

CÍNTIA FERNANDES DA SILVA

**EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO CALÓRICO NA EXPRESSÃO DE
ALGUNS GENES RELACIONADOS À IMPLANTAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE EMBRIÕES NELORE (*Bos indicus*) e
JERSEY (*Bos taurus*) PRODUZIDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Silva, Cíntia Fernandes da.

Efeito do estresse térmico calórico na expressão de alguns genes relacionados à implantação e desenvolvimento inicial de embriões Nelore (*Bos indicus*) e Jersey (*Bos taurus*) produzidos *in vitro* / Cíntia Fernandes da Silva. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Ciro Moraes Barros

Capes: 21005001

1. Bovino - Embrião. 2. Zebu – Melhoramento genético.

Palavras-chave: Bovino; Embrião; Estresse térmico; Expressão gênica; FIV.

Dedicatória

Aos meus pais, com amor, admiração e gratidão pela compreensão,
carinho, presença e incansável apoio ao longo
de toda minha vida. Vocês nunca mediram esforços para fazer dos meus
sonhos os seus sonhos e a minha realidade.

Amo muito vocês!

Agradecimientos

Agradeço a Deus por permitir minha evolução, dar força interior para eu superar as dificuldades e fazer pulsar em meu coração a felicidade e fé nas minhas conquistas.

A toda minha família, principalmente aos meus pais Celso e Angelina, minha irmã Caroline, meu cunhado Gustavo e minha sobrinha Maria Luiza. Vocês sempre me apóiam e torcem pelo meu sucesso e dão motivação para eu enfrentar todas as dificuldades. Obrigada pelo amor que me dedicam.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, pela oportunidade de realização do mestrado, por todo conhecimento transmitido, pela atenção e apoio durante todo período de orientação.

Aos muitos amigos, que perto ou longe, sempre contribuíram para minha formação e estão ao meu lado, tanto nos momentos de dificuldades como de felicidade, e em especial ao meu namorado Adilson, que sempre me compreende, reabastece meu coração de esperanças e felicidade e faz a minha vida mais feliz.

Aos amigos de pós-graduação, Anthony, Antônio (Kaká), Bárbara, Carol, Eduardo, Ester, Fernanda, Janahi, José Renato, Leonardo, Mariana, Maurício, Patrícia, Paula, Rafael, Rafaela, Rúbia e Vinícius, pela amizade, pela ajuda em todos os momentos, pelas muitas risadas em nossas conversas e pela boa convivência em todos estes anos. Ao lado de vocês a rotina diária se tornou prazerosa. Agradeço especialmente aos amigos Anthony, Eduardo, Janahi e Rafael pela ajuda na realização do experimento.

Aos médicos veterinários, Raquel e Henrique, pela enorme colaboração na realização do experimento.

A senhora Maria Christina H. M. Figueiredo por permitir que o experimento fosse realizado na sua propriedade, Fazenda Pinheiros. Agradeço também aos funcionários da fazenda, em especial ao Gabriel (Bié), por toda ajuda prestada.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Cristina, Janete, Luís e Paulo pela contribuição e agradável convivência.

MUITO OBRIGADA!

Epígrafe

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades e induzir as leis, eis à ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade.”

Rui Barbosa

Sumário

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Capítulo 1	pág. 15
Introdução e Objetivo	pág. 16
Revisão de Literatura	pág. 21
Referências Bibliográficas	pág. 31
Capítulo 2	pág. 35
Resumo	pág. 37
Introdução	pág. 38
Material e Método	pág. 40
Resultados	pág. 44
Discussão e Conclusão	pág. 47
Referências	pág. 50

Listas

Lista de Abreviaturas

ACNB - Associação dos Criadores de Nelore do Brasil;
BSA - albumina sérica bovina;
CO₂ - gás carbônico;
CCO - (*cumulus oocytes complexes*): complexo cúmulos – oócito;
E₂ - estradiol
ETC - estresse térmico calórico;
FSH - hormônio folículo estimulante;
g - Força gravitacional;
HPB - Holandês Preto e Branco;
hpi - horas pós-inseminação;
LH - hormônio luteinizante;
MCI - massa celular interna
mg – miligrama;
mL - mililitro;
mm - milímetro;
mM - milimolar;
N₂ - nitrogênio;
OPU - ovum pick up;
O₂ - oxigênio;
pb – pares de base;
PCR – (polymerase chain reaction): reação em cadeia da polimerase;
PG – prostaglandina;
PGF2 α – prostaglandina F2 α ;
PHE - Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina;
RNA_m – (messenger ribonucleic acid): ácido ribonucléico mensageiro;
rpm - rotações por minuto;
SOF - (synthetic oviduct fluid): fluído sintético de oviduto;
TCM - (tissue culture médium): meio para cultivo tecidual;
TE - trofoectoderme
UI - unidades internacionais;
US – Ultrassom;
μg – micrograma;
μL – microlitro.

Lista de Figuras

Figura 1 - Níveis do mRNA (média $\pm$ EPM) para os genes PLAC8 e CDX-2 em “pools” de blastocistos da raça Nelore (N) ou Jersey (J), submetidos ou não ao estresse térmico calórico (ETC). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$)pág. 46

Figura 2 - Níveis do mRNA (média $\pm$ EPM) para o gene HSF1 em “pools” de blastocistos da raça Nelore (N) ou Jersey (J), submetidos ou não ao estresse térmico calórico (ETC). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$)..... pág. 46

Figura 3 - Níveis do mRNA (média $\pm$ EPM) para o gene COX-2 em “pools” de blastocistos da raça Nelore (N) ou Jersey (J), submetidos ou não ao estresse térmico calórico (ETC). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pág. 47

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (**S:** oligonucleotídeo iniciador “sense” **A:** oligonucleotídeo iniciador “antisense”) pág. 43

Tabela 2 - Taxas de clivagem (CLI), mórula (MO) e blastocisto (BL) de embriões das raças Nelore e Jersey, mantidos a 38,5 °C ou submetidos ao ETC de 41 °C por 6h, 96 hpi pág. 45

Capítulo 1

Introdução e Objetivo

Revisão da Literatura

Referências Bibliográficas

Introdução e Objetivo

INTRODUÇÃO

Os animais que habitam as regiões de clima quente ficam submetidos ao estresse térmico calórico (ETC) que pode ser definido como um ambiente quente que atua alterando a temperatura corporal do animal para um valor acima da temperatura ideal (Hansen, 2009). Grande parte do rebanho bovino mundial está situado em regiões tropicais (Wolfenson et al., 2000), ficando submetidos a temperaturas mais altas do que os animais que habitam climas temperados.

Adaptações genéticas ao ETC são possíveis com a regulação da temperatura corpórea e a resistência celular às elevadas temperaturas. Os zebuínos (*Bos indicus*) são predominantes nos trópicos devido a sua maior resistência ao estresse resultante das altas temperaturas e alta umidade em certos períodos do ano e resistência aos parasitas, quando comparada às raças derivadas do gado europeu (*Bos taurus*, Hansen, 2004; Barros et al., 2006).

O ETC pode causar diversos efeitos deletérios sobre a função reprodutiva dos mamíferos, incluindo mudanças na espermatogênese, com redução quantitativa e qualitativa da produção de esperma nos machos, alterações no desenvolvimento e maturação oocitária, levando a queda da fertilidade nas fêmeas, alterações no desenvolvimento embrionário inicial, no crescimento fetal e na lactação (Hansen et al., 2001; Hansen, 2009).

Está bem documentado que a exposição de fêmeas de mamíferos ao ETC aumenta a mortalidade embrionária (Thatcher & Hansen, 1993), já que os embriões no estágio pré-implantacional são suscetíveis ao ETC materno. Os efeitos da hipertermia materna são mais pronunciados quando experimentados durante o estro e inseminação e durante as primeiras clivagens do embrião em desenvolvimento (Ealy et al., 1993).

A maior causa da redução na sobrevivência embrionária induzida pelo ETC pode ser originada pelos efeitos adversos das temperaturas elevadas no desenvolvimento dos gametas, zigotos e dos embriões (Ealy et al., 1993). Algumas das ações do ETC sobre o embrião pré-implantacional provavelmente envolve a produção de espécies reativas do oxigênio, as quais se apresentam com atividade aumentada no oviduto e nos embriões de ratas submetidas ao ETC (Matsuzuka et al., 2005).

Entretanto, os efeitos deletérios do ETC sobre a viabilidade do embrião diminuem com o avanço da prenhez (Hansen, 1999; Edwards et al., 2001), sendo

mínimos a partir do terceiro dia em bovinos (Ealy et al., 1993). Os embriões se tornam mais resistentes aos efeitos negativos do ETC à medida que avançam no seu desenvolvimento (Edwards & Hansen, 1997). A geração de espécies reativas do oxigênio em resposta ao ETC diminui com o avanço do desenvolvimento dos embriões bovinos, enquanto que a concentração intracelular de antioxidantes citoplasmáticos aumenta (Hansen, 2009).

Utilizando sistema de cultivo *in vitro* de embriões bovinos, Krininger et al. (2002) e Paula-Lopes et al. (2003) mostraram que embriões em seus estágios iniciais do desenvolvimento são muito sensíveis aos efeitos deletérios do ETC, ocorrendo redução da sobrevivência dos embriões, entretanto, estes efeitos deletérios são menos pronunciados nas raças termotolerantes.

Paula-Lopes et al. (2003) observaram que embriões de raça resistente ao calor (Brahman), se desenvolveram melhor até o estágio de blastocisto após ETC (41 °C por 6 horas) do que embriões de raças sensíveis ao calor (Holandesa e Angus). De forma similar, Barros et al. (2006) e Eberhardt et al. (2009) demonstraram que embriões *Bos taurus* e mestiços são mais sensíveis ao ETC (41 °C, 12h, 96hpi) quando comparados aos embriões *Bos indicus*.

A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do genoma embrionário é ainda inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é um aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre (Paula-Lopes & Hansen, 2002).

Estratégias para aumentar a fertilidade durante o ETC é identificar as causas fisiológicas que levam a falhas na fertilização e a mortalidade embrionária e assim poder desenvolver métodos que corrijam este problema. Para isto, deve-se entender e explorar os fatores que aumentam a resistência do oócito e do embrião às elevadas temperaturas, como moléculas citoprotetoras no trato reprodutivo e genes controladores da termotolerância (Hansen, 2007), bem como os fatores que auxiliam na implantação e desenvolvimento embrionário inicial.

A resposta ao ETC e a aquisição da capacidade de termotolerância pelas células submetidas a algum tipo de estresse envolve a síntese de moléculas citoprotetoras, como as proteínas de choque térmico (heat shock protein - HSP), como a proteína de choque

térmico 70 (HSP70). Nos mamíferos, a resposta ao estresse inclui alteração de expressão gênica sob a regulação do fator de transcrição de estresse térmico (HSF, Collier et al., 2008) com uma rápida indução de transcrição de HSPs em uma grande variedade de células e tecidos (Luft & Dix, 1999).

A expressão de HSP70 ocorre constitutivamente em vários tipos celulares e tem sua expressão aumentada quando as células são expostas a um agente estressor como o calor, análogos de aminoácidos, metais pesados, infecção e estresse oxidativo (Luft & Dix, 1999). Esta proteína é capaz de estabilizar proteínas e organelas intracelulares, além de inibir a apoptose celular.

As células embrionárias parecem expressar HSP70 constitutivamente, com pico de expressão durante a ativação do genoma embrionário, ou em resposta a um agente estressor, apontando para um papel essencial da HSP70 tanto no desenvolvimento normal, quanto na proteção das células embrionárias contra algum dano (Luft & Dix, 1999).

A produção *in vitro* de embriões está associada a mudanças na expressão gênica e também baixa taxa de sobrevivência embrionária pós-transferência, resultando em altas taxas de abortos. Por isso, mais importante do que conseguir grandes quantidades de embriões *in vitro*, é conseguir embriões com qualidade para gerarem gestações a termo, com bezerros saudáveis (Hansen et al., 2010).

El-Sayed et al. (2006) identificaram um grupo de genes relacionados com a sobrevivência embrionária ao compararem embriões produzidos *in vitro* que, quando transferidos para receptoras, geraram uma gestação ou foram reabsorvidos. Seis genes apresentaram maior expressão nos embriões que geraram uma gestação, quando comparados aos embriões que sofreram reabsorção, sugerindo que estes genes podem ter um papel fundamental no desenvolvimento inicial e a implantação dos embriões. Dentre estes genes, pode-se citar o interferon- τ (IFN-tau), o CDX-2, PLAC8 e COX2.

Sendo assim, a identificação de mRNA torna-se uma boa ferramenta para avaliar a qualidade de embriões produzidos *in vitro* e otimizar as condições de cultivo *in vitro* de embriões.

OBJETIVO

Objetiva-se com o presente trabalho verificar comparativamente a influência do estresse térmico calórico na expressão gênica de embriões bovinos (zebuínos vs

taurinos) produzidos *in vitro*, avaliando genes importantes para a implantação e o desenvolvimento inicial do embrião: IFN- τ , CDX-2, PLAC8, COX2, HSP70 e HSF1.

HIPÓTESE

Sob a influência ETC, embriões da raça Nelore apresentam maior expressão dos genes IFN- τ , CDX-2, PLAC8, COX2, HSP70 e HSF1, envolvidos com a implantação e desenvolvimento embrionário inicial, quando comparados aos embriões da raça Jersey.

Revisão da Literatura

O estresse térmico calórico (ETC) e seus efeitos sobre a reprodução de bovinos

Os mamíferos apresentam a capacidade de regular e manter a temperatura corporal numa zona de conforto térmico. Quando a temperatura corporal do animal se altera para valores abaixo ou acima da temperatura de conforto, podem ocorrer diversas modificações na resposta fisiológica normal do animal a fim de adaptá-lo as novas condições ambientais.

O estresse térmico calórico (ETC) pode ser definido como um ambiente quente que atua alterando a temperatura corporal do animal para um valor acima da temperatura ideal (Hansen, 2009). Como resposta fisiológica ao ETC, ocorre redução na produção de calor, com redução da ingestão de alimentos e produção de leite, aumento da circulação sanguínea periférica e do volume respiratório, além de causar diversos efeitos deletérios sobre a função reprodutiva dos mamíferos, incluindo os bovinos (Hansen, 2004).

Entretanto, a resposta dos bovinos ao ETC varia de acordo com a raça. Adaptações genéticas ao ETC são possíveis com a regulação da temperatura corpórea e a resistência celular às elevadas temperaturas. A habilidade de raças adaptadas em regular a temperatura corporal durante o ETC é o resultado de menores taxas metabólicas, bem como maior capacidade de perda de calor (Hansen, 2004).

Assim, os zebuínos (*Bos indicus*) são considerados raças adaptadas ao calor, enquanto que os taurinos (*Bos taurus*) são a raça não adaptada. Comparado com o gado taurino, o gado zebuíno sofre redução menos severa na ingestão alimentar, taxa de crescimento, produção de leite e carne e funções reprodutivas em resposta ao ETC (Hansen, 2004).

Acima de 50% do rebanho bovino mundial se encontra nos trópicos (Wolfenson et al., 2000) onde fatores estressantes como as altas temperaturas e umidades em certos períodos do ano, a sub-alimentação crônica, os riscos de doenças e parasitas são notavelmente maiores do que em regiões de clima temperado (Hansen, 2004; Barros et al., 2006). Nestas condições ambientais, as raças zebuínas são as que predominam, devido a sua maior adaptação em relação às raças taurinas.

No Brasil, dentre os zebuínos, a raça Nelore é a que possui maior contingente numérico, com mais de 100 milhões de cabeças (ACNB, 2011), devido a sua maior resistência ao estresse resultante das altas temperaturas e alta umidade em certos

períodos do ano e resistência aos parasitas, quando comparada às raças derivadas do gado europeu (*Bos taurus*, Hansen, 2004; Barros et al., 2006).

O ETC pode causar diversos efeitos deletérios sobre a função reprodutiva dos mamíferos, incluindo mudanças na espermatogênese, com redução quantitativa e qualitativa da produção de espermatozoides nos machos, alterações no desenvolvimento e maturação oocitária, levando a queda da fertilidade nas fêmeas, alterações no desenvolvimento embrionário inicial, no crescimento fetal e na lactação (Hansen et al., 2001; Hansen, 2009).

A infertilidade dos machos ocasionada pelo ETC pode ser eliminada por meio da inseminação artificial com sêmen coletado e congelado em ambiente adequado (Hansen et al., 2001).

Nas fêmeas, esta situação é mais complicada, pois o ETC bloqueia o desenvolvimento oocitário e consequentemente altera a sua função, provavelmente por comprometer a qualidade do oócito ao alterar o desenvolvimento folicular (incluindo ausência de dominância), a produção e secreção de esteróides, a secreção de gonadotrofinas e a expressão gênica. Como resultado, o processo de maturação oocitária é interrompido em elevadas temperaturas e a competência do oócito para a fertilização fica comprometida (Wolfenson et al., 2000, Hansen, 2007; Hansen 2009).

Durante muito tempo, acreditava-se que isto era um problema que afetava apenas animais situados em regiões de clima quente. Entretanto, hoje sabe-se que ocorre redução na função reprodutiva durante o verão nos animais que vivem em regiões frias e a hipertermia pode ocorrer de forma intensa no gado de leite quando a temperatura ambiental está por volta de 25-28°C. A alta produção de leite faz com que a regulação da temperatura corporal durante o ETC seja mais difícil, exacerbando os efeitos do ETC sobre a fertilidade dos animais (Hansen, 2007).

O estresse térmico de verão é o fator de maior influência na queda da fertilidade em vacas de leite expostas a temperaturas elevadas. É um problema mundial, que provoca perdas econômicas consideráveis e afeta cerca de 60% da população de bovinos do mundo (Wolfenson et al., 2000). Esta redução na capacidade reprodutiva de vacas de leite durante o verão é associada à diminuição da termorregulação corporal e a seleção genética destes animais para alta produção de leite (Roth, 2008).

Os efeitos da alta temperatura ambiental nas funções reprodutivas são exacerbados pelo aumento na produção de calor metabólico associado à lactação (Sartori et al., 2002) e pelo aumento da umidade relativa (West, 2003). Vacas em

lactação são mais suscetíveis ao ETC do que novilhas e uma explicação seria o fato de que o calor metabólico produzido pelas vacas em lactação promove hipertermia durante o verão, enquanto que em novilhas a produção de calor metabólico é menor e, provavelmente, não apresentam hipertermia nas mesmas temperaturas ambientais que as vacas (Wilson et al., 1998).

Vacas Gir submetidas ao ETC apresentaram efeitos deletérios sobre o crescimento folicular ovariano, as concentrações hormonais e a competência do oócito em desenvolvimento. Além disso, as vacas submetidas ao ETC apresentaram ciclo estral curto e aumento da co-dominância folicular (Torres-Junior et al., 2008).

Está bem documentado que a exposição de fêmeas de mamíferos ao ETC aumenta a mortalidade embrionária (Thatcher & Hansen, 1993), já que os embriões no estágio pré-implantacional são suscetíveis ao ETC materno. Os efeitos da hipertermia materna são mais pronunciados quando experimentados durante o estro e inseminação e durante as primeiras clivagens do embrião em desenvolvimento (Ealy et al., 1993).

A maior causa da redução na sobrevivência embrionária induzida pelo ETC pode ser originada pelos efeitos adversos das temperaturas elevadas no desenvolvimento dos gametas, zigotos e dos embriões (Ealy et al., 1993). Algumas das ações do ETC sobre o embrião pré-implantacional provavelmente envolve a produção de espécies reativas do oxigênio, as quais se apresentam com atividade aumentada no oviduto e nos embriões de ratas submetidas ao ETC (Matsuzuka et al., 2005).

A sobrevivência do embrião pré-implantação não depende apenas da existência de condições normais de desenvolvimento, mas também da aquisição de mecanismos através dos quais esses embriões interagem com o meio ambiente (Betts & King, 2001).

Os efeitos deletérios do ETC sobre a viabilidade do embrião diminuem com o avanço da prenhez (Hansen, 1999; Edwards et al., 2001), sendo mínimos a partir do terceiro dia em bovinos (Ealy et al., 1993). Uma possível explicação para esse fenômeno é que os embriões se tornam mais resistentes aos efeitos negativos do ETC à medida que avançam no seu desenvolvimento (Edwards & Hansen, 1997). A geração de espécies reativas do oxigênio em resposta ao ETC diminui com o avanço do desenvolvimento dos embriões bovinos, enquanto que a concentração intracelular de antioxidantes citoplasmáticos aumenta (Hansen, 2009).

A produção de embriões após tratamentos superovulatórios, em geral, é reduzida durante períodos de estresse térmico. A redução no número de estruturas transferíveis é ocasionada por menor resposta à superestimulação, menores taxas de fertilização e

queda na qualidade embrionária. O estresse térmico pode afetar os eventos reprodutivos requeridos para a produção de embriões por diminuir a expressão de cio, alterar o desenvolvimento folicular, comprometer a competência do oócito e inibir o desenvolvimento embrionário inicial (Hansen et al., 2001).

O ETC pode comprometer o desenvolvimento embrionário por reduzir o fluxo de sangue uterino e aumentar a temperatura uterina (Roman-Ponce et al., 1978), reduzir as concentrações plasmáticas de estradiol (E2; Wilson et al., 1998) e por alterar a secreção de proteínas uterinas (Malayer & Hansen, 1990). Estas alterações influenciam o desenvolvimento embrionário e aumentam a perda do embrião nos estágios iniciais do desenvolvimento. O ETC pode promover o aumento da secreção de prostaglandina pelo endométrio e promover luteólise prematura em decorrência da dificuldade do embrião gerar sinais bioquímicos que sinalizam a gestação (Putney et al., 1988).

Devido às alterações uterinas causadas pelo ETC, ocorre redução na sobrevivência embrionária pós transferência para receptoras durante o ETC, observado com queda na taxa de prenhez durante os meses de verão (Block et al., 2003).

Durante o outono, as taxas de concepção de vacas leiteiras em regiões subtropicais e países de clima quente são menores que no inverno, embora a temperatura ambiente tenha diminuído e as vacas não estejam mais expostas ao ETC de verão, indicando a existência de um efeito retardado do ETC na fertilidade (Roth et al., 2001).

Rivera & Hansen (2001) verificaram que o ETC a 41°C, aplicado durante a fertilização e nos estágios de uma ou duas células prejudica o desenvolvimento embrionário. Utilizando sistema de cultivo *in vitro* de embriões bovinos, Rocha et al. (1998) e Al-Katanani & Hansen (2002) mostraram que a temperatura elevada reduziu a sobrevivência dos embriões em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário.

Paula-Lopes et al. (2003) observaram que embriões de raça resistente ao calor (Brahman) desenvolveram-se melhor até o estágio de blastocisto após ETC (41 °C por 6 horas) do que embriões de raças sensíveis ao calor (Holandesa e Angus). De forma similar, embriões da raça Nelore são mais resistentes ao ETC do que embriões mestiços ou taurinos desenvolvidos *in vitro* (Barros et al. (2002); Barros et al. (2006); Eberhardt et al. (2009). Em outro estudo, foi demonstrado que embriões Brahman e Romosinuano (raças adaptadas ao calor) são mais resistentes ao ETC que embriões da raça Angus (Hernández-Céron et al., 2004).

Expressão gênica no desenvolvimento embrionário inicial

A fase de pré-implantação representa um período extremamente dinâmico da embriogênese, no qual o embrião se desenvolve a partir de uma única célula, sobre o controle genético da transcrição materna, para um conjunto de células altamente ativas metabólica e sinteticamente, agora sobre seu próprio controle genético. Durante esse período o embrião passa por várias divisões celulares e três eventos importantes ocorrem: a compactação da mórula, a formação do blastocisto, com surgimento da blastocela e a diferenciação em dois tipos celulares (trofoectoderme e massa celular interna), e a eclosão do blastocisto. Essas funções requerem a regulação precisa de várias funções celulares como a homeostasia, metabolismo e expressão gênica (Lane, 2001; Badr et al., 2007).

A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do genoma embrionário é ainda inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é um aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre (Paula-Lopes & Hansen, 2002).

As alterações adaptativas que permitem aquisição de termotolerância são provavelmente resultado de mudanças na expressão gênica e/ou na atividade de sistemas bioquímicos que comandam as funções celulares frente a alguma agressão como, por exemplo, as altas temperaturas (Edwards et al., 2001).

Estratégias para aumentar a fertilidade durante o ETC é identificar as causas fisiológicas que levam a falhas na fertilização e a mortalidade embrionária e assim poder desenvolver métodos que corrijam este problema. Para isto, deve-se entender e explorar os fatores que aumentam a resistência do oócito e do embrião às elevadas temperaturas, como moléculas citoprotetoras no trato reprodutivo e genes controladores da termotolerância (Hansen, 2007), bem como os fatores que auxiliam na implantação e desenvolvimento embrionário inicial.

A resposta ao ETC e a aquisição da capacidade de termotolerância pelas células submetidas a algum tipo de estresse envolve a síntese de moléculas citoprotetoras, como as proteínas de choque térmico (heat shock protein - HSP). Nos mamíferos, a resposta ao estresse inclui alteração de expressão gênica sob a regulação do fator de transcrição

de choque térmico (HSF; Collier et al., 2008) com uma rápida indução de transcrição de HSPs em uma grande variedade de células e tecidos (Luft & Dix, 1999). O HSF1 é essencial para a resposta ao choque térmico e também é necessário para o processo de desenvolvimento (Åkerfelt et al., 2007).

A ativação de HSF1 é um processo que envolve diversos passos. Primeiro, ocorre a trimerização da molécula, seguido de translocação para o núcleo e posterior ligação a domínios específicos do DNA com ativação da transcrição dos genes de HSPs (Åkerfelt et al., 2007). HSF1 é fundamental para a manutenção da integridade celular durante o estresse, visto que células de ratos knock-out para o gene HSF1 perderam a habilidade de desenvolver termotolerância (Zhang et al., 2002).

A expressão de HSP70 ocorre constitutivamente em vários tipos celulares e tem sua expressão aumentada quando as células são expostas a um agente estressor como o calor, análogos de aminoácidos, metais pesados, infecção e estresse oxidativo (Luft & Dix, 1999). Esta proteína é capaz de estabilizar proteínas e organelas intracelulares, além de inibir a apoptose celular.

As células embrionárias parecem expressar HSP70 constitutivamente, com pico de expressão durante a ativação do genoma embrionário, ou em resposta a um agente estressor, apontando para um papel essencial da HSP70 tanto no desenvolvimento normal, quanto na proteção das células embrionárias contra algum dano (Luft & Dix, 1999).

Edwards & Hansen (1997) demonstraram que embriões bovinos, já no estágio de duas células, são capazes de sintetizar grandes quantidades de HSP70 em resposta ao estresse térmico de 42°C e Chandioli et al. (1999) verificaram que o aumento de HSP70 nos embriões bovinos de duas células foi resultado de uma nova transcrição.

A produção *in vitro* de embriões está associada a mudanças na expressão gênica e também baixa taxa de sobrevivência embrionária pós-transferência, resultando em altas taxas de abortos. Por isso, mais importante do que conseguir grandes quantidades de embriões *in vitro*, é conseguir embriões com qualidade para gerarem gestações a termo, com bezerros saudáveis (Hansen et al., 2010).

El-Sayed et al. (2006) identificaram um grupo de genes relacionados com a sobrevivência embrionária ao compararem embriões produzidos *in vitro* que, quando transferidos para receptoras, geraram uma gestação ou foram reabsorvidos. Seis genes apresentaram maior expressão gênica nos embriões que geraram uma gestação quando comparados aos embriões reabsorvidos, sugerindo que estes genes podem ter um papel

fundamental no desenvolvimento inicial e na implantação dos embriões. Dentre estes genes, pode-se citar o interferon- τ (IFN- τ), CDX-2, PLAC8 e COX-2.

A formação do blastocisto depende da diferenciação das células em duas linhagens, massa celular interna (MCI) e trofoectoderme (TE), que caracterizam as duas primeiras linhagens de células no embrião de mamíferos. A TE forma um epitélio de transporte que vai regular o transporte de íons e água, levando ao acúmulo de líquido e a formação da blastocèle (Strumpf et al., 2005).

Interferon- τ (IFN- τ) é secretado exclusivamente pelas células da TE. É o agente primário responsável pelo reconhecimento materno da gestação em bovinos (Thatcher et al., 1995; Rizos et al., 2003). Sua função é inibir a secreção uterina de prostaglandina F $_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$), substância luteolítica que leva a degradação do corpo lúteo e queda dos níveis de progesterona (Thatcher et al., 2001).

Uma grande proporção das perdas embrionárias coincidem com o período em que o conceito inibe a secreção uterina de PGF $_{2\alpha}$. Por isso, é possível que muitas perdas ocorram porque certos embriões não têm a habilidade de secretar IFN- τ e assim não suprimem a secreção de PGF $_{2\alpha}$ (Thatcher et al., 2001). Além disso, ele também afeta a expressão de diversos genes no endométrio, numa célula específica e num momento específico do desenvolvimento embrionário, que vão ser responsáveis pela receptividade uterina à implantação e ao desenvolvimento do conceito (Spencer et al., 2004; Bazer et al., 2008).

Diferenças na quantidade de secreção de IFN- τ entre embriões bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e clonados pode ser responsável pelas diferenças nas taxas de prenhez após transferência destes embriões para receptoras (Stojkovic et al., 1999).

Yao et al. (2009) demonstraram que mRNA de IFN- τ foi primeiro expresso em embriões bovinos produzidos *in vitro* no estágio de 16 células (dia 4 pós inseminação), mantendo a expressão nos estágios de mórula e blastocisto.

O embrião em desenvolvimento produz prostaglandinas (PGs) que apresentam diversas funções como, por exemplo, modular o local da implantação embrionária no endométrio. A proteína de COX2 (Prostaglandina G/H sintase 2), responsável pela síntese de PG, foi encontrada nas células da TE de embriões e altos níveis de expressão de COX2 foi detectada em blastocistos bovinos que resultaram em gestação e nascimento a termo (El-Sayed et al., 2006). Maior expressão da COX2 na janela de implantação embrionária sugere um papel importante das PGs liberadas pelo embrião na mediação das interações com o útero materno (El-Sayed et al., 2006). Durante a

implantação de embriões ovinos, as células trofoblásticas se tornam adesivas e a sua capacidade de invasão está diretamente relacionada com os níveis de expressão de COX2 que, portanto, deve ter um papel importante na implantação embrionária (Charpigny et al., 1997).

O CDX-2, um fator de transcrição, é um gene expresso especificamente pela TE, sendo necessário para sua formação e integridade e, portanto, importante para o desenvolvimento normal do embrião (Strumpf et al., 2005; Bell et al., 2008).

Em ratos, já está bem estabelecido que o CDX-2 é importante para a implantação e desenvolvimento da placenta (Chawengsaksophak et al., 2004). Embriões CDX-2 nulo falham em implantar e morrem no estágio peri-implantacional, sugerindo defeito no desenvolvimento da TE. Esta falha na implantação é devido a perda da integridade do epitélio da TE e/ou aumento da apoptose na TE (Chawengsaksophak et al., 2004).

A formação da blastocle inicia-se em embriões CDX-2 mutantes, mas a integridade do epitélio não é mantida e o embrião torna-se inviável, pois não consegue se implantar. Além disso, a ausência de CDX-2 está associada à falha na downregulation de Oct4 e Nanog nas células embrionárias, resultando em subsequente morte destas células (Strumpf et al., 2005). Portanto, CDX-2 é um fator de transcrição específico da TE, sendo necessário para a repressão da expressão de alguns genes e consequente desenvolvimento normal do blastocisto.

Poucos trabalhos analisaram a expressão de CDX-2 em embriões bovinos. Num destes trabalhos, foi verificado que o gene CDX-2 encontra-se aumentado em embriões bovinos produzidos *in vitro* que, quando transferidos, originaram gestação, quando comparados com aqueles embriões que sofreram reabsorção uterina ao serem transferidos (El-Sayed et al., 2006).

Embriões bovinos produzidos por transferência nuclear apresentam expressão de CDX-2 alterada e em quantidade inferior quando comparado com embriões produzidos *in vivo*. Talvez isto explique o fato dos embriões produzidos por transferência nuclear apresentarem maior taxa de perda embrionária quando comparado com os produzidos *in vivo* (Hall et al., 2005).

O gene PLAC8 é substancialmente expresso na TE dos embriões no estágio de pré-implantação, e continua sendo expresso nas células trofoblásticas gigantes e na camada de espongiotrofoblastos nas fases posteriores do desenvolvimento embrionário. Estudos em bovinos mostraram que o PLAC8 é altamente expresso no endométrio de

vacas gestantes quando comparado com vacas não gestantes, sugerindo seu potencial papel no desenvolvimento placentário (Galaviz-Hernandez et al., 2003). A expressão de PLAC8 foi 26 vezes maior nos blastocistos bovinos que resultaram em gestação quando comparado com aqueles que sofreram reabsorção (El-Sayed et al., 2006).

Referências Bibliográficas

- ÅKERFELT, M., TROUILLET, D., MEZGER, V., SISTONEN, L. Heat shock factors at a crossroad between stress and development. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1113, p. 15-27, 2007.
- AL-KATANANI, Y.M., HANSEN, P.J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryo and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 62, p. 174-180, 2002.
- ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL - ACNB 2006. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br>>. Acessado em 29mar.2011.
- BADR, H., BONGIONI, G., ABDOON, A.S.S., KANDIL, O., PUGLISI, R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, v.15, p. 355-367, 2007.
- BARROS, C.M., MONTEIRO, F.M., MELLO, D.S., CARVALHO, L.M., TEIXEIRA, A.B., TRINCA, L.A., FREITAS, E.C. Resistance of *Bos indicus* to heat shock, compared to crossbred or *Bos Taurus*, at early stages of in vitro embryo development. **In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTION IN DOMESTIC RUMINANTS**, 6th, Scotland, Anais, p.A4, 2002.
- BARROS, C.M., PEGORER, M.F., VASCONCELOS, J.L.M., EBERHARDT, B.G., MONTEIRO, F.M. Importance of sperm genotype (*indicus* vs. *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. **Theriogenology**, v.65, p.210-219, 2006.
- BAZER, F.W., BURGHARDT, R.C., JOHNSON, G.A., SPENCER, T.E., Wu, G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathway. **Reprod Bio**, v.8, p.179-211, 2008.
- BELL, C.E., CALDER, M.D., WATSON, A.J. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. **Mol. Hum. Reprod.**, v.14, p.691-701, 2008.
- BETTS, D.H., KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v. 55, p. 210-218, 2001.
- BLOCK, J., DROST, M., MONSON, R.L., RUTLEDGE, J.J., RIVERA, R.M., PAULA-LOPES, F.F., et al. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. **J. Anim. Sci.**, v. 81, p. 1590-1602, 2003.
- CHANDIOLI, R.K., PELTIER, M.R., TIAN, W., HANSEN, P.J. Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.61, p. 1644-1648, 1999.
- CHARPIGNY, G., REINAUD, P., TAMBY, J.P., CREMINON, C., GUILLOMONT, M. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1032-1040, 1997.
- CHAWENGSAKSOPHAK, K., GRAAFF, W., ROSSANT, J., DESCHAMPS, J., BECK, F. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. **Develop. Bio**, v.101, p. 7641-7645, 2004.
- COLLIER, R.J., COLLIER, J.L., RHOADS, R.P., BAUMGARD, L.H. Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. **J. Dairy Sci.**, v.91, p.445-454, 2008.
- EALY, A.D., DROST, M., HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 2899-2905, 1993.
- EBERHARDT, B.G., SATRAPA, R.A., CAPINZAIKI, C.R.L., TRINCA L.A., BARROS, C. M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos Taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Anim. Reprod. Sci**, v. 114, p. 54-61, 2009.
- EDWARDS, J.L., HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 46, p. 138-145, 1997.
- EDWARDS, J.L., KING, W.A., KAWARSKY, S.J., EAL Y, A.D.. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP 70 and glutathione. **Theriogenology**, v. 55, p. 209-23, 2001.
- EL-SAYED, A., HOELKER, M., RINGS, F., SALILEW, D., JENNEN, D., THOLEN, E., SIRARD, M.A., SCHELLANDER, K., TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiol Genomics**, v. 28, p.84-96, 2006.

- GALAVIZ-HERNANDEZ, C., STAGG, C., DE RIDDER, G., TANAKA, T.S., KO, M.S.H., SCHLESSINGER, D., NAGARAJA, R. Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. **Gene**, v. 309, p.81-89, 2003.
- HALL, V.J., RUDDOCK, N.T., FRENCH, A.J. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro*, and nuclear transfer blastocysts. **Mol. Reprod. and Develop.**, v. 72, p. 16-24, 2005.
- HANSEN, P.J. Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the mammalian preimplantation embryo from heat shock. **Ann. Rev. Biomed. Sci.**, v. 1, p. 5-29, 1999.
- HANSEN, P.J. DROST, M., RIVERA, R.M., PAULA-LOPES, F.F., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER III, C.E., CHASE JR, C.C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, p. 91-103, 2001.
- HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 349-360, 2004.
- HANSEN, P.J. Exploration of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevate temperatures to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. **Theriogenology**, v.68, p.242-249, 2007.
- HANSEN, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 364, p. 3341-3350, 2009.
- HANSEN , P.J., BLOCK, J., LOUREIRO, B., BONILLA, L., HENDRICKS, K.E.M. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*- produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Reprod. Fert. and Develop.**, v. 22, p. 59-66, 2010.
- HERNÁNDEZ-CERÓN, J., CHASE JR, C.C., HANSEN, P.J. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano and Angus breeds. **J. Dairy Sci.**, v. 71, p. 53-58,, 2004.
- KRININGER, C.E., STEPHENS, S.H., HANSEN, P.J. Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of preimplantation bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.63, p. 335-340, 2002.
- LANE, M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. **Theriogenology**, v. 55, p. 225-36, 2001.
- LUFT, J.C., DIX, D.J. Hsp70 expression and function during embryogenesis. **Cell Stress & Chaperones**, v.4, p. 162-170, 1999.
- MALAYER, J.R., HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Hostein cows in heat-shock induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. **J. Anim. Sci.**, v. 68, p. 266-280, 1990.
- MATSUZUKA, T., OZAWA, M., NAKAMURA, A., USHITANI, A., HIRABAYASHI, M., KANAI, Y. Effects of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. **J. Reprod. Dev. Res.**, v. 51, p. 281-287, 2005.
- PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J. Heat-shock induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally-regulated phenomenon. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 1169-1177, 2002.
- PAULA-LOPES, F.F., CHASE JR, C.C., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER III, C.E., RIVERA, R.M., TEKIN, S., MAJEWSKI, A.C., OCON, O.M., OLSON, T.A, HANSEN, P.J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 125, p. 285-294, 2003.
- PUTNEY, D.J., MALAYER, J.R., GROSS, T.S., THATCHER, W.W., HANSEN, P.J., DROST, M. heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. **Biol. Reprod.**, v. 39, p. 717-728, 1988.
- RIVERA, R.M., HANSEN, P.J. development of cultured bovine embryos after exposure to increased temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v. 121, p. 107-115, 2001.
- RIZOS, D., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., PÉREZ-GARNELO, S., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. **Biol. Reprod.**, v. 68, p.236-243, 2003.

- ROCHA, A., RANDEL, R.D., BROUSSARD, J.R., LIM, J.M., BLAIR, R.M., ROUSSEL, J.D., GODKE, R.A., HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos Taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 657-665, 1998.
- ROMAN-PONCE, H., THATCHER, W.W., CATON, D., BARRON, D.H., WILCOX, C.J. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **J. Anim. Sci.**, v. 46, p. 175-180, 1978.
- ROTH, Z., MEIDAN, R., SHAHAM-ALBALANCY, A., BRAW-TAL, R., WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **J. Reprod. Fertil.**, v. 121, p. 745-751, 2001.
- ROTH, Z. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. **Reprod Dom Anim**, v. 43, p. 238-244, 2008.
- SARTORI, R., SARTOR BERGFELT, R., MERTENS, A.S., GUENTHER, J.N., PARRISH, J.J., WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p. 2803-2812, 2002.
- SPENCER, T. E., JOHNSON, G.A., BAZER, F.W., BURGHARDT, R. C. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, v. 128, p. 657-668, 2004.
- STOJKOVIC, M., WOLF, E., ZAKHARTCHENKO, V.J., RIEDL, J., REICHENBACH, H.D. WENINGERKIND, H., BREM, G. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 55, p.151-162, 1999.
- STRUMPF, D., MAO, C.A., YAMANAKA, Y., RALSTON, A., CHAWENGSAKSOPHAK, K., BECK, F., ROSSANT, J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of the ectoderm in mouse blastocyst. **Development**, v. 132, p. 2093-2102, 2005.
- THATCHER, W.W., HANSEN, P.J. Environment and reproduction. **Reprod. Domestic. Anim.** Amsterdam: Elsevier World Animals Science Series, v. 9, p. 433-57, 1993.
- THATCHER, W.W., MEYER, M.D., DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 49, p. 15-28, 1995.
- THATCHER, W.W., GUZELOGLU, A., MATTOS, R., BINELLI, M., HANSEN, T.R., PRU, J.K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v.56, p. 1435-1450, 2001.
- TORRES-JUNIOR, J.R. de S., PIRES, M. de F.A., de SÁ, W.F., FERREIRA, A. de M., VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A., RAMOS, A.A. et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 155-166, 2008.
- WEST, J.W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 2131-2144, 2003.
- WILSON, S.J., KIRBY, C.J., KOENIGSFELD, A.T., KEISLER, D.H., LUCY, M.C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 2124-2131, 1998.
- WOLFENSON, D., ROTH, Z., MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.535-547, 2000.
- YAO, N., WAN, P.C., HAO, Z.D., GAO, F.F., YANG, L., CUI, M.S., WU, Y., LIU, J.H., LIU, S., CHEN, H., ZENG, S.M. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. **Reprod. Dom. Anim**, v.44, p.132-139, 2009.
- ZHANG, Y., HUANG, L., ZHANG, J., MOSKOPHIDIS, D., MIVECHI, N.F. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible hsp molecular chaperones. **J. Cell. Biochem.**, v. 86, p. 376-393, 2002.

CAPÍTULO 2

**Efeito do estresse térmico calórico na expressão de alguns genes relacionados à
implantação e desenvolvimento inicial de embriões Nelore (*Bos indicus*) e Jersey
(*Bos taurus*) produzidos *in vitro***

Este artigo científico está de acordo com as normas para publicação na Theriogenology,
exceto a apresentação das figuras, tabelas e o idioma.

**Efeito do estresse térmico calórico na expressão de alguns genes relacionados à
implantação e desenvolvimento inicial de embriões Nelore (*Bos indicus*) e Jersey
(*Bos taurus*) produzidos *in vitro***

Silva, C.F.¹; Castilho, A.C.S.²; Satrapa, R.A.¹; Puelker, R.Z.¹; Razza, E.M.¹; Ticianelli,
J.S.¹, Eduardo, H.P.³; Loureiro, B.¹; Buratini Jr., J.²; Barros, C.M.^{1a}

¹Departamento de Farmacologia e ²Departamento de Fisiologia, Instituto de
Biociências, UNESP, Botucatu-SP, ³Proget, Botucatu –SP

^aAutor para correspondência: Ciro Moraes Barros; fax: +55 14 38116253; cmbarros@ibb.unesp.br

RESUMO

Os efeitos deletérios do estresse térmico calórico (ETC) sobre a fertilidade são menos pronunciados em raças tolerantes ao calor, devido às diferenças na capacidade de termorregulação. Para melhor compreender as diferenças entre zebuínos e taurinos em relação ao ETC, objetivou-se com o presente trabalho comparar a expressão dos genes COX2, CDX-2, IFN- τ , HSF1, HSP70 e PLAC8, relacionados com o desenvolvimento embrionário inicial, em embriões bovinos produzidos *in vitro* (zebuínos vs. taurinos), submetidos ou não ao ETC. Oócitos de vacas Nelore (*Bos indicus*) e Jersey (*Bos taurus*) foram obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) e maturados *in vitro* por 24 horas. Em seguida, foram fertilizados *in vitro* (D=0) com sêmen Nelore e Jersey, respectivamente. Doze horas após a fertilização, os prováveis zigotos (zebuínos e taurinos) foram cultivados *in vitro* em temperatura de 38,5°C. Noventa e seis horas após a fertilização, os embriões ≥ 16 células, de ambas as raças, foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: controle, cultivado continuamente a 38,5 °C, e ETC, exposto a 41 °C por 6 horas, retornando a seguir para 38,5 °C. No D7, “pools” contendo 5 blastocistos para cada grupo experimental foram submetidos à extração de RNA total (RNAeasy-Qiagen). A expressão gênica dos genes-alvo foi analisada por RT-PCR em tempo real com oligo-dT na transcrição reversa (RT) e primers bovinos específicos na PCR. A expressão de ciclofilina A (CYC-A) foi utilizada como controle interno. As taxas de produção de embriões foram analisadas por ANOVA, utilizando o Proc GLM do SAS. As médias dos níveis de mRNA dos genes alvo entre os grupos foram comparadas por ANOVA paramétrica, seguido de contraste ortogonal. O ETC reduziu significativamente a produção de blastocisto na raça Jersey (24,33% vs. 14,16%), mas não alterou ($p>0,05$) na raça Nelore (33,09% vs. 28,33%). Quanto aos níveis de mRNA dos genes analisados, o ETC reduziu ($p<0,05$) a expressão de mRNA de CDX-2 e PLAC8 nas duas raças, além disso a expressão destes genes foi maior na raça Nelore comparado com a Jersey. A expressão de mRNA de COX2 diferiu ($p<0,05$) entre os grupos Nelore quando comparado ao grupo Jersey submetido ao ETC. Já a expressão de mRNA de HSF1 foi menor ($p<0,05$) no grupo Nelore submetido ao ETC quando comparado ao controle, entretanto, não houve diferença entre os grupos da raça Jersey. A expressão de mRNA de IFN- τ e HSP70 foi inconsistente nos grupos de embriões analisados. Conclui-se que o ETC (41° C, 6h, 96hpi) reduz significativamente a produção de blastocisto na raça Jersey, mas não na raça Nelore. Além disso, o ETC altera o perfil de expressão dos genes CDX-2, COX2, HSF1 e PLAC8, importantes para o desenvolvimento embrionário inicial, podendo prejudicar a viabilidade destes embriões.

Palavras-chave: Bovino; Embrião; Estresse térmico; Expressão gênica; FIV.

INTRODUÇÃO

A fase de pré-implantação representa um período extremamente dinâmico da embriogênese, no qual o embrião se desenvolve a partir de uma única célula, sob o controle genético da transcrição materna, para um conjunto de células altamente ativas metabólica e sinteticamente, agora sob seu próprio controle genético. Durante esse período o embrião passa por várias divisões celulares e três eventos importantes ocorrem: a compactação da mórula, a formação do blastocisto, com surgimento da blastocle e diferenciação em dois tipos celulares (trofoectoderme e massa celular interna), e a eclosão do blastocisto. Essas funções requerem a regulação precisa de vários processos celulares como a homeostasia, metabolismo e expressão gênica [1, 2].

Por ser um momento crítico do desenvolvimento embrionário, a capacidade do embrião responder as mudanças que ocorrem no seu ambiente é limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do genoma embrionário é ainda inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a certas formas de estresse como, por exemplo, o estresse térmico calórico (ETC).

O ETC pode ser definido como um ambiente quente que altera a temperatura corporal do animal para um valor acima da temperatura ideal [3]. Adaptações genéticas ao ETC são possíveis com a regulação da temperatura corpórea e a resistência celular às elevadas temperaturas. Dentre os bovinos, os zebuínos (*Bos indicus*) são a raça predominante nos trópicos porque possuem melhor tolerância ao ETC e são mais resistentes aos parasitas quando comparados ao gado taurino (*Bos taurus*; [4]).

O ETC pode causar diversos efeitos deletérios sobre a função reprodutiva dos mamíferos, incluindo mudanças na espermatogênese, com redução quantitativa e qualitativa da produção de espermatozoides nos machos, alterações no desenvolvimento e maturação oocitária, levando a queda da fertilidade nas fêmeas, alterações no desenvolvimento embrionário inicial, no crescimento fetal e na lactação [5, 3].

Está bem documentado que a exposição de fêmeas de mamíferos ao ETC aumenta a mortalidade embrionária [6], já que os embriões no estágio pré-implantacional são suscetíveis ao ETC materno.

A maior causa da redução na sobrevivência embrionária induzida pelo ETC pode ser originada pelos efeitos adversos das temperaturas elevadas no desenvolvimento dos gametas, zigotos e dos embriões [7].

Entretanto, os efeitos deletérios do ETC sobre a viabilidade do embrião diminuem de acordo com o avanço da prenhez [8, 9], sendo mínimos a partir do terceiro dia em bovinos [7]. Os embriões se tornam mais resistentes aos efeitos negativos do ETC à medida que avançam no seu desenvolvimento [10].

As diferenças entre as raças na tolerância ao ETC podem refletir em diferenças na produção dos embriões produzidos *in vitro*. As taxas de produção de embriões produzidos *in vitro*, submetidos ao ETC, são maiores para o gado *Bos indicus* em comparação com o gado *Bos taurus* [11, 12, 13] ou mestiço [14, 15].

As alterações adaptativas que permitem aquisição de termotolerância são provavelmente resultado de mudanças na expressão gênica e/ou na atividade de sistemas bioquímicos que comandam as funções celulares frente a alguma agressão como, por exemplo, as altas temperaturas [9].

A aquisição da capacidade de termotolerância pelas células submetidas a algum tipo de estresse envolve a síntese moléculas citoprotetoras, como as proteínas de choque térmico (heat shock protein - HSP). Nos mamíferos, a resposta ao estresse inclui alteração de expressão gênica sob a regulação do fator de transcrição de choque térmico [16], com uma rápida indução de transcrição de HSPs em uma grande variedade de células e tecidos [17]. Esta proteína é capaz de estabilizar proteínas e organelas intracelulares, além de inibir a apoptose celular.

Edwards & Hansen [10] demonstraram que embriões bovinos, já no estágio de duas células, são capazes de sintetizar grandes quantidades de HSP70 em resposta ao estresse térmico de 42°C e Chandoli et al. [18] verificaram que o aumento de HSP70 nos embriões bovinos de duas células foi resultado de uma nova transcrição.

El-Sayed et al. [19] identificaram um grupo de genes relacionados com a sobrevivência embrionária ao compararem embriões produzidos *in vitro* que, quando transferidos para receptoras, geraram uma gestação ou foram reabsorvidos. Seis genes apresentaram expressão aumentada nos embriões que geraram uma gestação quando comparados aos embriões reabsorvidos, sugerindo que estes genes podem ter um papel fundamental no desenvolvimento inicial e a implantação dos embriões. Dentre estes genes, pode-se citar o interferon- τ (IFN- τ), o CDX-2, (PLAC8) e COX2.

Assim, objetivou-se com o presente trabalho analisar comparativamente a expressão de interferon- τ (INF- τ), fator de transcrição homeobox tipo caudal 2 (CDX-2), placenta-específico 8 (PLAC8), prostaglandina G/H sintase 2 (COX2), proteína de

choque térmico 70 (HSP70) e fator de transcrição de choque térmico tipo 1 (HSF1) em embriões produzidos *in vitro* das raças Nelore e Jersey, submetidos ou não ao ETC.

MATERIAL E MÉTODO

1) Produção *in vitro* de embriões

Todos os reagentes e meios utilizados foram provenientes da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

1.1) Recuperação e classificação dos oócitos

Os complexos cumulus-oócito (CCOs) de vacas Nelore e Jersey foram obtidos através de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU – *ovum pick up*) em dias aleatórios do ciclo estral e foram classificados de acordo com as suas características celulares em quatro categorias [20]: I) oócitos com citoplasma homogêneo, circundados por três ou mais camadas compactas de células do *cumulus*; II) oócitos com menos de três camadas de células do *cumulus* ou parcialmente desnudos, porém com granulação homogênea no citoplasma; III) oócitos circundados apenas por células da corona radiata; IV) oócitos desnudos.

1.2) Maturação *in vitro*

Os CCOs classificados como categorias I, II e III foram lavados três vezes em meio TCM 199 com HEPES contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Langley, OK, USA), 2 µg/mL de piruvato e 75 µg/mL de gentamicina. Posteriormente, os CCOs foram lavados duas a três vezes no meio de maturação e distribuídos em gotas contendo 90 µL de meio de maturação, com uma média de 20 oócitos por gota, cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri (Corning®; Corning Brasil, São Paulo, SP, Brasil) de 35 x 10 mm. O meio de maturação utilizado foi o TCM 199 com bicarbonato contendo 10% de SFB, 2 µg/mL de piruvato, 75 µg/mL de gentamicina, 20 µg/mL de FSH (Pluset®; Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10 UI/mL de LH (Choriomon®; Vivimed, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os meios, preparados com 2 horas de antecedência, foram mantidos a 38,5 °C em incubadora. A maturação do CCOs foi realizada em incubadora a 38,5 °C (5 % de CO₂ em ar), durante 22 - 24 horas.

1.3) Preparo do sêmen e fertilização *in vitro*

O descongelamento do sêmen foi realizado em água a 37 °C por 30 segundos. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a superfície do gradiente de Percoll com densidade descontínua (500 µL a 45% sobre 500 µL a 90%) em eppendorf de 1,5 mL e centrifugado a 7000 G por 5 minutos.

Após a centrifugação, os espermatozóides viáveis obtidos do sedimento foram submetidos à avaliação de motilidade e concentração (câmara de Neubauer) e diluídos em volume apropriado do meio de fertilização para se obter uma concentração de 1×10^6 espermatozóides/mL.

Os CCOs já maturados foram lavados três vezes no meio TCM 199 com HEPES e uma vez no meio de fertilização e foram transferidos para gotas do mesmo meio, cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri de 35 mm x 10 mm.

Em seguida, foi realizada a fertilização dos CCOs utilizando 10 µL de sêmen diluído por gota. O processo de fertilização foi realizado por um período de 10 a 12 horas a 38,5 °C em 5% de CO₂ em ar. O meio de fertilização foi o TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos, 2 µL/mL de piruvato, 75 µg/mL de gentamicina, 11µg/mL de heparina e 44 µL/mL de solução de Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina (PHE).

Foram utilizados seis touros diferentes para cada uma das duas raças, a fim de minimizar a influência do touro. Em cada ensaio foram utilizadas duas palhetas de sêmen para cada raça de touro.

1.4) Desnudamento e cultivo *in vitro* dos embriões

De 10 a 12 horas após a fertilização (hpi), os prováveis zigotos foram desnudados nas gotas de fertilização com o uso de pipetas para remoção das células do *cumulus* circundante e dos espermatozóides associados. Em seguida, os prováveis zigotos foram lavados em gotas de TCM 199 com HEPES e por último, em meio de cultivo, sendo então transferidos para gotas de meio de cultivo de 90 µL (cerca 20 estruturas por gota), cobertas com óleo mineral, em placas de Petri de 35 mm. Utilizou-se o meio de cultivo SOF (“synthetic oviduct 258 fluid”; [21]), acrescido de 5% de SFB, 5% de BSA e 0,2% de piruvato de sódio.

Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas em sacos plásticos contendo uma mistura gasosa de 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ (White Martins, São Paulo, SP, Brasil). As trocas parciais do meio de cultivo foram

realizadas a cada 48 horas, quando foram retirados 50 µL de meio já presente juntamente com estruturas degeneradas, e acrescentados 50 µL de meio de cultivo fresco em cada gota.

1.5) Grupos experimentais

Após o desnudamento (12 hpi) os embriões foram distribuídos em dois grupos experimentais. No grupo controle, foram cultivados em temperatura constante de 38,5 °C. No grupo ETC, os embriões foram submetidos ao estresse térmico calórico de 41 °C (96 hpi), por 6 horas, voltando em seguida para o cultivo à temperatura de 38,5 °C.

Nos grupos controle e ETC, os embriões, 168 hpi, foram retirados do meio de cultivo e armazenados em “pools” contendo 5 blastocistos para cada grupo experimental. Os “pools” de blastocistos foram submetidos ao protocolo de extração de RNA, armazenados a -80 °C, para posterior utilização da técnica de transcrição reversa (RT), seguida por PCR em Tempo Real, para a investigação da expressão gênica dos mRNA dos genes alvo: CDX-2, COX2, HSF1, HSP70, IFN- τ e PLAC8 em embriões Nelore e Jersey.

2) Protocolos para investigação da expressão de mRNA

2.2) Extração de RNA (protocolo RNeasy - Qiagen®) e reação de transcrição reversa (Ominiscript - Qiagen®)

A extração de RNA provenientes de “pools” de blastocistos (5 blastocistos/”pool”) foi realizada segundo o protocolo RNeasy (Qiagen®). Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em 30µl água destilada e autoclavada.

Todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase a fim de evitar uma eventual contaminação por DNA genômico, antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen®), o volume da solução de RNA total tratado com DNase foi calculado a fim de conter 8µl do RNA total do pool de blastocistos. A este volume, foi adicionado 1µl de tampão DNase, 1µl de DNase I (1unidade/µl) e água “RNase free” suficiente para completar 10µl. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µl de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos para

inativação da enzima. Após esse procedimento, as amostras foram armazenadas em gelo até serem submetidas à reação de transcrição reversa.

Após tratamento com DNase, a reação de transcrição reversa (RT), foi realizada segundo o protocolo SuperScript III (Qiagen®), o qual inicia-se pela adição, em tubo estéril, de 8µl da solução de RNA total tratada com DNase, 1µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500µg/ml), 1µl de dNTP Mix (10nM) e 3µl de água estéril. Esta solução foi incubada a 65°C por 5 minutos e, em seguida, em gelo por 1,5 minuto. Após estas etapas, foram adicionados a solução 4µl de tampão “First Strand” (5X), 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de “RNAse OUT Inhibitor” (40unidades/µl, Invitrogen®). Na sequência, foi acrescido 1µl de SuperScript III (transcriptase reversa) e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. As amostras foram mantidas a -20° C para utilização no PCR.

2.2) Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão dos genes alvo (COX-2, CDX-2, HSF1, HSP70, IFN-τ e PLAC8) foi investigada por ensaio de PCR em tempo real a partir do mRNA proveniente de pools de blastocistos das raças Nelore e Jersey, submetidos ou não ao estresse térmico calórico (5 blastocistos/“pool”). Para a amplificação dos genes alvos foi utilizado o sistema Power Sybr® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) no ABI Prisma 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem), juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores bovino-específicos correspondentes (tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (S: oligonucleotídeo iniciador “sense” A: oligonucleotídeo iniciador “antisense”).

Genes	Sequencia	Temperatura (°C)	Tamanho (pb)
COX2	S: 5' AAGCCTAGCACTTTCGGTGGAGAA 3' A: 5' TCCAGAGTGGAAGAGCTTGCATT 3'	60	168
CDX-2	S: 5' TGGAGCTGGAGAAGGAGTTTCACT 3' A: 5' TCCTTCGCTCTGCGGTTCTGAAAT 3'	56	133
HSF1	S: 5' AAGCACAGCAACATGGCTAGCTTC 3' A: 5' AGTGGACACACTGGTCACTTTCCT 3'	60	189
HSP70	S: 5' AACAAAGATCACCATCACCAAACG3' A: 5' TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG 3'	59	275
IFN-τ	S: 5' TCATGGCATCTGGTCCCATCACTT 3' A: 5' TTCATGGCTGCAATCACCATCTGC 3'	60	283
PLAC8	S: 5' GAC TGG CAG ACT GGC ATC TT 3' A: 5' CTC ATG GCG ACA CTT GAT CC 3'	60	140

2.3) Análise dos dados de PCR em tempo real

A análise dos dados foi feita pela estimativa da eficiência de amplificação de cada amostra utilizando o software “LinRegPCR” [22] que considera a eficiência com base na curva de amplificação individual de cada tubo. No mínimo 4 pontos de cada curva de amplificação na fase exponencial foram delimitados e a média desses valores determinou o limiar (“Threshold”) para cada gene. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das eficiências individuais de cada tubo analisado.

Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela frequência de expressão daquele que foi considerado o melhor controle endógeno (GAPDH, Histona H2A ou Ciclofilina A). Para selecionar o gene endógeno mais estável, os três genes supracitados tiveram seu padrão de expressão comparados usando o software gNorm para Microsoft Excel (medgen.ugent.be/genorm; [22]), e a ciclofilina mostrou-se como melhor gene constitutivo.

A expressão relativa de cada gene analisado foi determinada pelo método de Pfaffl [23].

3) Análise estatística dos dados

As taxas de clivagem, mórula e blastocisto foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA), utilizando PROC GLM do programa SAS [24]. Os dados de porcentagem de clivagem, mórula e blastocisto foram transformados em arcoseno antes das análises. O modelo matemático incluiu os efeitos principais (raça e temperatura) e suas interações, considerando efeito de rodada como aleatório.

A fim de testar os efeitos da raça e da temperatura sobre a expressão dos genes alvo nos blastocistos foi realizada a seguinte sequência de análise: 1) teste de normalidade dos dados e de homogeneidade de variâncias entre grupos com transformação para logaritmos quando necessário para realização de análise paramétrica; 2) o efeito da raça e da temperatura sobre a expressão dos genes alvos nos blastocistos foi verificado por ANOVA e as médias dos grupos comparadas por contraste ortogonal. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa JMP versão 7.0 [25].

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e como tendência quando $p \geq 0,05$ e $\leq 0,1$.

RESULTADOS

Produção *in vitro* de embriões submetidos ou não ao estresse térmico calórico (ETC - 41° C)

As taxas de clivagem e mórula diferiram entre as raças estudadas. Entretanto, o ETC não diminuiu significativamente estas taxas tanto na raça Nelore quanto na raça Jersey (tabela 2).

Houve diferença significativa na produção de blastocistos entre as raças Nelore e Jersey nas temperaturas de 38,5°C e 41°C. Além disso, o ETC diminuiu ($p < 0,05$) a produção de blastocistos apenas na raça Jersey (tabela 2).

Tabela 2 - Taxas de clivagem (CLI), mórula (MO) e blastocisto (BL) de embriões das raças Nelore e Jersey, mantidos a 38,5°C ou submetidos ao ETC de 41°C por 6h, 96 hpi.

Raça	°C	Oócito (n)	CLI (%)	MO (%)	BL (%)
Nelore	38,5	148	84,50 ± 2,37 ^a	59,63 ± 3,32 ^a	33,09 ± 1,78 ^a
	41	144	85,69 ± 2,18 ^a	61,17 ± 2,15 ^a	28,33 ± 1,74 ^{ab}
Jersey	38,5	118	67,93 ± 4,19 ^b	43,19 ± 2,97 ^b	24,33 ± 4,10 ^b
	41	163	56,52 ± 2,85 ^b	34,45 ± 3,94 ^b	14,16 ± 1,85 ^c

Valores expressos como média ± EPM.

^{a,b,c} representam diferenças estatisticamente significativas nas colunas ($p < 0,05$).

Expressão de mRNA nos “pools” de blastocisto bovino (zebuíno vs. taurino)

Nove “pools” de blastocistos do grupo Nelore, 7 do grupo Nelore ETC, 5 do grupo Jersey e 5 do grupo Jersey ETC foram analisados para investigação dos genes alvo.

Os níveis de mRNA para os genes PLAC8 e CDX-2 foram menores ($p < 0,05$) nos “pools” de blastocistos submetidos ao ETC, tanto na raça Nelore quanto na raça Jersey, quando comparado ao grupo não submetido ao ETC. Ademais, houve maior expressão destes genes nos blastocistos da raça Nelore não submetidos ao ETC (figura 1).

O ETC diminuiu ($p < 0,05$) os níveis de mRNA para o gene HSF1 para o grupo Nelore submetido ao ETC comparado aos demais (figura 2).

Já os níveis de mRNA para o gene COX2 apresentaram diferença ($p < 0,05$) entre o grupo Jersey submetido ao ETC e os grupos Nelore, submetido ou não ao ETC (figura

3), mas não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos Jersey, submetidos ou não ao ETC.

Diferentemente dos outros genes analisados, a expressão de mRNA do IFN- τ e da HSP70 mostrou-se inconsistente, sendo pobremente detectada na maioria das amostras analisadas (até os 40 ciclos da PCR) e sem um padrão de expressão definido entre os tratamentos analisados.

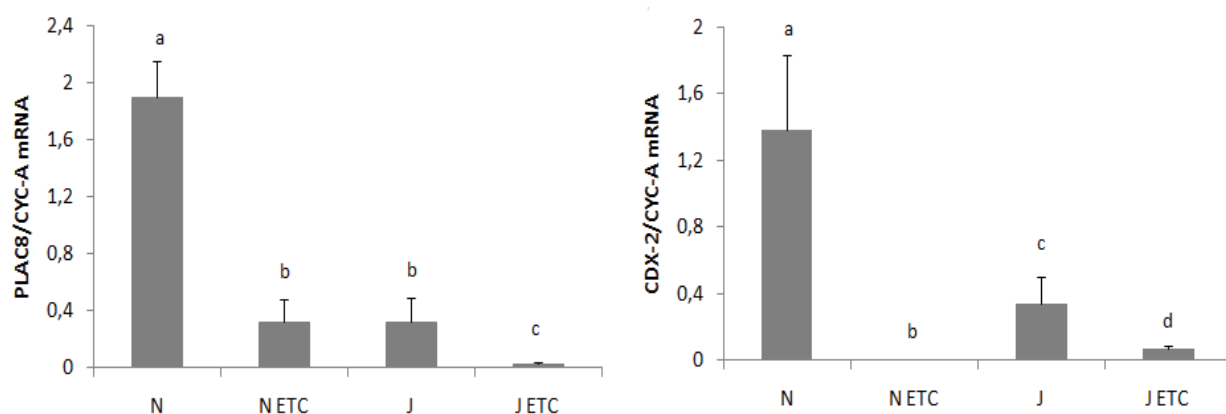


Figura 1 - Níveis do mRNA (média $\pm$ EPM) para os genes PLAC8 e CDX-2 em “pools” de blastocistos da raça Nelore (N) ou Jersey (J), submetidos ou não ao estresse térmico calórico (ETC). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

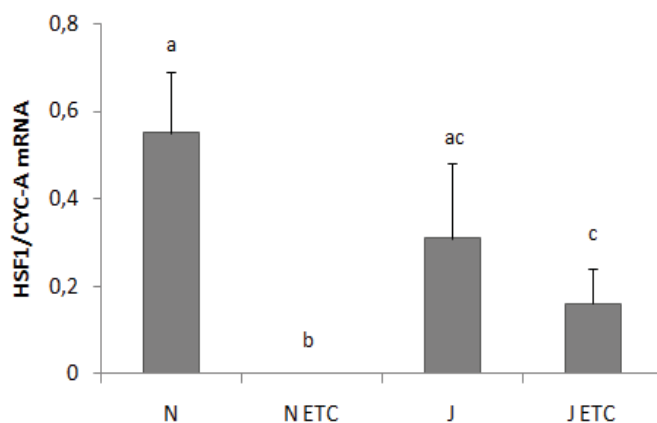


Figura 2 - Níveis do mRNA (média $\pm$ EPM) para o gene HSF1 em “pools” de blastocistos da raça Nelore (N) ou Jersey (J), submetidos ou não ao estresse térmico calórico (ETC). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

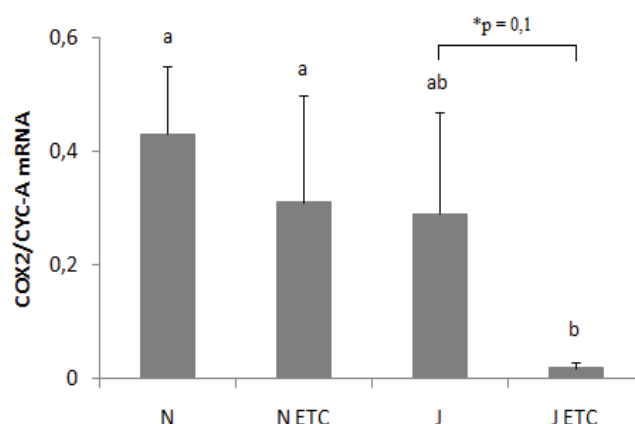


Figura 3 - Níveis do mRNA (média $\pm$ EPM) para o gene COX2 em “pools” de blastocistos da raça Nelore (N) ou Jersey (J), submetidos ou não ao estresse térmico calórico (ETC). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, o ETC reduziu significativamente o desenvolvimento embrionário inicial até o estágio de blastocisto na raça Jersey (*Bos taurus*). Entretanto, na raça Nelore (*Bos indicus*), este efeito não foi evidenciado. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Paula-Lopes et al. [11] e por Hernández-Cerón et al. [12] que verificaram que embriões de raças adaptadas ao calor (Brahman [11,12] e Romosinuano [12]) sobrevivem melhor ao ETC (41 °C, 6h, 96hpi) quando comparado aos embriões de raças sensíveis ao calor (HPB [11] e Angus [11,12]). De forma similar, Barros et al. [13] e Eberhardt et al. [14] demonstraram que embriões *Bos taurus* e mestiços são mais sensíveis ao ETC (41 °C, 12h, 96hpi) quando comparados aos embriões *Bos indicus*.

As taxas de clivagem, mórula e blastocisto diferiram significativamente entre as raças Nelore e Jersey, tanto no grupo 38,5 °C como no grupo 41°C, corroborando com os resultados de Camargo et al. [26] que verificaram diminuição nas taxas de clivagem e blastocisto produzidos *in vitro*, a partir de oócitos obtidos por OPU, entre as raças HPB (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*).

Existem evidências de que o gado adaptado ao clima tropical, como raças *Bos indicus* e os *Bos taurus* adaptados (como por exemplo, Senepol e Romosinuano), tenha adquirido genes que protejam as células dos efeitos deletérios das elevadas temperaturas

[4]. Por exemplo, linfócitos de vacas Brahman e Senepol são mais resistentes a apoptose celular causada pelo ETC que linfócitos de vacas Angus ou HPB [11].

Entretanto, grande parte destes genes ainda não foi identificada e pouco se sabe sobre genes específicos controlando a resistência ao ETC nos zebuínos. É possível que os mesmos genes confirmem a termotolerância às diferentes raças zebuínas, ou até mesmo genes diferentes. A identificação destes genes oferece a possibilidade de sua incorporação nas raças sensíveis ao calor com o objetivo de melhorar a reprodução e outros sistemas fisiológicos comprometidos com a hipertermia [4, 27].

Embora o ETC não tenha afetado a produção *in vitro* de embriões na raça Nelore, observou-se, nas raças Nelore e Jersey, diferença nos níveis de expressão de mRNA dos genes analisados entre os grupos submetidos ou não ao ETC.

Quando as células são submetidas a algum tipo de estresse, como o ETC, inicia-se uma resposta celular a fim de minimizar os efeitos deletérios do estresse. Nos mamíferos, a resposta ao estresse inclui alteração da expressão gênica sob a regulação do fator de transcrição de choque térmico (HSF; [16]). O HSF1 é o principal fator de transcrição de choque térmico que se liga na região promotora dos genes das HSPs e permite uma rápida indução de expressão de HSPs nas células submetidas a um ambiente estressor [28]. No presente trabalho, houve diminuição nos níveis de expressão de mRNA de HSF1 nos grupos submetidos ao ETC em ambas as raças analisadas. Embora não tenha sido investigada a expressão protéica de HSF1, é provável que, durante o ETC, os mRNA de HSF1 tenham sido utilizados para formação da sua proteína com posterior ligação a região promotora dos genes de HSPs, e indução da expressão destas proteínas para proteção celular ao ETC.

Entre os grupos submetidos ao ETC, houve maior nível de expressão de mRNA de HSF1 nos embriões Jersey quando comparados aos Nelore. Estes resultados indicam a possibilidade dos embriões Nelore, por serem mais adaptados ao calor, utilizarem mais HSF1 para promover a expressão de HSPs e assim, consequentemente, induzirem uma melhor resposta celular contra o ETC.

Quanto a expressão do mRNA da HSP70 e do IFN- τ , a mesma foi inconsistente nos “pools” de blastocistos de ambas as raças, submetidos ou não ao ETC. A ausência de expressão gênica de HSP70 e IFN- τ e a ausência de um padrão de expressão, na maioria das amostras analisadas, talvez possa ser explicada pelo número de embriões em cada “pool”. Neste trabalho, foram utilizados 5 embriões por “pool”, enquanto que em outros trabalhos que analisaram a expressão gênica de HSP70 em embriões bovinos

utilizaram “pools” de 10 embriões [29] e até “pools” de 20 a 30 embriões [30]. Da mesma forma, relatos sobre a expressão gênica de IFN- τ , utilizaram “pools” de 15 embriões [31, 32], de 20 a 30 embriões [30] ou até mesmo embriões em estágio mais avançado do desenvolvimento embrionário [33, 34].

Os genes CDX-2, um fator de transcrição expresso especificamente pela trofoectoderme, importante para a implantação e desenvolvimento da placenta [35], e PLAC8, um gene de invasão também expresso pela trofoectoderme de embriões no estágio de pré-implantação e que tem um papel importante no desenvolvimento da placenta e na comunicação materno-fetal [31], tiveram, no presente trabalho, redução na quantidade de seus transcritos nos embriões submetidos ao ETC em ambas as raças estudadas. Além disso, também ocorreu diferença na expressão de mRNA entre as raças Nelore e Jersey, com maior expressão de CDX-2 e PLAC8 em embriões Nelore, produzidos *in vitro* na ausência de ETC, quando comparado aos demais grupos de embriões.

El-Sayed et al. [19] observaram que os genes CDX-2 e PLAC8 apresentam maior nível de expressão em embriões bovinos produzidos *in vitro* que originaram uma gestação, quando comparados aos embriões que foram reabsorvidos após serem transferidos para receptoras. Em adição, Lazzari et al. [36] observaram maior expressão de CDX-2 e PLAC8 em embriões bovinos cruzados quando comparado aos embriões taurinos puros, apontando para uma maior capacidade dos embriões cruzados estabelecerem uma gestação. Por outro lado, embriões bovinos produzidos por transferência nuclear apresentam taxa de perda embrionária mais elevada e menor expressão de CDX-2 quando comparado aos embriões produzidos *in vivo* [37]. Deste modo, é provável que os embriões zebuínos, na ausência de ETC, apresentem maior capacidade para estabelecerem uma gestação por apresentarem maior quantidade de transcritos de CDX-2 e PLAC8. Entretanto, a presença do ETC pode afetar a capacidade dos embriões gerarem uma gestação a termo ao reduzir a expressão destes genes. Estes resultados reforçam a possibilidade destes genes tornarem-se marcadores de qualidade embrionária em programas de produção de embriões, como forma de identificar embriões com maior potencial para estabelecimento da gestação na espécie bovina.

A análise dos níveis de mRNA do gene COX2, que codifica uma enzima relacionada com a síntese de prostagladina e que é expresso pela trofoectoderme de embriões em estágio pré-implantação [19], indicou que o ETC tendeu a diminuir ($p=0,1$) a expressão deste gene nos embriões da raça Jersey, mas não alterou

significativamente a expressão na raça Nelore. Considerando que o gene COX2 é mais abundante em blastocistos que originam uma gestação a termo, comparado com aqueles que resultam em reabsorção uterina [19], pode-se especular que os embriões Jersey, submetidos ao ETC, possivelmente teriam menores chances de sobreviver após serem transferidos para receptoras.

Em suma, conclui-se que o ETC (41° C, 6h, 96hpi) reduziu a produção de blastocisto na raça Jersey, mas não diminuiu significativamente a produção de embriões na raça Nelore. Além disso, o ETC altera o perfil de expressão dos genes CDX-2, COX2, HSF1 e PLAC8, importantes para o desenvolvimento embrionário inicial, tanto na raça Nelore quanto na raça Jersey, podendo prejudicar a viabilidade destes embriões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lane, M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. *Theriogenology* 2001;55:225-36.
- [2] Badr, H., Bongioni, G., Abdoon, A.S.S., Kandil, O., Puglisi, R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote* 2007;15:355-67.
- [3] Hansen, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2009;364:3341-50.
- [4] Hansen, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim. Reprod. Sci.* 2004;82-83:p. 349-60.
- [5] Hansen, P.J. Drost, M., Rivera, R.M., Paula-Lopes, F.F., Al-Katanani, Y.M., Krininger III, C.E., Chase Jr, C.C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 2001;55:91-103.
- [6] Thatcher, W.W., Hansen, P.J. Environment and reproduction. *Reprod. Domestic. Anim.* Amsterdam: Elsevier World Animals Science Series 1993;9:433-57.
- [7] Ealy, A.D., Drost, M., Hansen, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 1993;76:2899-905.
- [8] Hansen, P.J. Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the mammalian preimplantation embryo from heat shock. *Ann. Rev. Biomed. Sci.* 1999;1:5-29.
- [9] Edwards, J.L., King, W.A, Kawarsky, S.J., Ealy, A.D.. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP 70 and glutathione. *Theriogenology* 2001;55:209-23.
- [10] Edwards, J.L., Hansen, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 1997;46:138-45.
- [11] Paula-Lopes, F.F., Chase Jr, C.C., Al-Katanani, Y.M., Krininger III, C.E., Rivera, R.M., Tekin, S., Majewski, A.C., Ocon, O.M., Olson, T.A, Hansen, P.J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 2003;125:285-94.
- [12] Hernández-Cerán, J., Chase Jr, C.C., Hansen, P.J. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano and Angus breeds. *J. Dairy Sci.* 2004;71:53-8.
- [13] Barros, C.M., Pegorer, M.F., Vasconcelos, J.L.M., Eberhardt, B.G., Mointeiro, F.M. Importance of sperm genotype (*indicus* vs. *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. *Theriogenology* 2006;65:210-19.
- [14] Barros, C.M., Monteiro, F.M., Mello, D.S., Carvalho, L.M., Teixeira, A.B., Trinca, L.A., Freitas, E.C. Resistance of *Bos indicus* to heat shock, compared to crossbred or *Bos*

- Taurus*, at early stages of in vitro embryo development. International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, 6th, Scotland, 2002;p.A4.
- [15] Eberhardt, B.G., Satrapa, R.A., Capinzaiki, C.R.L., Trinca L.A, Barros, C. M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos Taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. Anim. Reprod. Sci 2009;114:54-61.
- [16] Collier, R.J., Collier, J.L., Rhoads, R.P., Baumgard, L.H. Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. J. Dairy Sci 2008; 91: 445-54.
- [17] Luft, J.C., Dix, D.J. Hsp70 expression and function during embryogenesis. Cell Stress & Chaperones 1999;4:162-170.
- [18] Chandioli, R.K., Peltier, M.R., Tian, W., Hansen, P.J. Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. Biol. Reprod. 1999;61:1644-48.
- [19] El-Sayed, A., Hoelker, M., Rings, F., Salilew, D., Jennen, D., Tholen, E., Sirard, M.A., Schellander, K., Tesfaye, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. Physiol Genomics 2006;28:84-96.
- [20] Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine derived *in vitro* or in vivo. Biol Reprod 2000;62: 847-856.
- [21] Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology 1999;52: 683-700.
- [22] Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett 2003;339:62-6.
- [23] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research. 2001: 29-45.
- [24] SAS: Statistical Analysis System. A user's guide. SAS Institute C, version 9.1.3., 2002/2003.
- [25] JMP, versão 7.0, SAS Institute, Cary, NC, USA.
- [26] Camargo, L.S., Viana, J.H., Ramos, A.A., Serapião, R.V., de Sa, W.F., Ferreira, A.M., Guimarães, M.F., do Vale Filho, V.R. Development competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. Theriogenology 2007;68: 626-32.
- [27] HANSEN, P.J. Exploration of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevate temperatures to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. Theriogenology 2007;68:242-49.
- [28] Xiao, X., Zuo, X., Davis, A.A., McMillan, D.R., Curry, B.B., Richardson, J.A., Benjamin, I.J. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory response in mice. The EMBO Journal 1999;18: 5943-52.
- [29] Vireque, A.A., Camargo, L.S.A., Serapião, R.V., Rosa e Silva, A.A.M., Watanabe, Y.F., Ferreira, E.M., Navarro, P.A.A.S, Martins, W.P., Ferriani, R.A. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. Theriogenology 2009;71: 620-27.
- [30] WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., KESKINTEPE, L., MARTINS JR., A., SIRISATHIEN, S., BRACKETT, B., NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. Human Reprod. 2001;16: 893-901.
- [31] Gómez, E., Gutiérrez-Adán, A., Díez, C., Bermejo-Alvarez, P., Muñoz, M., Rodríguez, A. et al. Biological differences between in vitro produced bovine embryos and parthenotes. Reproduction 2009;137: 285-95.
- [32] Mundim, T.C.D., Ramos, A.F., Sartori, R., Dode, M.A.N., Melo, E.O., Gomes, L.F.S., Rumpf, R., Franco, M.M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos

- 541 produced *in vitro*, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. Genet. Mol. Res. 2009;8: 1398-407.
- 542
- 543 [33] Kato, Y., Li, X., Amarnath, D., Ushizawa, K., Hashizume, K., Tokunaga, T., Taniguchi, M., Tsunoda, Y. Comparative gene expression analysis of bovine nuclear-transferred embryos with different developmental potential by cDNA microarray and real-Time PCR to determine genes that might reflect calf normality. Cloning Stem Cells 2007;9: 495-511.
- 544
- 545
- 546
- 547 [34] RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L., SHARBATI, J., SHARBATI, S., COX, J.F., EINSPANIER, R., CASTRO, F.O. Differential gene expression in bovine elongated (Day 17) embryos produced by somatic cell nucleus transfer and *in vitro* fertilization. Theriogenology 2010;74: 45-59.
- 548
- 549
- 550
- 551 [35] Chawengsaksophak, K., Graaff, W., Rossant, J., Deschamps, J., Beck, F. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. Develop. Bio 2004;101: 7641-5.
- 552
- 553 [36] Lazzari, G., Colleoni, S., Duchi, R., Galli, A., Houghton, F.D., Galli, C. Embryonic genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. Reproduction 2011;141: 625-32.
- 554
- 555
- 556 [37] Hall, V.J., Ruddock, N.T., French, A.J. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro*, and nuclear transfer blastocysts. Mol. Reprod. and Develop. 2005;72: 16-24.
- 557
- 558