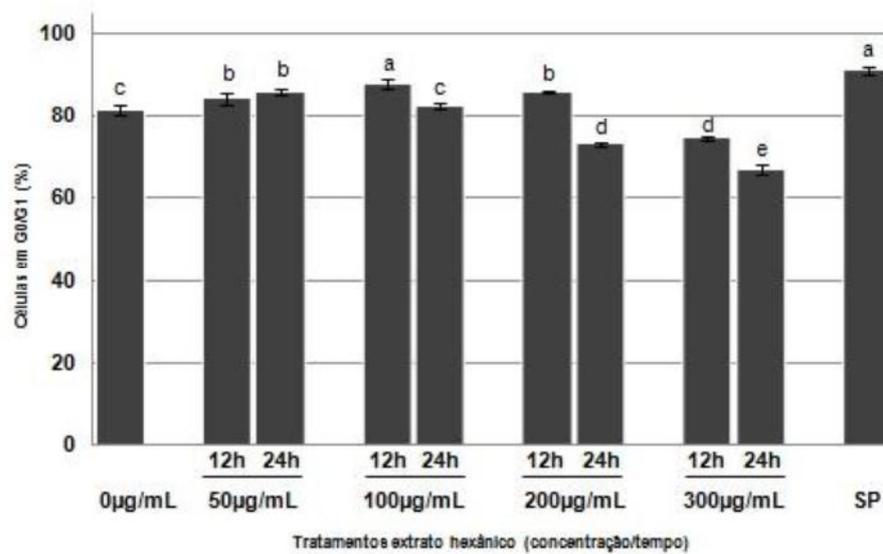


Figura 7. Diferenças significativas ( $P<0,05$ ) entre os tratamentos são indicadas por letras diferentes <sup>a,b,c</sup>. Valores representam a média $\pm$ erro padrão da média, com  $n=9$  (três repetições em triplicata).

As porcentagens de células nas fases S e G2/M, após a ao extrato hexânico de Nim, apresentaram diferenças entre si, variando de acordo com as taxas encontradas do estágio G0/G1 e sub-G0/G1 (Tabela 4). Entretanto, estas diferenças

não tem uma relação direta com a concentração/tempo de exposição ao extrato, assim como observado para o extrato aquoso.

O aumento da taxa de sub-G0/G1 foi dependente da concentração e do tempo de exposição ao extrato hexânico. Os tratamentos de 200 µg/mL, por 24 horas de exposição e de 300 µg/mL, por 12 e 24 horas de exposição, provocaram um pronunciado aumento ( $P < 0,05$ ) destas taxas ( $6,85 \pm 0,41\%$ ,  $4,49 \pm 0,19\%$  e  $14,47 \pm 0,60\%$ , respectivamente), em comparação com os demais tratamentos e controles. Para a visualização dos histogramas referentes aos tratamentos do extrato hexânico, ver Anexo B.

Tabela 4. Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após exposição ao extrato hexânico.

Tratamentos		% de células em cada fase do ciclo celular			
Ext. Hexânico		Sub-G0/G1	G0/G1	S	G2/M
0 µg/mL		0 <sup>e</sup>	81,44 ± 0,29 <sup>c</sup>	7,55 ± 0,26 <sup>b</sup>	11,02 ± 0,24 <sup>b</sup>
50 µg/mL	12h	0,67 ± 0,10 <sup>de</sup>	84,23 ± 0,56 <sup>b</sup>	8,34 ± 0,34 <sup>ab</sup>	6,75 ± 0,44 <sup>cd</sup>
	24h	0,91 ± 0,08 <sup>de</sup>	85,66 ± 0,47 <sup>b</sup>	5,89 ± 0,35 <sup>c</sup>	7,52 ± 0,25 <sup>cd</sup>
100 µg/mL	12h	1,03 ± 0,16 <sup>de</sup>	87,85 ± 0,51 <sup>a</sup>	4,53 ± 0,28 <sup>d</sup>	6,59 ± 0,33 <sup>cd</sup>
	24h	1,32 ± 0,28 <sup>d</sup>	82,33 ± 0,30 <sup>c</sup>	5,21 ± 0,45 <sup>cd</sup>	11,13 ± 0,35 <sup>b</sup>
200 µg/mL	12h	1,21 ± 0,23 <sup>d</sup>	85,87 ± 0,45 <sup>b</sup>	5,07 ± 0,48 <sup>cd</sup>	7,87 ± 0,37 <sup>c</sup>
	24h	6,85 ± 0,41 <sup>b</sup>	73,08 ± 0,61 <sup>d</sup>	9,22 ± 0,30 <sup>a</sup>	10,85 ± 0,26 <sup>b</sup>
300 µg/mL	12h	4,49 ± 0,19 <sup>c</sup>	74,44 ± 0,67 <sup>d</sup>	7,53 ± 0,20 <sup>b</sup>	13,54 ± 0,69 <sup>a</sup>
	24h	14,47 ± 0,60 <sup>a</sup>	67,00 ± 0,47 <sup>e</sup>	8,67 ± 0,47 <sup>ab</sup>	9,87 ± 0,27 <sup>b</sup>
Soroprivação		1,49 ± 0,33 <sup>d</sup>	88,42 ± 0,86 <sup>a</sup>	4,04 ± 0,22 <sup>d</sup>	6,02 ± 0,86 <sup>d</sup>

Diferenças significativas entre os tratamentos na mesma coluna estão representadas por letras diferentes <sup>a,b,c,d,e</sup> ( $P < 0,05$ ). Valores representam a média ± erro padrão da média, com n=9 (três repetições em triplicata).

### 4.1.3 EXTRATO ETANÓLICO

Para os tratamentos referentes ao extrato etanólico (50, 100, 200 e 300  $\mu\text{g/mL}$ , por 12 ou 24 horas de exposição) foi observado que, para todos os tratamentos de 24 horas de exposição, houve um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de células no estágio G0/G1, quando comparados ao controle com 0  $\mu\text{g/mL}$ . Este aumento também foi observado para o tratamento de 100  $\mu\text{g/mL}$  por 12 horas, e todos estes foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) à soroprivação. Já os demais tratamentos, apresentaram menores índices de células no estágio G0/G1 quando comparados à soroprivação (Figura 8).

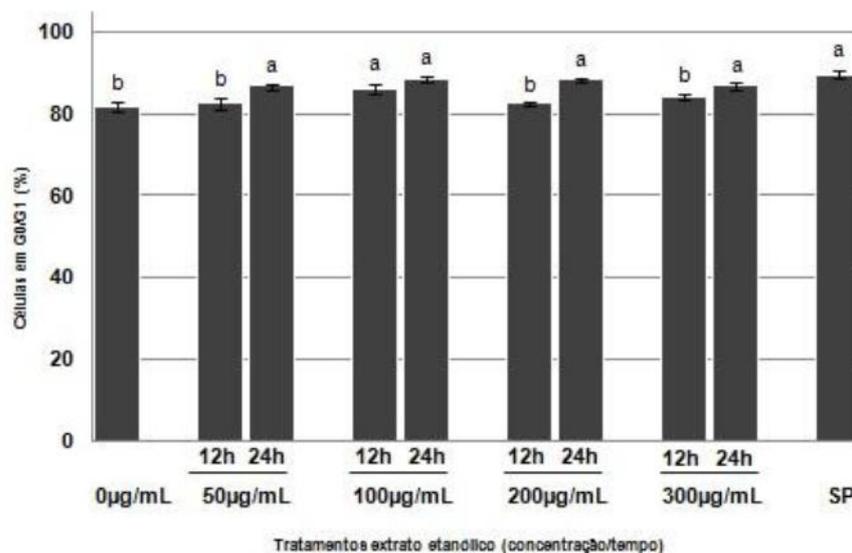


Figura 8. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos são indicadas por letras diferentes <sup>a,b,c</sup>. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média, com  $n=9$  (três repetições em triplicata).

Em relação aos índices de células em S e G2/M, a diferença observada entre o controle com 0  $\mu\text{g/mL}$  e a soroprivação ( $10,26 \pm 0,32\%$  e  $5,02 \pm 0,42\%$ , respectivamente) é reflexo dos valores observados em G0/G1 (Tabela 5). As diferenças encontradas entre os tratamentos com o extrato não tiveram uma relação

direta com a concentração e o tempo de exposição, assim como observado para os extratos anteriores.

Os picos de sub-G0/G1 para os tratamentos referentes a este extrato, em geral, foram menores ( $P < 0,05$ ) do que na soroprivação. Somente o tratamento de 200  $\mu\text{g/mL}$ , por 12 horas de exposição foi similar a ele. Não foi observada uma relação direta entre a concentração e tempo de exposição ao extrato com o índice de sub-G0/G1. Para a visualização dos histogramas referentes aos tratamentos do extrato etanólico, ver Anexo C.

Tabela 5. Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após exposição ao extrato etanólico.

Tratamentos	% de células em cada fase do ciclo celular				
	Ext. Etanólico	Sub-G0/G1	G0/G1	S	G2/M
0 $\mu\text{g/mL}$		0 <sup>c</sup>	81,89 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>	8,22 $\pm$ 0,44 <sup>ab</sup>	10,26 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>
50 $\mu\text{g/mL}$	12h	0,65 $\pm$ 0,08 <sup>bc</sup>	82,74 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup>	8,84 $\pm$ 0,40 <sup>ab</sup>	7,76 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>
	24h	0,78 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>	86,81 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	5,32 $\pm$ 0,44 <sup>c</sup>	7,08 $\pm$ 0,46 <sup>bc</sup>
100 $\mu\text{g/mL}$	12h	1,02 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	86,04 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	7,70 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	5,23 $\pm$ 0,23 <sup>de</sup>
	24h	1,04 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	88,59 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	5,70 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	4,78 $\pm$ 0,16 <sup>e</sup>
200 $\mu\text{g/mL}$	12h	1,93 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	82,50 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>	9,57 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	5,93 $\pm$ 0,36 <sup>cde</sup>
	24h	0,55 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>	88,36 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	5,36 $\pm$ 0,42 <sup>c</sup>	6,18 $\pm$ 0,24 <sup>cd</sup>
300 $\mu\text{g/mL}$	12h	1,13 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	84,02 $\pm$ 1,32 <sup>b</sup>	9,61 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	5,46 $\pm$ 0,29 <sup>de</sup>
	24h	1,18 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	86,89 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	5,70 $\pm$ 0,64 <sup>c</sup>	6,23 $\pm$ 0,23 <sup>cd</sup>
Soroprivação		2,25 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	89,65 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	5,29 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>	5,02 $\pm$ 0,42 <sup>cd</sup>

Diferenças significativas entre os tratamentos na mesma colunas estão representadas por letras diferentes <sup>a,b,c,d,e</sup> ( $P < 0,05$ ). Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média, com  $n=9$  (três repetições em triplicata).

## 4.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA REVERSIBILIDADE DE AÇÃO DOS EXTRATOS

Para o experimento 2 foram selecionados os tratamentos que promoveram aumento na concentração de células em G0/G1, quando comparado ao controle

com 0 µg/mL, identificados no experimento 1. Para o extrato hexânico, foram selecionados, portanto os tratamentos de 50 µg/mL e 100 µg/mL, tanto por 12 quanto por 24 horas de exposição, e de 200 µg/mL, por 12 horas. Para o extrato etanólico, dentre os tratamentos que demonstraram maiores porcentagens de células em G0/G1, foram priorizados os de 24 horas de exposição, com exceção da concentração 300 µg/mL (por ser uma concentração muito alta e, possivelmente, de maior toxicidade). Os tratamentos referentes ao extrato aquoso não foram analisados, pois nenhum deles resultou no aumento da proporção de células em G0/G1.

Para a análise de reversibilidade, portanto, as proporções de células em um mesmo estágio do ciclo celular (G0/G1, S ou G2/M) foram comparadas dentro de cada tratamento, até 36 horas após a remoção dos extratos. As análises foram feitas de 12 em 12 horas, ou seja, depois de 0, 12, 24 e 36 horas da retirada do tratamento. O objetivo foi identificar aquele onde o retorno das células ao ciclo celular (com a progressão para as fases subsequentes) ocorresse em menor intervalo de tempo. Portanto, não foi realizada comparação entre os tratamentos.

Nos tratamentos referentes ao extrato hexânico, não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) nas porcentagens de células nos estágios G0/G1 do ciclo celular, nos tempos de 0, 12, 24 e 36 horas após a remoção do extrato (Tabela 6), sugerindo que não houve reversibilidade de sua ação. Na soroprivação houve uma redução ( $P < 0,05$ ) da proporção de células em G0/G1 depois de 24h de cultivo em meio padrão (10% SFB), em relação ao tempo de 0 hora.

Para o extrato etanólico, somente o tratamento de 100 µg/mL, após 24 horas de exposição, apresentou uma proporção menor ( $P < 0,05$ ) de células em G0/G1 (Tabela 6). Essa redução ocorreu 12 horas após a remoção do extrato. Apesar de ter sido observada uma redução na proporção de células neste estágio para o tratamento de 200 µg/mL, por 24 horas de exposição, após 12 horas da retirada do contato com o extrato, tal diferença não foi significativa em relação aos demais tempos avaliados. Para melhor visualização da redução de células, ao longo do tempo, para estes tratamentos, ver Anexo D.

Tabela 6. Porcentagem de células na fase G0/G1 após a retirada dos tratamentos com extrato hexânico e etanólico.

		<b>G0/G1</b>			
<b>Tratamentos</b>	<b>Extrato</b>	<b>0h</b>	<b>12h</b>	<b>24h</b>	<b>36h</b>
Soroprivação		80,11 ± 1,44 <sup>a</sup>	88,09 ± 1,27 <sup>a</sup>	61,90 ± 4,07 <sup>b</sup>	77,95 ± 1,96 <sup>a</sup>
50 µg/mL	12h	71,20 ± 1,13	70,70 ± 1,13	73,86 ± 2,04	66,27 ± 4,67
50 µg/mL	24h	74,14 ± 3,73	71,83 ± 1,70	76,07 ± 1,82	75,65 ± 2,17
100 µg/mL	12h	<b>Hexânico</b> 72,25 ± 2,33	73,06 ± 1,08	74,43 ± 2,14	70,65 ± 3,33
100 µg/mL	24h	72,43 ± 1,45	74,87 ± 2,22	68,90 ± 3,65	71,35 ± 3,72
200 µg/mL	12h	69,28 ± 1,17	67,90 ± 0,87	76,07 ± 1,82	75,65 ± 2,17
50 µg/mL	24h	78,92 ± 0,41	76,54 ± 0,70	77,61 ± 1,46	80,88 ± 2,51
100 µg/mL	24h	<b>Etanólico</b> 81,84 ± 0,28 <sup>a</sup>	72,13 ± 1,65 <sup>b</sup>	76,96 ± 0,91 <sup>a</sup>	81,15 ± 2,47 <sup>a</sup>
200 µg/mL	24h	80,19 ± 0,45	71,11 ± 1,78	73,39 ± 1,44	75,54 ± 2,89

Os tempos de 0, 12, 24 e 36h, referem-se ao período de cultivo após a remoção dos tratamentos e subsequente leitura em citômetro de fluxo. Diferenças significativas entre os tempos, na mesma linha, estão representadas por letras diferentes <sup>a,b</sup> (P<0,05). Valores representam a média ± erro padrão da média, com n=9 (três repetições em triplicata).

Os resultados referentes ao estágio S do ciclo celular mostraram que apenas no tratamento com 50 µg/mL, por 24h de exposição ao extrato hexânico, houve um aumento (P<0,05) na proporção de células, o que ocorreu dentro de 12h após a retirada do tratamento (Tabela 7). Para os demais grupos avaliados, tanto do hexânico, quanto do etanólico, não foram observadas diferenças (P>0,05) na porcentagem de células neste estágio ao longo das 36 horas após a retirada do tratamento.

Tabela 7. Porcentagem de células na fase S após a exposição ao extrato hexânico e etanólico.

Tratamentos	Extrato	S			
		0h	12h	24h	36h
Soroprivação		7,20 ± 0,61	6,86 ± 1,24	9,70 ± 0,75	7,62 ± 0,77
50 µg/mL	12hs	8,44 ± 1,07	10,62 ± 1,35	9,66 ± 1,01	10,52 ± 0,63
50 µg/mL	24hs	6,09 ± 0,87 <sup>a</sup>	13,50 ± 1,15 <sup>b</sup>	9,28 ± 1,17 <sup>a</sup>	8,30 ± 0,47 <sup>a</sup>
100 µg/mL	12hs	<b>Hexânico</b> 8,63 ± 0,99	9,89 ± 1,06	8,78 ± 0,84	7,84 ± 0,33
100 µg/mL	24hs	7,18 ± 0,61	8,29 ± 0,43	7,68 ± 0,92	8,92 ± 1,01
200 µg/mL	12hs	10,32 ± 1,02	9,86 ± 1,08	9,66 ± 1,01	10,52 ± 0,63
50 µg/mL	24hs	9,33 ± 0,44	9,22 ± 1,21	9,55 ± 0,99	8,07 ± 1,15
100 µg/mL	24hs	<b>Etanólico</b> 8,44 ± 0,35	11,63 ± 1,07	10,0 ± 0,87	8,14 ± 1,97
200 µg/mL	24hs	9,01 ± 1,27	12,60 ± 1,08	8,94 ± 1,05	8,88 ± 0,92

Os tempos de 0, 12, 24 e 36h, referem-se ao período de cultivo após a remoção dos tratamentos e subsequente leitura em citômetro de fluxo. Diferenças significativas entre os tempos, na mesma linha, estão representadas por letras diferentes <sup>a,b</sup> (P<0,05). Valores representam a média ± erro padrão da média, com n=9 (três repetições em triplicata).

Nos grupos expostos por 12 horas às concentrações de 50 µg/mL e 200 µg/mL do extrato hexânico, ocorreu uma diminuição na porcentagem de células em G2, depois de 24 horas da retirada do extrato. Entretanto, estes resultados não tiveram relação com as porcentagens encontradas nas outras fases.

Já para os grupos expostos ao extrato etanólico, os resultados referentes à quantidade de células no estágio G2 parecem ter relação com a diminuição de células nos estágios G0/G1 (Tabela 8). No tratamento de 100 µg/mL, por 24 horas de exposição, houve um aumento (P<0,05) na porcentagem de células em G2 dentro das 12 horas seguintes à remoção do extrato, que corresponderia às células que saíram do estágio G0/G1 neste mesmo tempo. Isto também foi observado para o grupo exposto por 24 horas à concentração de 200 µg/mL, também para o extrato etanólico, onde ocorreu aumento na porcentagem de células em G2 (P<0,05) depois de 12 horas da retirada do tratamento, acompanhando a redução de células em G0/G1. Na soroprivação, o aumento de células em G2 ocorreu 24 horas depois da retirada da condição de inibição sendo que a redução de células em G0/G1 também ocorreu neste tempo.

Tabela 8. Porcentagem de células na fase G2 após a exposição aos tratamentos com extrato hexânico e etanólico.

Tratamentos	Extrato	G2			
		0h	12h	24h	36h
Soroprivação		10,52 ± 1,00 <sup>b</sup>	5,04 ± 1,32 <sup>b</sup>	28,16 ± 4,48 <sup>a</sup>	14,77 ± 1,23 <sup>b</sup>
50 µg/mL	12hs	14,82 ± 2,63 <sup>ab</sup>	17,25 ± 0,46 <sup>a</sup>	13,67 ± 0,91 <sup>ab</sup>	11,64 ± 1,28 <sup>b</sup>
50 µg/mL	24hs	19,76 ± 1,73	13,96 ± 1,00	14,57 ± 1,03	18,66 ± 2,32
100 µg/mL	12hs	<b>Hexânico</b> 17,56 ± 1,60	16,92 ± 1,20	15,86 ± 1,56	14,09 ± 1,78
100 µg/mL	24hs	19,49 ± 1,60	14,17 ± 1,47	20,17 ± 2,60	16,38 ± 3,05
200 µg/mL	12hs	18,18 ± 0,92 <sup>a</sup>	19,25 ± 3,53 <sup>a</sup>	13,67 ± 0,91 <sup>ab</sup>	11,64 ± 1,28 <sup>b</sup>
50 µg/mL	24hs	11,74 ± 0,50	12,35 ± 0,36	12,83 ± 0,59	10,10 ± 0,95
100 µg/mL	24hs	<b>Etanólico</b> 9,73 ± 1,19 <sup>b</sup>	14,27 ± 0,72 <sup>a</sup>	12,66 ± 0,60 <sup>ab</sup>	10,78 ± 1,73 <sup>ab</sup>
200 µg/mL	24hs	10,8 ± 0,47 <sup>b</sup>	14,56 ± 1,03 <sup>a</sup>	15,69 ± 0,75 <sup>a</sup>	10,37 ± 0,79 <sup>b</sup>

Os tempos de 0, 12, 24 e 36h, referem-se ao período de cultivo após a remoção dos tratamentos e subsequente leitura em citômetro de fluxo. Diferenças significativas entre os tempos, na mesma linha, estão representadas por letras diferentes <sup>a,b</sup> (P<0,05). Valores representam a média ± erro padrão da média, com n=9 (três repetições em triplicata).

Os histogramas referentes aos tratamentos de 100 µg/mL e 200 µg/mL por 24 horas de exposição ao extrato etanólico, nos tempos de 0 hora e 12 horas após a remoção dos extratos (para visualização da reversibilidade de ação), e os da soroprivação nos tempos de 0 hora e 24 horas, estão apresentados na Figura 9.

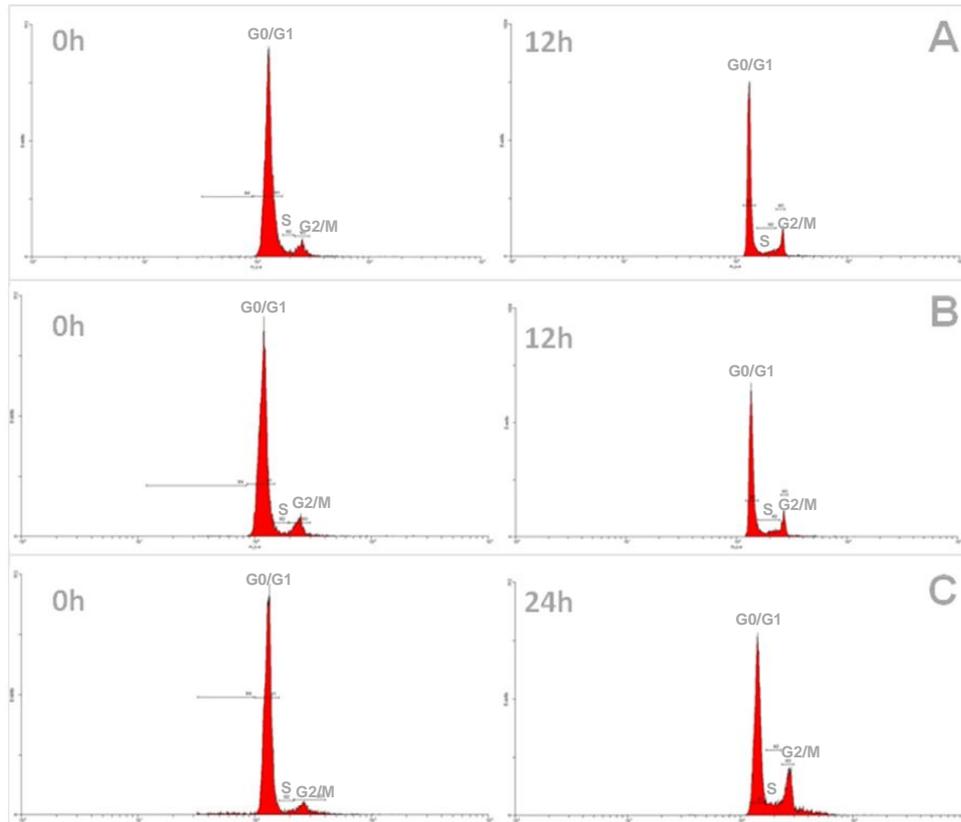


Figura 9. Histogramas demonstrando a porcentagem de células em G0/G1 em G2 0 hora e 12 horas após exposição ao extrato etanólico para (A) tratamento de 100 µg/mL após 0h e 12h após a exposição ao extrato etanólico por 24h, (B) 200 µg/mL após 0h e 12h após a exposição ao extrato etanólico por 24h e (C) soroprivação após 0h e 24h após a retirada da condição de inibição.

### 4.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para o experimento 3, foram selecionados os tratamentos que demonstraram reversibilidade quanto à inibição do ciclo celular, identificados através do experimento 2. Portanto, os grupos expostos aos tratamentos de 100 µg/mL e 200 µg/mL, por 24 horas de exposição ao extrato etanólico, foram submetidos à análise de viabilidade celular por Azul de Tripán, pois demonstraram redução na porcentagem de células em G0/G1 após a retirada do tratamento. Foram utilizados um controle positivo (soroprivação) e um controle negativo (0 µg/mL).

Não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de viabilidade celular entre a soroprivação, o controle com 0 µg/mL e o grupo exposto a 100 µg/mL do extrato

etanólico, por 24 horas. Entretanto, no tratamento de 200 µg/mL, pelo mesmo tempo de exposição, houve redução ( $P < 0,05$ ) na taxa de viabilidade (Figura 10) em relação aos demais.

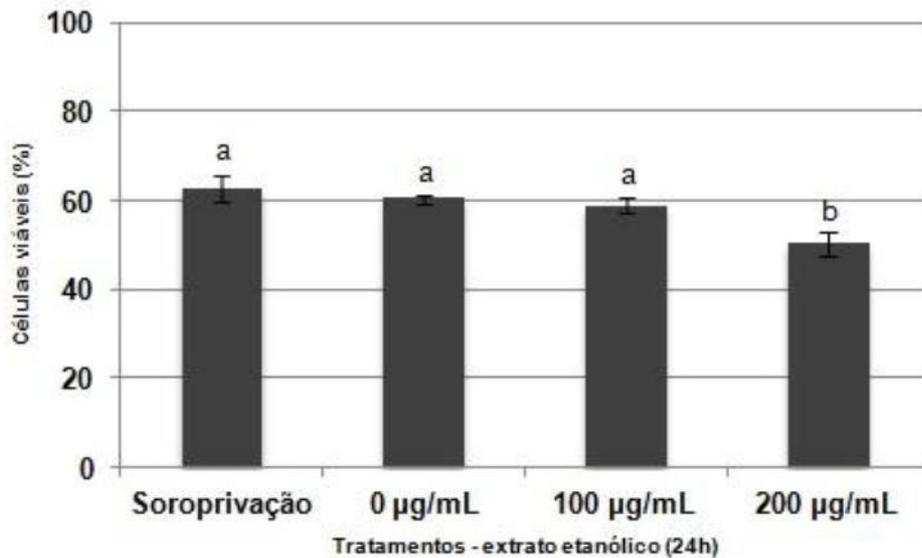


Figura 10. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos são representadas por letras diferentes <sup>a,b</sup>. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média, com  $n=9$  (três repetições em triplicata).

#### 4.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Foram selecionados para a análise de expressão gênica os mesmos tratamentos submetidos à análise de viabilidade celular, sendo eles 100 µg/mL e 200 µg/mL, por 24 horas de exposição ao extrato etanólico. Foi utilizado apenas o controle negativo (0 µg/mL) para comparação da expressão dos genes  *$\beta$ -ACTINA*, *HSP70.1A*, *HSBP1*, *HSP27.P1*, *BAX*, *BCL-2* e *WNT5A*.

Após a extração do RNA total, as amostras foram quantificadas para que fosse calculada a quantidade necessária para cada reação. A transcrição reversa foi

realizada em seguida, sendo o cDNA de cada amostra também foi quantificado. Os valores das quantificações estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Quantificação do RNA total e cDNA

Tratamentos	Repetições	Quantificação do RNA total (ng/ $\mu$ L)	Quantificação do cDNA (ng/ $\mu$ L)
<b>0 <math>\mu</math>g/mL</b>	1	242,65	670,75
	2	253,7	452
	3	17,75*	375,7
	4	249,95	704,75
<b>100 <math>\mu</math>g/mL / 24 h</b>	1	256,3	886,65
	2	191,9	881,1
	3	240,15	852,9
<b>200 <math>\mu</math>g/mL / 24 h</b>	1	363,4	792,55
	2	195,4	869,2
	3	179	901,8

Quantificações após o procedimento de extração do RNA total e de transcrição reversa.

\* Os valores de cDNA para este grupo foram mais baixos, por isto foi realizada uma extração adicional (repetição 4).

Após a padronização da PCR em tempo real, foram obtidas as temperaturas de dissociação (TD) (Tabela 10) e a eficiência da reação para cada gene avaliado (Tabela 11). Para a análise da quantificação relativa, utilizou-se como referência endógena o gene da  $\beta$ -ACTINA, cujo coeficiente de variação entre as amostras foi o menor (3,33%), quando comparado ao *GAPDH* (4,07%).

Tabela 10. Condições padronizadas da PCR em tempo real.

<b>Gene</b>	<b>cDNA (ng)</b>	<b>Primer (nM)</b>	<b>Temperatura de pareamento (°C)</b>	<b>Temperatura de dissociação (°C)</b>
<i>GAPDH</i>	400	100	53°C	82,7°C
<i>β-ACTINA</i>	400	100	53°C	84,8°C
<i>HSP70.1A</i>	800	100	59°C	86,5°C
<i>BAX</i>	800	100	64°C	83,6°C
<i>BCL-2</i>	800	100	53°C	83,3°C
<i>HSBP1</i>	800	100	55°C	82,0°C
<i>WNT5A</i>	800	100	67°C	86,9°C
<i>HSP27.P1</i>	800	100	55°C	84,1°C

Tabela 11. Valores da eficiência da reação para cada gene avaliado.

<b>Gene</b>	<b>Eficiência</b>	<b>r</b>
<i>GAPDH</i>	1,80	1
<i>β-ACTINA</i>	1,78	1
<i>HSP70.1A</i>	1,80	1
<i>BAX</i>	1,71	1
<i>BCL-2</i>	1,72	1
<i>HSBP1</i>	1,61	1
<i>WNT5A</i>	1,88	1
<i>HSP27.P1</i>	1,94	1

A partir das análises das curvas de dissociação dos genes avaliados, não foram observados picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos da PCR (Figura 11), validando, assim, a quantificação dos transcritos pelo presente trabalho.

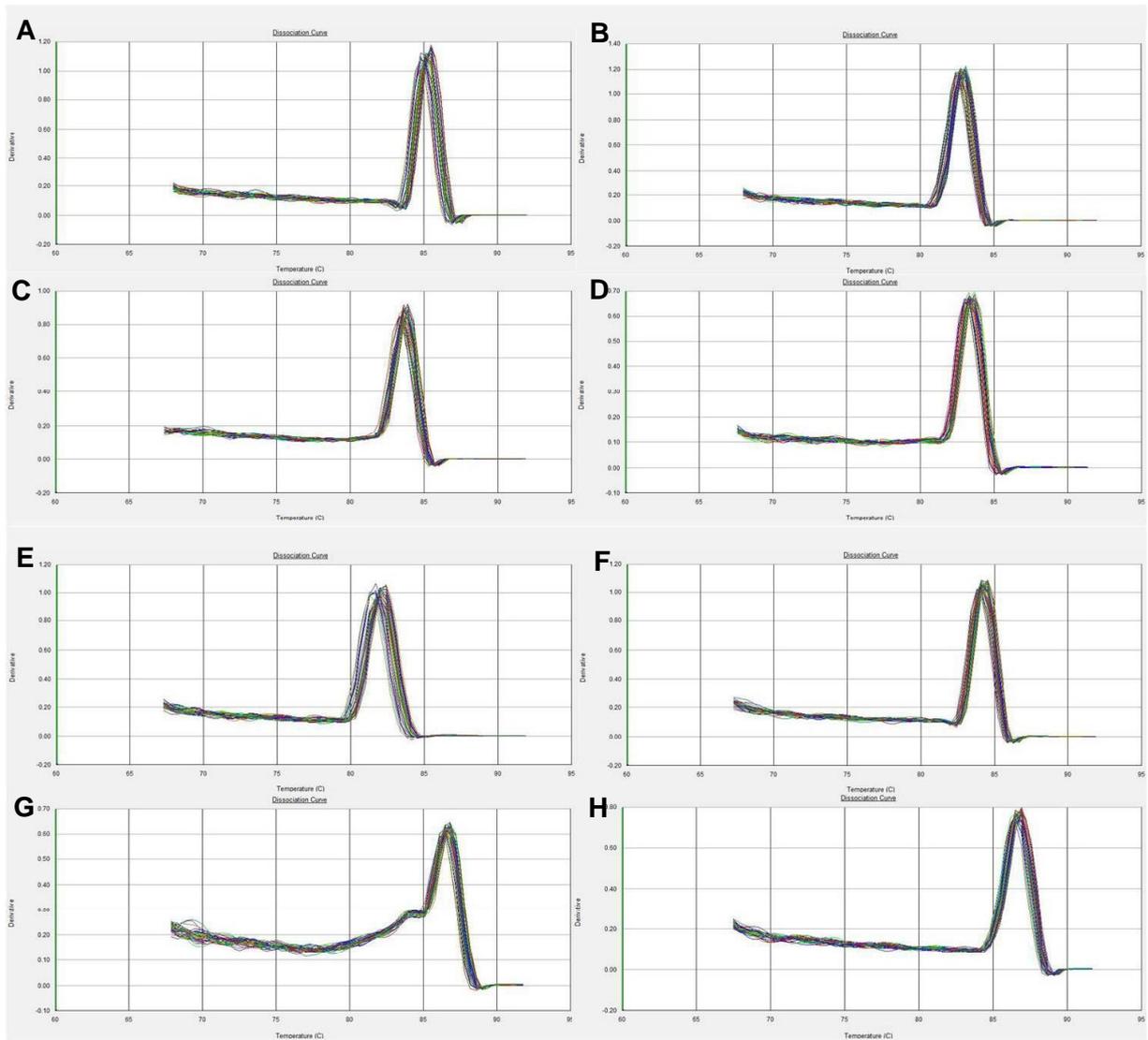


Figura 11. Curvas de dissociação para os genes de estresse e apoptose (A)  $\beta$ -ACTINA, (B) GAPDH, (C) BAX, (D) BCL-2, (E) HSB P1, (F) HSP 27.P1, (G) HSP 70.1A, (H) WNT 5A.

Para o tratamento de 100  $\mu\text{g/mL}$ , por 24 horas de exposição ao extrato etanólico, observou-se menor abundância de transcritos ( $P < 0,05$ ) para todos os genes relacionados ao processo de apoptose (*BCL-2*, *BAX* e *WNT5A*) e para a maior parte dos genes de resposta ao estresse (*HSP70.1A* e *HSBP1*), sendo o *HSP27.P1* o único transcrito que não apresentou diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) em relação ao controle 0  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 12).

Para o tratamento de 200  $\mu\text{g/mL}$ , por 24 horas de exposição ao extrato etanólico, também foi observada menor abundância de transcritos ( $P < 0,05$ ) para todos os genes relacionados ao processo de apoptose (*BCL-2*, *BAX* e *WNT5A*)

como também para os genes de resposta ao estresse (*HSP27* e *HSBP1*), sendo que apenas o gene *HSP70.1A* não apresentou diferenças significativas na quantificação dos transcritos ( $P>0,05$ ) em relação ao controle negativo.

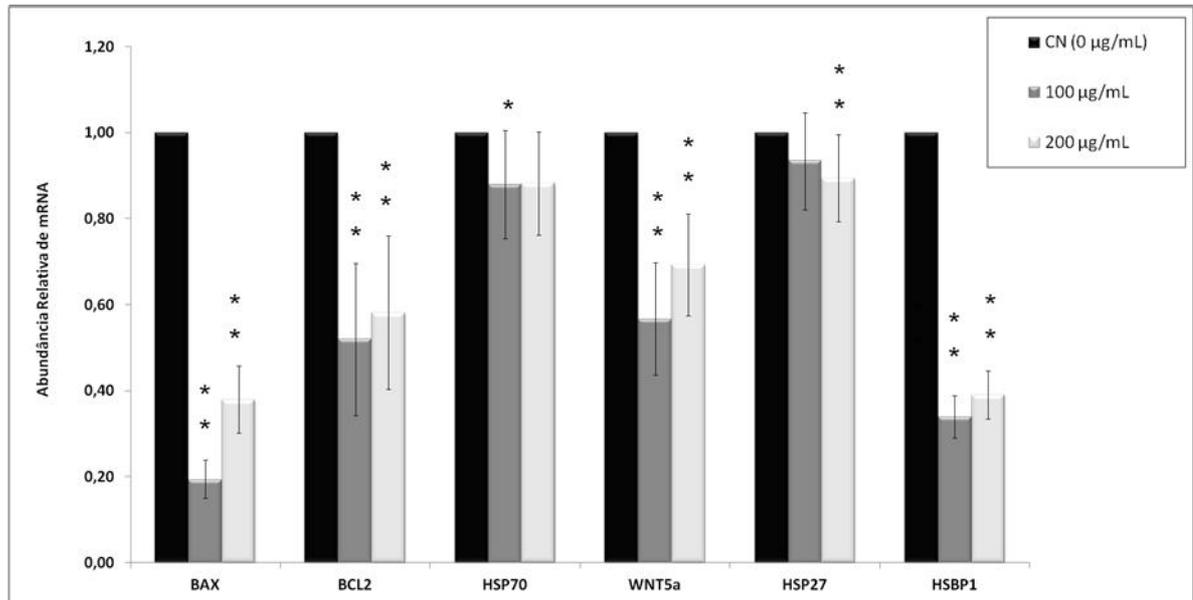


Figura 12. Gráfico demonstrativo da abundância relativa dos transcritos após exposição ao extrato etanólico. Diferenças significativas entre os grupos são indicadas por \*  $P<0,05$  e \*\* $P<0,001$ . Valores representam a média±erro padrão da média, com  $n=9$  (três repetições em triplicata), sendo utilizado o controle negativo (0 µg/mL) como grupo calibrador, com valor igual a 1.

## 6 DISCUSSÃO

Existem vários fatores que afetam o desenvolvimento de embriões reconstruídos por transferência nuclear de célula somática (TNCS). Entre eles está a sincronização do ciclo celular entre o oócito receptor e a célula doadora, para que ocorra uma reprogramação nuclear adequada. A rigorosa sincronia da célula somática em G0 ou G1 com o oócito estacionado em metáfase II permite que os cromossomos se condensem corretamente, resultando na manutenção da ploidia correta do embrião produzido (HAYES *et al*, 2005). Portanto, é desejável que a maior proporção possível de células doadoras de núcleo esteja em G0/G1 e, para isso, existem diversas substâncias capazes de sincronizar o ciclo celular nesta fase. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos de inibição do ciclo em fibroblastos bovinos no estágio G0/G1 a partir da exposição destas células aos extratos aquoso, hexânico e etanólico de folhas de *Azadirachta indica* (Nim), com o intuito de usá-las como doadoras de núcleo na TNCS.

Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que, em determinadas concentrações, os extratos etanólico e hexânico de folhas de Nim foram capazes de inibir o ciclo de fibroblastos bovinos em G0/G1. Os melhores tratamentos (100 µg/mL e 200 µg/mL, por 24 horas de exposição ao extrato etanólico) apresentaram taxas de células em G0/G1 com médias de 88,36±0,32% e 88,59±0,26%, respectivamente, valores estes, semelhantes à soroprivação (89,65±0,45%). Já o extrato aquoso não demonstrou efeitos de inibição da proliferação nos fibroblastos bovinos.

A inibição por soroprivação foi utilizada como controle positivo, por ser relatada como um dos métodos mais eficientes em sincronizar o ciclo das células doadoras de núcleo no estágio G0/G1 (WILMUT *et al.*, 1997; BOQUEST *et al.*, 1999; WELLS *et al.*, 2003). As porcentagens de células obtidas neste estágio pelo método de soroprivação estão de acordo com resultados obtidos por Hayes *et al.* (2005), que após 72 horas, fibroblastos adultos bovinos em cultivo com 0,5% de SFB, apresentaram uma taxa de 89,56 ± 5,15%, de células em G0/G1.

Foi observado que os fibroblastos bovinos tiveram respostas diferentes em relação à inibição do ciclo celular, conforme o extrato utilizado (aquoso, etanólico ou hexânico), o que pode estar relacionado com a variedade de compostos ativos presentes em cada um, de acordo com o solvente e o tipo de preparação empregada. Os métodos e o tempo de extração, bem como o solvente utilizado fornecem variados tipos e concentrações dos compostos, onde se considera a polaridade e afinidade das moléculas ao solvente (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1997; RUSAK *et al.*, 2008). Diversos trabalhos indicaram que o extrato etanólico de folhas de Nim é mais eficaz por apresentar uma ampla gama de propriedades farmacológicas (SUBAPRIYA E NAGINI, 2005), que pode ser explicado pelo fato de o etanol possuir uma extremidade polar e outra apolar, tornando-o capaz de dissolver tanto moléculas polares como moléculas apolares (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1997).

Alguns trabalhos têm relatado que o extrato aquoso de Nim apresenta atividade antineoplásica em modelos murinos, a partir da modulação de proteínas reguladoras do ciclo que, por sua vez, interferem na proliferação celular (BARAL e CHATTOPADHYAY, 2004; GANGAR *et al.*, 2006; ARORA, BANSAL e KOUL, 2012). No presente trabalho, para os grupos expostos ao extrato aquoso, não foi observado efeito de inibição da proliferação em fibroblastos bovinos. O tipo celular parece, portanto, interferir na forma de resposta ao extrato testado.

Sabe-se que complexos de proteínas CDK-ciclina são de fundamental importância para a progressão do ciclo celular, isto quer dizer que a variação dos níveis de ciclina participa da inibição e progressão do ciclo, sendo de extrema importância para o controle da proliferação celular (NAKAYAMA e NAKAYAMA, 2006). As células quiescentes apresentam como característica a redução da expressão de ciclinas D e E, que são essenciais para a progressão do ciclo celular na transição da fase G1 para a fase S (BOQUEST *et al.*, 1999). Alguns químicos que apresentaram sucesso na inibição do ciclo de células doadoras de núcleo para a clonagem, como butirolactona e afidicolina (KUES *et al.*, 2000), estão relacionados com a inibição destas ciclinas, promovendo a parada do ciclo celular em G0/G1, de forma reversível (KITAGAWA *et al.*, 1994).

Alguns compostos isolados do Nim, como nimbolide e quercetina, tem se destacado em trabalhos relacionados à inibição da proliferação de células cancerígenas (WOUDE *et al.*, 2003; ROY *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2009;

CASELLA *et al.*, 2014). A exposição de células HeLa ao nimbolide induziu a parada do ciclo celular na fase G0/G1, juntamente com o acúmulo de p21 (dependente de p53) e subexpressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, como ciclina B, ciclina D1 e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (PRIYADARSINI *et al.*, 2010). Outro estudo também indicou a modulação de proteínas reguladoras do ciclo, como ciclinas, Cdks e p53, induzindo a inibição do ciclo em linhagens de células cancerígenas (ROY *et al.*, 2007).

Recentemente, células pré-neoplásicas do fígado foram tratadas com quercetina, onde observaram a inibição da produção tanto de ciclinas A, como de ciclinas B. Além disso, também foi observado um aumento dos transcritos e de proteínas p53 após os tratamentos. O trabalho relatou, ainda, que os efeitos adversos da quercetina possam ser dependentes do tipo de célula ou do tecido expostos, a presença ou não de um fator estressante, bem como a dose administrada (CASELLA *et al.*, 2014).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham avaliado a ação de tais compostos, ou mesmo de extratos de Nim, em células somáticas não-cancerígenas de mamíferos, mas é possível considerar a hipótese de que os compostos nimbolide e quercetina estejam presentes nos extratos hexânico e etanólico utilizados no presente trabalho, atuando no processo de inibição da proliferação dos fibroblastos bovinos. Uma triagem fitoquímica poderia ser realizada para indicar quais compostos estão presentes nestes extratos, para que seja possível fazer uma associação com a ação provocada por eles.

Quanto aos índices de sub-G0/G1, é interessante ressaltar que quando as células são expostas à fluorocromos intercalantes de DNA, células necróticas ou em apoptose tardia irão apresentar uma intensidade de fluorescência reduzida em relação aos parâmetros FSC (indicativo do tamanho da célula) e SSC (indicativo da granulosidade ou complexidade da célula), que se mostra mais baixo quando comparado ao observado para células normais (TELFORD, KING e FRAKER, 1994). Portanto, o pico de sub-G0/G1 foi apresentado como uma análise preliminar de morte celular, não excluindo a necessidade de realização de outros métodos para identificar a presença de células apoptóticas.

No presente trabalho, a análise do índice de sub-G0/G1 nos grupos expostos aos extratos aquoso e hexânico aumentaram de acordo com a concentração e o tempo de exposição. As maiores concentrações do extrato hexânico (200 µg/mL/24

horas, 300 µg/mL/12 horas e 24 horas) demonstraram altos índices de sub-G0/G1, o que pode ser um indicativo de maior toxicidade em relação aos outros extratos. Já para os grupos expostos ao extrato etanólico, o aumento do índice de sub-G0/G1 não foi dose/dependente.

Quanto aos resultados de reversibilidade, apesar do extrato hexânico ter se mostrado eficiente em inibir o ciclo dos fibroblastos, não foi observada a reversibilidade de sua ação. Logo, nenhum dos tratamentos testados poderia ser utilizado para a clonagem, já que as células doadoras de núcleo precisam retomar a capacidade de proliferação celular após a exposição ao agente de inibição, dando início ao desenvolvimento embrionário (DAVIS, HO e DOWDY, 2001). Quanto aos grupos expostos por 24 horas ao extrato etanólico, às concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL, foi observada redução ( $P < 0,05$ ) de células no estágio G0/G1 dentro das 12 horas seguintes à retirada do tratamento. Na soroprivação também foi observada essa redução, entretanto, ela ocorreu 24 horas depois da remoção da condição de inibição, o que seria uma vantagem na utilização do extrato para a TNCS, já que o núcleo poderia retornar ao ciclo mais rapidamente e poderia conduzir o início do desenvolvimento embrionário de forma adequada.

Na análise de viabilidade celular por azul de Tripán, o tratamento de 100 µg/mL, por 24 horas de exposição ao extrato etanólico, não induziu redução da viabilidade celular, mas na concentração de 200 µg/mL, pelo mesmo tempo de exposição ao mesmo extrato, houve redução da porcentagem de células viáveis em relação ao controle de 0 µg/mL. Já foi relatado que extratos de Nim têm potencial de reduzir a viabilidade celular e induzir apoptose em diversos tipos de células tumorais. Kumar *et al.* (2006) observaram redução de 50% na proliferação de células de câncer de próstata, após administração de 100 µg/mL do extrato etanólico de Nim, por 24 horas de exposição, além de demonstrarem que o extrato induziu morte celular por apoptose, a partir de avaliação por fragmentação do DNA destas células. Em trabalho realizado por Elumalai *et al.* (2012b), a utilização de 10-50 µg/mL de extrato etanólico de Nim, também por 24 horas de exposição, foi capaz de induzir apoptose em células de câncer de mama. A exposição de células HeLa ao nimbolide reduziu a viabilidade de forma dependente da dose (PRIYADARSINI *et al.*, 2010).

Diferentes respostas também foram observadas para a análise dos transcritos reguladores de apoptose, *BAX*, *BCL-2* e *WNT 5A*, que se mostraram subexpressos

em relação ao controle com 0 µg/mL. O gene *BAX* é conhecido por sua função pró-apoptótica e o aumento da expressão de seus transcritos é um indicativo de indução de apoptose. A proteína Bax age de forma contrária à *Bcl-2*, que é uma proteína anti-apoptótica (LUCKEN-ARDJOMANDE E MARTINOU, 2005). Kumar *et al.* (2006) relataram uma diminuição na expressão de proteínas Bcl-2 e um aumento de proteínas Bax, em trabalho com células de câncer de próstata humano, após exposição ao extrato etanólico de Nim. Nele foram utilizadas as concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL, por 24 horas de exposição, e a alteração no balanço destas proteínas se deu de forma dose-dependente. Outro trabalho também relatou esta alteração para os genes *BAX* e *BCL2*, em células de câncer de mama, após exposição ao extrato etanólico de Nim, nas concentrações de 10 µg/mL e 50 µg/mL (ELUMALAI *et al.*, 2012).

Surpreendentemente, os genes *HSP 27.P1*, *HSB P1* e *HSP 70.1A* também foram subexpressos, sendo que apenas *HSP 27.P1* e *HSP 70.1A* para os tratamentos de 100 e 200 µg/mL, respectivamente, apresentam quantidade de transcritos similar, quando comparados ao grupo controle. O grupo das *Heat Shock Proteins* (HSPs) confere resistência a uma variedade de estresses celulares, e seu funcionamento implica, provavelmente, na estabilização e/ou restauração de elementos do citoesqueleto em células estressadas (LANDRY *et al.*, 1989). A subexpressão de quase todos os genes avaliados é intrigante, pois o próprio cultivo *in vitro* gera um estresse às células, o que demandaria proteínas relacionadas à sua proteção (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2007).

Uma possível explicação para a redução destes transcritos seria o fato de a maioria dos compostos bioativos do Nim pertencer à classe dos triterpenos, com destaque para os limonoides e flavonoides (KUMAR *et al.*, 2009), compostos que têm demonstrado efeito antioxidante em diversos modelos experimentais, seja *in vivo* ou *in vitro* (NAHAK e SAHU, 2010; DEKA *et al.*, 2013; GHIMERAY *et al.*, 2009). Portanto, o extrato etanólico pode ter protegido as células do estresse provocado pelo próprio cultivo *in vitro* (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2007), reduzindo, assim, a expressão de genes de resposta ao estresse.

Diferentes respostas aos extratos foram observadas no presente trabalho quando comparadas às encontradas na literatura, que utilizaram outros tipos celulares ou tecidos. É possível que a linhagem celular utilizada seja responsável por esta diferença, pois fibroblastos são, geralmente, mais resistentes em cultura

que outros tipos celulares (MORAES, AUGUSTO e CASTILHO, 2007). Por isso, quando comparados a células cancerígenas, podem responder de forma diferente aos tratamentos.

Além disso, os mecanismos de proliferação e de sobrevivência celular são alterados em células cancerígenas. O desenvolvimento do câncer está associado a um aumento da proliferação celular e à diminuição da apoptose (HANAHAN e WEINBERG, 2000), que leva a um acúmulo de mutações ao longo do tempo. Alguns dos mecanismos utilizados pelas células cancerígenas para contornar a morte celular programada envolvem a superexpressão de proteínas anti-apoptóticas, a redução da expressão de proteínas e caspases pró-apoptóticas, e a ativação constitutiva de fatores de sobrevivência (REED, 1999). Tais diferenças entre células normais e células cancerígenas podem, portanto, levar a respostas distintas após a exposição a agentes que atuam na proliferação celular.

Os resultados obtidos pelo presente estudo indicaram, portanto, que o extrato etanólico de Nim, a 100 µg/mL, por 24 horas, foi capaz de inibir o ciclo dos fibroblastos bovinos de forma reversível, não sendo observada redução da viabilidade celular ou aumento na expressão de genes relacionados à apoptose. A vantagem de demandar menor tempo de exposição (24 horas) para que seja alcançada porcentagem equivalente de células em G0/G1, em relação à soroprivação, que necessita de 48-72 horas (DAVIS, HO E DOWDY, 2001) e à confluência de aproximadamente 96 horas (HAYES *et al.*, 2005), o tornaria uma alternativa interessante aos métodos já existentes utilizados para inibir o ciclo de células doadoras de núcleo para a TNCS. Além disso, o efeito do tratamento com o extrato etanólico foi revertido dentro de 12 horas após a exposição, mais rápido que nas células inibidas por soroprivação (24 horas).

Entretanto, se faz necessário uma análise específica para verificar se de fato não há indução de apoptose, o que contornaria, também, os efeitos adversos relatados para os outros métodos de inibição em G0/G1 (KUES *et al.*, 2000). A triagem química visando conhecer os principais compostos ativos das plantas e seus metabólitos secundários também constitui-se em uma análise importante, que poderá vir a ser realizada, pois a partir dela pode-se chegar ao isolamento de substâncias importantes para a produção de novos fitoterápicos pela indústria farmacêutica, tanto para fins medicinais como de pesquisa científica.

## 7 CONCLUSÃO

O extrato etanólico, na concentração de 100 µg/mL, por 24h de exposição, demonstrou potencial para inibir reversivelmente o ciclo dos fibroblastos bovinos no estágio G0/G1, sem alterar a viabilidade dos mesmos. Uma análise específica de apoptose poderá confirmar se este tratamento poderia vir a se tornar um método alternativo para a sincronização de fibroblastos bovinos utilizados como doadores de núcleo para a transferência nuclear de célula somática, onde a célula teria condições de suportar o início do desenvolvimento embrionário de forma adequada.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, A.; JOHNSON, J.; LEWIS, M.; RAFF, K.; ROBERTS P.; WALTER, B. 2004. **Biologia Molecular da célula**. 4.ed. Porto Alegre: ARTMED.

ALESSI, F.; QUARTA, S.; SAVIO, M.; RIVA, F.; ROSSI, L.; STIVALA, L.A.; SCOVASSI, A.I.; MEIJER, L.; PROSPERI, E. 1998. The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity. **Experimental Cell Research**, **25 (245-1)**: 8-18.

AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. 1999. The regulation of apoptotic cell death. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, **32(9)**: 1053-1061.

ANTONSSON, B.; MARTINO, J.C. 2000. The Bcl-2 Protein Family. **Experimental Cell Research**, **256 (1)**: 50-57.

ARORA, N.; BANSAL, M. P.; KOUL, A. 2013. Azadirachta indica acts as a pro-oxidant and modulates cell cycle associated proteins during DMBA/TPA induced skin carcinogenesis in mice. **Cell Biochemistry and Function**, **31**: 385–394.

BARAL, R.; CHATTOPADHYAY, U. 2004. Neem (Azadirachta indica) leaf mediated immune activation causes prophylactic growth inhibition of murine Ehrlich carcinoma and B16 melanoma. **International Immunopharmacology**, **4**: 355–366.

BESSION, A.; DOWDY, S.F.; ROBERTS, J.M. 2008. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. **Developmental Cell**, **14 (2)**: 159-169.

BHUTANI, N; BRADY, JJ; DAMIAN, M; SACCO, A;. CORBEL, SY; BLAU, HM. 2010. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. **Nature**, **463**: 1042-1047.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R.K.; E BANDYOPADHYAY, U.. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, **82 (11)**: 1336-1345.

BLELLOCH, R.; WANG, Z.; MEISSNER, A.; POLLARD, S.; SMITH, A.; JAENISCH, R. 2006. Reprogramming Efficiency Following Somatic Cell Nuclear Transfer Is Influenced by the Differentiation and Methylation State of the Donor Nucleus. **Stem Cells**, **24**: 2007–2013.

BLOOM, J.; PAGANO, M. 2002. Butyrolactone: more than a kinase inhibitor? **Cell Cycle**, **1 (2)**: 117-118.

BOIANI, M.; ECKARDT, S.; SCHÖLER, H.R.; MCLAUGHLIN, K. J. 2002. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. **Genes and Development**, **16**: 1209-1219.

BOQUEST, A. C.; DAY, B. N.; PRATHER, R. S. 1999. Flow Cytometric Cell Cycle Analysis of Cultured Porcine Fetal Fibroblast Cells. **Biology of Reproduction**, **60**: 1013–1019.

BORALDI, F.; ANNOVI, G.; PAOLINELLI-DEVINCENZI, C.; TIOZZO, R.; QUAGLINO, D. 2008. The effect of serum withdrawal on the protein profile of quiescent human dermal fibroblasts in primary cell culture. **Proteomics**, **8 (1)**, 66-82.

BORDIGNON, V.; KEYSTON, R.; LAZARIS, A.; BILODEAU, A.S.; PONTES, J.H.F.; ARNOLD, D.; FECTEAU, G.; KEEFER, C.; SMITH, L.C. 2003. Transgene Expression of Green Fluorescent Protein and Germ Line Transmission in Cloned Calves Derived from In Vitro-Transfected Somatic Cells. **Biology of Reproduction**, **68**: 2013-2023.

BORGEL, J; GUIBERT, S; LI, Y; CHIBA, H; SCHÜBELER, D; SASAKI, H; FORNÉ, T; WEBER, M. 2010. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. **Nature Genetics**, **42**: 1093-1100.

BOURC'HIS, D; LE BOURHIS, D; PATIN, D; NIVELEAU, A; COMIZZOLI, P; RENARD, JP; VIEGAS-PE´QUIGNOT, E. 2001. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Current Biology**, **11**: 1542–1546.

BRAHMACHARI, G. 2004. Neem an omnipotent plant: a retrospection. **Chembiochem**, **5**: 408-421.

BRIGGS, R.; KING, T. J. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. **Proceeding of the National Academic Society**, **38 (4)**: 455-463.

CAMPBELL, K. H.; ALBERIO, R.; CHOI, I.; FISHER, P.; KELLY, R. D.; LEE, J. H.; MAALOUF, W. 2005. Cloning: eight years after Dolly. **Reproduction in Domestic Animals**, **40**: 256–268.

CAMPBELL, K.H.S. 1999. Nuclear Equivalence, Nuclear Transfer, and the Cell Cycle. **Cloning**, **1 (1)**: 3-15.

CAMPBELL, K. H. S.; LOI, P.; OTAEGUI, P. J.; WILMUT, I. 1996a. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Reviews of Reproduction**, **1**: 40–46.

CAMPBELL, K. H. S.; McWHIE, J.; RITTCHIE, W.A.; WILMUT, I. 1996b. Sheep cloned by nuclear transfer from a culture cell line. **Nature**, **380**: 64-66.

CASELLA, M. L.; PARODY, J. P.; CEBALLOS, M. P.; QUIROGA, A. D.; RONCO, M. T.; FRANCE´S, D. E.; MONTI, J. A.; PISANI, G. B.; CARNOVALE, C. E.; CARRILLO, M. C.; ALVAREZ, M. L. 2014. Quercetin prevents liver carcinogenesis by inducing cell cycle arrest, decreasing cell proliferation and enhancing apoptosis. **Molecular Nutrition & Food Research**, **58**: 289–300.

CIBELLI, J.B.; STICE, S.L.; GOLUEKE, P.J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONDE DE LEON, A.; ROBL, J. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. **Science**, **280**: 1256-1258.

CHEN, P.L.; SCULLY, P.; SHEW, J.Y.; WANG, J. Y.J.; LEE, W.H. 1989. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. **Cell**, **58**: 1193–1198.

CHO, J.K.; LEE, B.C.; PARK, J.I.; LIM, J.M.; SHIN, S.J.; KIM; K.Y.; LEE, B.D.; HWANG, W.S. 2002. Development of bovine oocytes reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation. **Theriogenology**, **57 (7)**: 1819-1828.

CHO, S.R.; OCK, S. A.; YOO, J.G.; MOHANA KUMAR, B.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. 2005. Effects of confluent, roscovitine treatment and serum starvation on the cell-cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts. **Reproduction in Domestic Animals**, **40 (2)**: 171-176

CLARKE, R. G.; LUND, E. K.; JOHNSON, I. T.; PINDER, A. C. 2000. Apoptosis Can Be Detected in Attached Colonic Adenocarcinoma HT29 Cells Using Annexin V Binding, But Not by TUNEL Assay or Sub-G0 DNA Content. **Cytometry**, **39**:141–150.

COLLAS, P.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. **Biology of Reproduction**, **46**: 3492-500.

CONNELL-CROWLEY, L.; ELLEDGE, S. J.; HARPER, J. W. 1998. G1 cyclin-dependent kinases are sufficient to initiate DNA synthesis in quiescent human fibroblasts. **Current Biology**, **8 (1)**: 65-68.

DARZYNKIEWICZ, Z. JUAN.; LI, G. X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. 1996. Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis). **Cytometry**, **27**: 1–20.

DAVIS, P.K.; HO, A.; DOWDY, S. F. 2001. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. **Biotechniques**, **30 (6)**: 1322-1326.

De BARROS, F.R., GOISSIS, M.D., CAETANO, H.V., PAULA-LOPES, F.F., PERES, M.A., ASSUMPÇÃO, M.E., VISINTIN, J.A.. 2010. Serum starvation and full confluency for cell cycle synchronization of domestic cat (*Felis catus*) foetal fibroblasts. **Reproduction Domestic Animals**, **45(1)**: 38-41.

DEKA, H.; DAS S.; LAHAN, J. P.; YADAV, R. N. S. 2013. *In-vitro* Free Radical Scavenging, Antioxidant and Antibacterial Activity of *Azadirachta Indica* A. Juss. of Assam. **Advances in Life Sciences**, **3(1)**: 1-4.

ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C. (*The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium*). 2009. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. **Science**, **324**: 522-528.

ELUMALAI, P.; GUNADHARINI, D.N.; SENTHILKUMAR, K.; BANUDEVI, S.; ARUNKUMAR, R.; BENSON, C.S.; SHARMILA, G.; ARUNAKARAN, J. 2012. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway. **Toxicology Letters**, **215**: 131-142.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: A manual of basic technique. Chapter 2: **Biology of cultured cells**. **Wiley-Liss, Inc**: New York, NY. 2000. 9-15.

GANGAR, S. C.; SANDHIR, R.; RAI, D. V.; KOUL, A. 2006. Modulatory effects of *Azadirachta indica* on benzo(a)pyrene-induced forestomach tumorigenesis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, **12(17)**: 2749-2755.

GAO, S.; MCGARRY, M.; FERRIER, T.; PALLANTE, B.; GASPARRINI, B.; FLETCHER, J.; HARKNESS, L.; SOUSA, P.; MCWHIR, J.; WILMUT, I. 2003. Effect of Cell Confluence on Production of Cloned Mice Using an Inbred Embryonic Stem Cell Line. **Biology of Reproduction**, **68**: 595–603.

GIBBONS, J.; ARAT, S.; RZUCIDLO, J.; MIYOSHI, K.; WALTENBURG, R.; RESPESS, D.; VENABLE, A.; STICE, S. 2002. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. **Biology of Reproduction**, **66 (4)**: 895-900.

GILANI, A.H., RAHMAN, A. 2005. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacol**, **100**: 43-49.

GHIMERAY, A. K.; JIN, C.; GHIMIRE, B. K.; CHO, D. H. 2009. Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta Indica* A. Juss grown in foothills of Nepal. **African Journal of Biotechnology**, **8 (13)**: 3084-3091.

GIRISH; K.; SHANKARA, B. S. 2008. Neem – A Green Treasure. **Electronic Journal of Biology**, **4 (3)**: 102-111.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, **144**: 646–674.

HEYMAN, Y. 2005. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, **45**: 353-361.

HOCHEDLINGER, K.; YAMADA, Y.; BEARD, C.; JAENISCH, R. 2005. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. **Cell**, **121(3)**: 465-77.

Hotz, M. A.; Gong, J.; Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z. 1994. Flow Cytometric Detection of Apoptosis: Comparison of the Assays of In Situ DNA Degradation and Chromatin Changes. **Cytometry**, **15**: 237-244.

ILLMENSEE, K.; HOPPE, P. C. Nuclear transplantation in mus musculus: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell**, **23 (1)**: 9-18.

KASINATHAN, P.; KNOTT, J. G.; WANG, Z.; JERRY, D. J.; ROBL, J. M. 2001. Production of calves from G1 fibroblasts. **Nature Biotechnology**, **19**: 1176–1178.

KITAGAWA, M.; HIGASHI, H.; TAKAHASHI, I.S.; OKABE, T.; OGINO, H.; TAYA, Y.; HISHIMURA S.; OKUYAMA, A. 1994. A cyclin-dependent kinase inhibitor, butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. **Oncogene**, **9 (9)**: 2549-57.

KORFIATIS, N.; TROUNSON, A.; LACHAM-KAPLAN, O. 2001. Cell synchronization for the purposes of nuclear transfer in the bovine. **Cloning Stem Cells**, **3 (3)**: 125-138.

KOUL, A.; BHARRHAN, S.; SINGH, B.; RISHI, P. 2009. Potential of *Azadirachta indica* against *Salmonella typhimurium* -induced inflammation in BALB/c mice. **Inflammopharmacology**, **17 (1)**: 29-36,

KUBOTA, C.; YAMAKUCHI, H.; TODOROKI, J.; MIZOSHITA, K.; TABARA, N.; BARBER, M.; YANG, X. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. **PNAS**, **97 (3)**: 990-995.

KUES, W.A.; ANGER, M.; CARNWATH, J.W.; PAUL, D.; MOTLIK, J.; NIEMANN, H. 2000. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. **Biology of Reproduction**, **62 (2)**: 412-419.

KUES, W.A.; CARNWATH, J.W.; PAUL, D.; NIEMANN, H. 2002. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts by serum deprivation initiates a nonconventional form of apoptosis. **Cloning Stem Cells**, **4 (3)**: 231-243.

KUMAR, G.H.; PRIYADARSINI, R.V.; VINOOTHINI, G.; LETCHOUMY, P.V.; NAGINI, S. 2010. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit cell proliferation and induce apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. **Invest New Drugs**, **28**: 392–401.

KUMAR, G. H.; MOHAN, C.K.V.P.; RAO, A. J.; NAGINI, S. 2009. Nimbolide a limonoid from *Azadirachta indica* inhibits proliferation and induces apoptosis of human choriocarcinoma (BeWo) cells. **Invest New Drugs**, **27**: 246–252.

KUMAR, S.; SURESH, P.K.; VIJAYABABU, M.R.; ARUNKUMAR, A.; ARUNAKARAN, J. 2006. Anticancer effects of ethanolic extract on prostate cancer cell line. **Journal of Ethnofarmacology**, **105**: 246-250.

- LANDRY, J.; CHRITIEN, P.; LAMBERT, H.; HICKEY, E.; WEBER, L. A. 1989. Heat Shock Resistance Conferred by Expression of the Human HSP27 Gene in Rodent Cells. **The Journal of Cell Biology**, **109**: 7-15.
- LAVOIE, J. N.; HICKEY, E.; WEBER, L. A.; LANDRY, J. 1993. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 25. **The Journal of Biological Chemistry**, **268**: 24210-24214.
- LEE, G. S.; KIM, H. S.; HYUN, S. H.; LEE, S. H.; JEON, H. Y.; NAM, D. H.; JEONG, Y. W.; KIM, S.; KIM, J. H.; HAN, J. Y.; AHN, C.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. 2005. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. **Theriogenology**, **63**: 973–991.
- LEE, S. M.; OLSEN, J. I.; SCHWEIZER, M. P.; KLOCKE, J. A. 1988. Neem allelochemicals and insect control. **Phytochemistry**, **27**: 2773-5.
- LI, X.; TREMOLEDA, J. L.; ALLEN, W. R. 2003. Effect of the number of passages of fetal and adult fibroblasts on nuclear remodelling and first embryonic division in reconstructed horse oocytes after nuclear transfer. **Reproduction**, **125**: 535-542.
- LIU, Z.H.; SONG, J.; WANG Z.K.; TIAN J.T.; KONG Q.R.; ZHENG ; YIN Z.; GAO L.; MA H.; SUN S.; LI Y.T.; WANG H.B.; PRATHER, R.S.. 2008. Green fluorescent protein (GFP) transgenic pig produced by somatic cell nuclear transfer. **Chinese Science Bulletin**, **53 (7)**: 1035-1039.
- LOGAN, C.Y.; NUSSE, R. 2004. The WNT Signaling Pathway in Development and Disease. **Annual Review Of Cell And Developmental Biology**, **20**: 781-810.
- LUCKEN-ARDJOMANDE, S.; MARTINOU. J. 2005. Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. **Comptes Rendus Biologies**, **328(7)**: 616–631.
- LUKAS, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J.. 2004. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. **DNA Repair**, **3**: 997–1007.
- MALLICK, A.; BARIK, S.; GOSWAMI, K. K.; BANERJEE, S.; GHOSH, S.; SARKAR, K.; BOSE, A.; BARAL, R. 2013. Neem Leaf Glycoprotein Activates CD8+ T Cells to Promote Therapeutic Anti-Tumor Immunity Inhibiting the Growth of Mouse Sarcoma. **Plos One**, **8(1)**: e47434- e47434.

- MARINOVA, E.M.; YANISHLIEVA, N.V. 1997. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. **Food Chemistry**, **58 (3)**: 245-248.
- MGBONYEBI, O. P.; RUSSO, J.; RUSSO, I. H. 1999. Roscovitine Induces Cell Death and Morphological Changes Indicative of Apoptosis in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, **59**: 1903–1910.
- MIYAMOTO, K.; HOSHINO, Y.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; IMAI, H. 2007. Effects of Synchronization of Donor Cell Cycle on Embryonic Development and DNA Synthesis in Porcine Nuclear Transfer Embryos. **Journal of Reproduction and Development**, **53 (2)**: 237-245.
- MODIANO, J.F.; RITT, M.G.; WOJCIESZYN, J.; SMITH III, R. 1999. Growth arrest of melanoma cells is differentially regulated by contact inhibition and serum deprivation. **DNA Cell Biology**, **18**: 357–367.
- MORAES, Ângela Maria; AUGUSTO, Elisabeth F. Pires; CASTILHO, Leda R. **Tecnologia do cultivo de Células Animais: De biofármacos a Terapia Gênica**. 1.ed. São Paulo: ROCA, 2007.
- MOSSER, D.D.; CARON, A.W.; BOURGET, L.; DENIS-LAROSE, C.; MASSIE, B. 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, **17 (9)**: 5317-5327.
- MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. 2005. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, **24 (1)**: 139-48.
- MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. 2006. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, **73**: 1367-1379.
- NAHAK, G.; SAHU, R. K. 2010. In vitro antioxidative activity of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* Leaves by DPPH scavenging assay. **Nature and Science**, **8 (4)**: 22-28.
- NAKAI, R.; MORIMOTO. 1993. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggest a new regulatory pathway. **Molecular and Cellular Biology**, **13**: 1983-1997.

NAKAYAMA, K. I.; NAKAYAMA, K. 2006. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. **Nature Reviews/ Cancer**, 6: 369-381.

NELSON, P. J.; DANIEL, T. O. 2002. Emerging targets: Molecular mechanisms of cell contact-mediated growth control. **Kidney International**, 61 (1): 99–S105

NIEMANN, H.; TIAN, X. C.; KING, W. A.; LEE, R. S. F. 2008. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**, 135: 151–163.

NIEMANN, H; TIAN, XC; KING, WA; LEE, RSF. 2008. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**. 135: 151–163.

OBACK, B.; WELLS, D. 2004. Practical aspects of donor cell selection for nuclear cloning. **Cloning Stem Cells**, 4 (2): 169-174.

Ono, Y.; Kono, T. 2006. Irreversible barrier to the reprogramming of donor cells in cloning with mouse embryos and embryonic stem cells. **Biology of Reproduction**, 75(2): 210-6.

PARK, H. J.; KOO, O. J.; KWON, D. K.; KANG, J. T.; JANG, G.; LEE, B. C. 2010. Effect of Roscovitine-Treated Donor Cells on Development of Porcine Cloned Embryos. **Reproduction Domestic Animals**, 45: 1082–1088.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, 30 (9): 26-36.

POLAQUINI, S.R.B.; SVIDZINSKI, T.I.E.; KEMMELMEIER, C.; GASPARETTO, A. 2006. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. **Archives of Oral Biology**, 51(6): 482-490.

PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biology of Reproduction**, 41: 414–418.

PRIYADARSINI, R. V.; MANIKANDAN, P.; KUMAR, G. H.; NAGINI, S. 2009. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit hamster cheek pouch carcinogenesis by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes, DNA damage, antioxidants, invasion and angiogenesis. **Free Radical Research**, 43 (5): 492-504.

PASQUE, V; JULLIEN, J; MIYAMOTO, K; HALLEY-STOTT, R.P; GURDON, J.B. 2011. Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. **Cell Press: Trends in Genetics, 27 (12):** 516- 525.

QU, Z.; MACLELLAN, W. R.; WEISS, J. N. 2003. Dynamics of the Cell Cycle: Checkpoints, Sizers, and Timers. **Biophysical Journal, 85(6):** 3600–3611.

RAVICHANDRAN, K.S. 2003. “Recruitment Signals” from apoptotic cells: Invitation to a quiet meal. **Cell, 113:** 817-820.

REED, J. C. 1999. Apoptosis-targeted therapies for cancer. **Cancer Cell, 3:** 17-22.

REIK, W.. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature, 447 (24):** 425-432.

RITCHIE, W.A. 2006. Nuclear transfer in sheep. **Methods Molecular Biology, 325:** 11-23.

ROBL, J. M.; PRATHER, R.; BARNES, F.; EYESTONE, W.; NORTHEY, D.; GILLIGAN, B.; FIRST, N. L. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. **Journal of Animal Science, 64 (2):** 642-647.

ROBBINS, S.T.; COTRAN, R.S. Patologia: Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROY, M.K.; KOBORI, M.; TAKENAKA, M.; NAKAHARA, K.; SHINMOTO, H.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. 2007. Antiproliferative Effect on Human Cancer Cell Lines after Treatment with Nimbolide Extracted from an Edible Part of the Neem Tree (*Azadirachta indica*). **Phytotherapy Research, 21:** 245–250.

ROBL, J. M. 1999. Development and application of technology for large scale cloning of cattle. **Theriogenology, 51 (2):** 499-508.

RUPACHANDRA, S.; SARADA, D. V. L. 2014. Induction of Apoptotic Effects of Antiproliferative Protein from the Seeds of *Borreria hispida* on Lung Cancer (A549) and Cervical Cancer (HeLa) Cell Lines. **BioMed Research International, 2014:** 1-8.

RUSAK, G.; KOMES, D.; LIKICA, S.; HORZIC, D.; KOVAC, M. 2008. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry, 110:** 852–858.

SATYAL, S. H.; CHEN, D.; FOX, S.G. 1998. Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. **Genes and Development**, **12**: 1962-1974.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Development**, **13**: 1501–1512.

SMITH, L. C.; WILMUT, I.; HUNTER, R. H. 1988. Influence of cell cycle stage at nuclear transplantation on the development in vitro of mouse embryos. **Journal of Reproduction & Fertility**, **84**: 619-624.

SOON-CHYE, N.; NAIQING, C., WAN-YUE, Y.; SWEE-LIAN, L.; GUO-QING, T.; BARBARA, M.; LAY, G. T.; PAOLO, M. 2004. The first cell cycle after transfer of somatic cell nuclei in a non-human primate. **Development**, **131**: 2475-2484.

SUBAPRIYA, R.; NAGINI, S. 2005. Medicinal properties of neem leaves: A review. **Current Medicinal Chemistry - Anticancer Agents**, **5**: 149-56.

TACHIBANA, M.; AMATO, P.; SPARMAN, M.; GUTIERREZ, N.M.; TIPPNER-HEDGES, R.; MA, H.; KANG, E.; FULATI, A.; LEE, H.S.; SRITANAUDOMCHAI, H.; MASTERSON, K.; LARSON, J.; EATON, D.; SADLER-FREDD, K.; BATTAGLIA, D.; LEE, D.; WU, D.; JENSEN, J.; PATTON, P.; GOKHALE, S.; STOUFFER, R.L.; WOLF, D.; MITALIPOV, S. 2013. Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. **Cell**, **153**: 1228–1238.

TANI, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. 2001. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic reprogramming. **Biology of Reproduction**, **69**: 1890-1894.

TELFORD, W. G., KING, L. E., FRAKER, P. L. 1994. Rapid quantification of apoptosis in pure and heterogenous cell populations using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, **172**: 1–16.

TOLEDO, L.M.; LYDON, N.B. 1997. Structures of staurosporine bound to CDK2 and cAPK – new tools for structure-based design of protein kinase inhibitors. **Structure**, **5 (12)**: 1551-1556.

TOMII, R.; KUROME, M.; WAKO, N.; OCHIAI, T.; MATSUNARI, H.; KANO, K.; NAGASHIMA, H. 2009. Production of cloned pigs by nuclear transfer of preadipocytes following cell cycle synchronization by differentiation induction. **Journal of Reproduction and Developmental**, **55 (2)**: 121-127.

TORII, K.; NISHIZAWA, K.; KAWASAKI, A.; YAMASHITA Y.; KATADA, M.; ITO, M.; NISHIMOTO, I.; TERASHITA, K.; AISO, S.; MATSUOKA, M. 2008. Anti-apoptotic action of Wnt5a in dermal fibroblasts is mediated by the PKA signaling pathways. **Cellular Signalling, 20**: 1256–1266.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. 2000. Flow Citometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods, 243**: 167-190.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R.. 2001. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. **Molecular Reproduction and Development, 58**: 376–383.

WAKAYAMA, T.; RODRIGUEZ, I.; PERRY, A. C. F.; YANAGIMACHI, R.; MOMBAERTS, P. 1999. Mice cloned from embryonic stem cells. **PNAS, 96 (26)**: 14984–14989.

WALL, R. J.; POWELL., A. M.; PAAPE, M. J.; KERR, D. E.; BANNERMAN, D. D.; PURSEL, V. G.; WELLS, K. D.; TALBOT, N.; HAWK, H. W. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. **Nature Biotechnology, 23**: 445-451.

WEAVER, B. A. A.; CLEVELAND, D.W. 2005. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer Cell, 8**: 7-12.

WELLS, D.N. 2005. Animal cloning: problems and prospects. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties, 24 (1)**: 251-264.

WELLS, D. N.; LAIBLE, G.; TUCKER, F. C.; MILLER, A. L.; OLIVER, J. E.; XIANG, T.; FORSYTH, J. T.; BERG, M. C.; COCKREM, K.; L'HUILLIER, P. J.; TERVIT, H. R.; OBACK, B. 2003. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. **Theriogenology, 59 (1)**: 45-59.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H.R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology of Reproduction, 60**: 996–1005.

WELLS, D. N.; MISICA, P.; TERVIT, H. R.; VIVANCO, W. H. 1998. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of Enderby Island cattle breed. **Reproduction, Fertility and Development, 10**: 369–378.

WHITWORTH, K.M.; PRATHER, R.S.. 2010. Somatic Cell Nuclear Transfer Efficiency: How Can It Be Improved Through Nuclear Remodeling and Reprogramming? **Molecular Reproduction & Development**, **77**: 1001–1015.

WILLASDEN, S. M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, **320**: 63–65.

WILMUT, I.; BEAUJEAN, N.; DE SOUSA, P. A.; DINNYES, A.; KING, T. J.; PATERSON, L. A.; WELLS, D. N.; YOUNG, L. E.. 2002. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, **419**: 583-586.

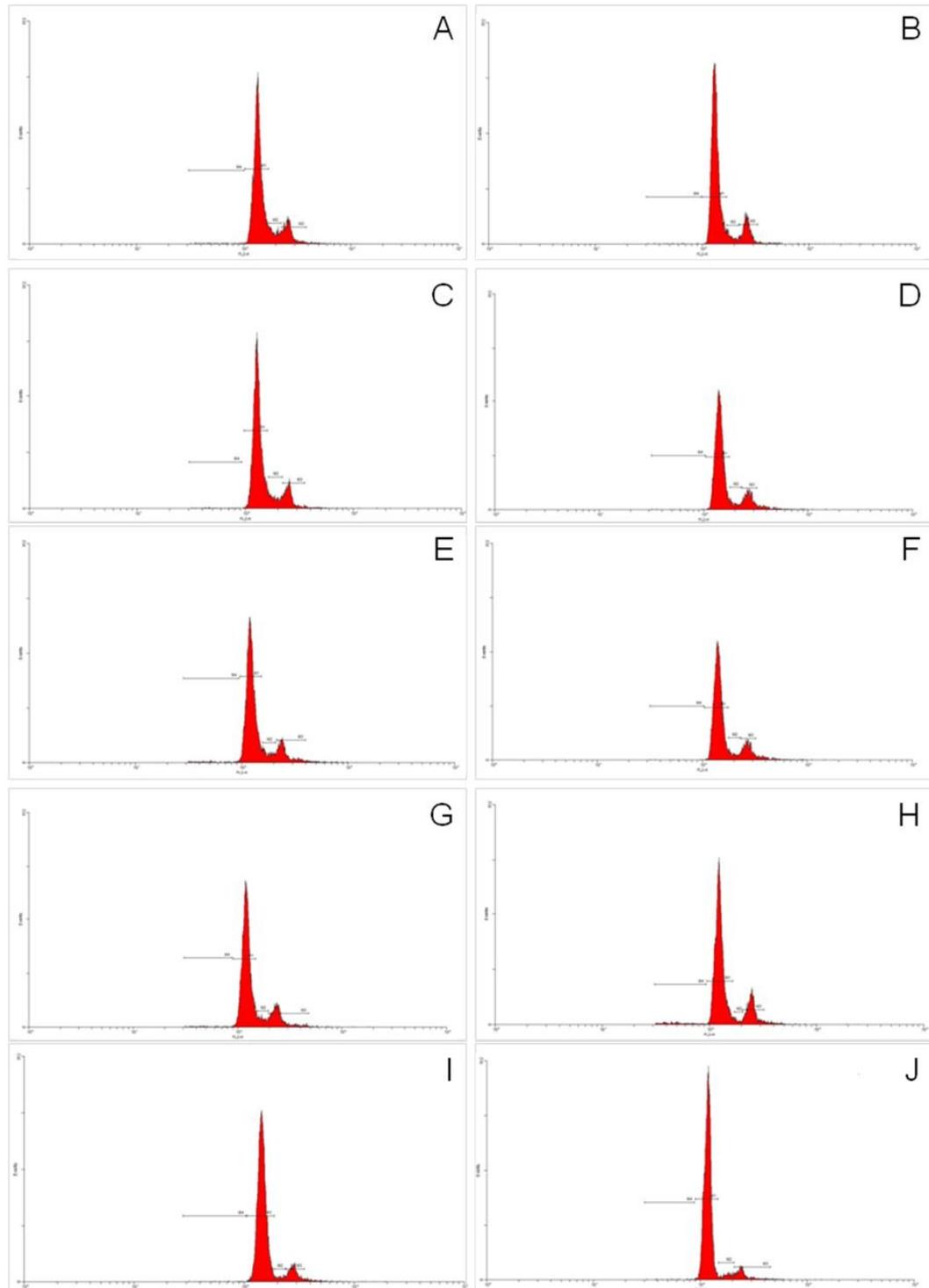
WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; MCWHIR, J.; KIND, A.J.; CAMPBELL, K.H.S.. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, **385**: 810-813.

WILMUT, I.; CAMPBELLS, K. H. S.; O'NEILL, G. T. 1992. Sources of totipotent nuclei including embryonic stem cells. **Symposium on Cloning on Cloning Mammals by Nuclear Transfer, Colorado State University, Colorado**, p. 8-16.

YANG, X.; SMITH, S.L.; TIAN, X.C.; LEWIN, H.A.; RENARD, J.P.; WAKAYAMA, T. 2007. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics**, **39 (3)**: 295-302.

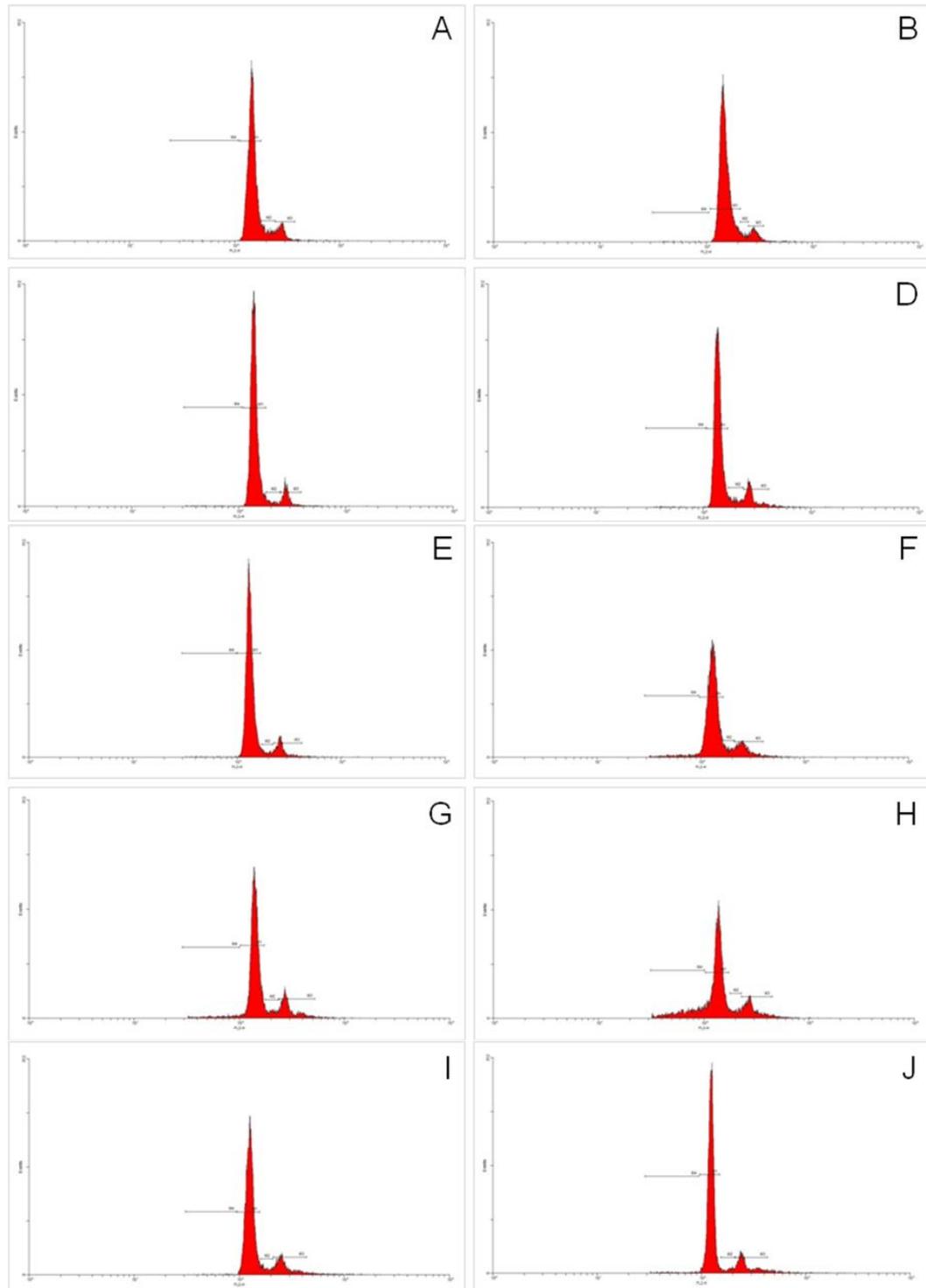
ZAKHARTCHENKO, V.; DURCOVA-HILLS, G.; SCHERNTHANER, W.; STOJKOVIC, M.; REICHENBACH, H. D.; MUELLER, S.; STEINBORN, R.; MÜLLER, M.; BREM, G.; WOLF, E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. **Jornal of Reproduction and Fertility**, **115**: 325-331.

## ANEXO A – HISTOGRAMAS DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS EXPOSTAS AO EXTRATO AQUOSO DE *AZADIRACHTA INDICA*



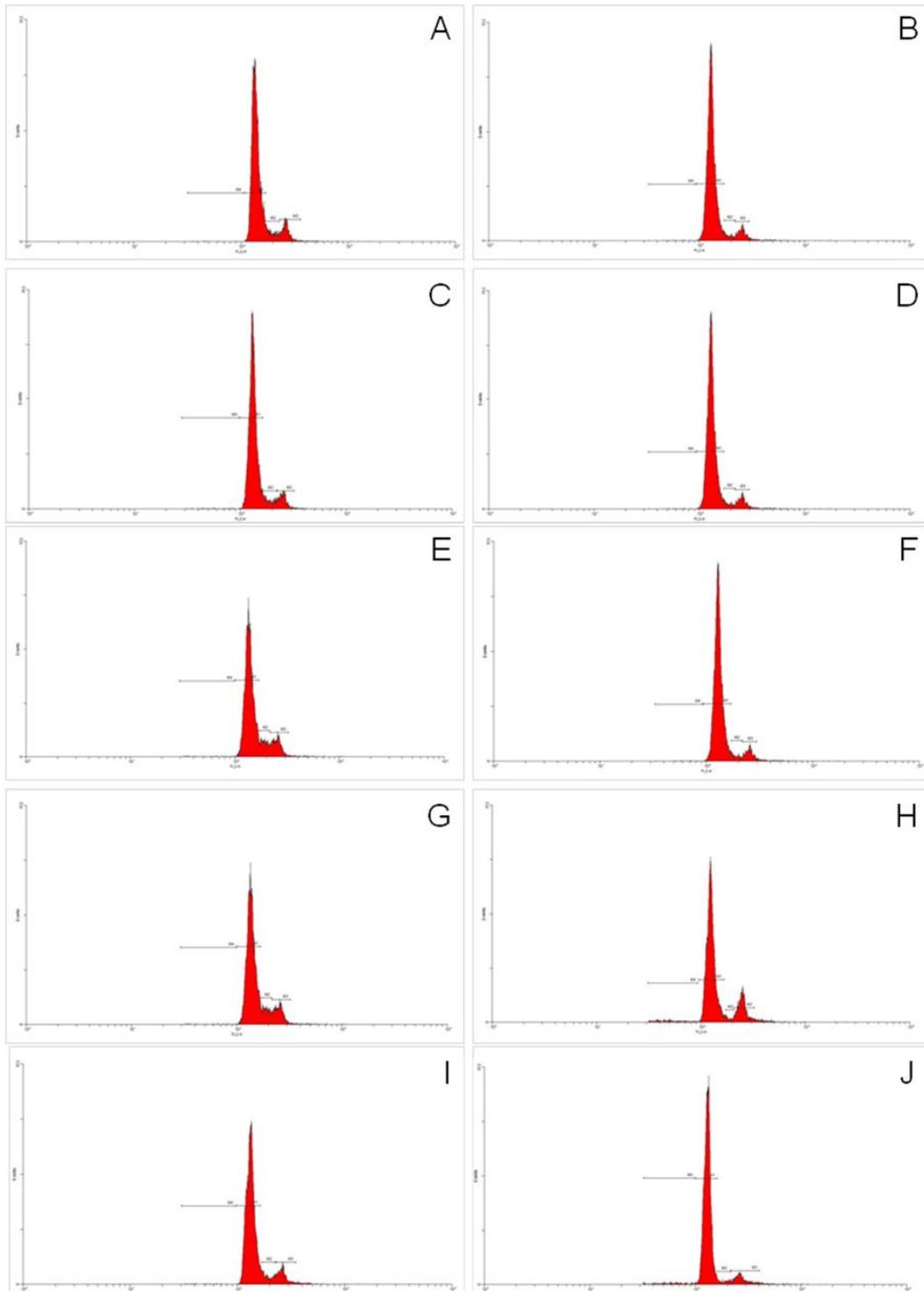
Histogramas gerados pelo Citômetro de Fluxo por macacão com IP após exposição ao extrato aquoso. Cada histograma se refere a um tratamento: (A) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  / 12 h, (B) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  / 24 h, (C) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  / 12 h, (D) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  / 24 h, (E) 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  / 12 h, (F) 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  / 24 h, (G) 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  / 12 h, (H) 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  / 24 h, (I) 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (J) Soroprivação.

**ANEXO B – HISTOGRAMAS DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS EXPOSTAS AO EXTRATO HEXÂNICO DE *Azadirachta indica***



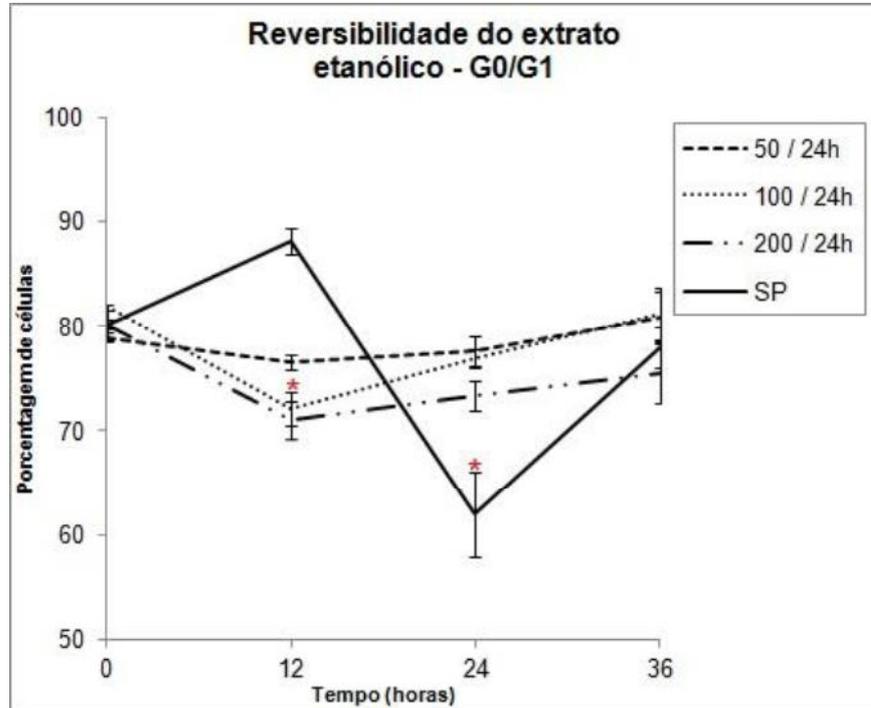
Histogramas gerados pelo Citômetro de Fluxo por macacão com IP após exposição ao extrato hexânico. Cada histograma se refere a um tratamento: (A) 50 µg/mL / 12 h, (B) 50 µg/mL / 24 h, (C) 100 µg/mL / 12 h, (D) 100 µg/mL / 24 h, (E) 200 µg/mL / 12 h, (F) 200 µg/mL / 24 h, (G) 300 µg/mL / 12 h, (H) 300 µg/mL / 24 h, (I) 0 µg/mL, (J) Soroprivação.

### ANEXO C – HISTOGRAMAS DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS EXPOSTAS AO EXTRATO ETANÓLICO DE *AZADIRACHTA INDICA*



Histogramas gerados pelo Citômetro de Fluxo por macacão com IP após exposição ao extrato etanólico. Cada histograma se refere a um tratamento: (A) 50 µg/mL / 12 h, (B) 50 µg/mL / 24 h, (C) 100 µg/mL / 12 h, (D) 100 µg/mL / 24 h, (E) 200 µg/mL / 12 h, (F) 200 µg/mL / 24 h, (G) 300 µg/mL / 12 h, (H) 300 µg/mL / 24 h, (I) 0 µg/mL, (J) Soroprivação.

## ANEXO D – ACOMPANHAMENTO DA REDUÇÃO DE CÉLULAS NO ESTÁGIO G0/G1 APÓS A RETIRADA DO EXTRATO ETANÓLICO



Gráficos indicando a (A) diminuição da porcentagem de células na fase G0/G1 após os tempos de 12, 24 e 36 horas após a retirada do tratamento. A presença de \* indica diferença significativa com  $P < 0,05$