

**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;  
**CO<sub>2</sub>** - gás carbônico;  
**CCO** - (*cumulus oocytes complexes*): complexo cúmulos – oócito;  
**E<sub>2</sub>** - 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;  
**N<sub>2</sub>** - nitrogênio;  
**OPU** - ovum pick up;  
**O<sub>2</sub>** - oxigênio;  
**pb** – pares de base;  
**PCR** – (polymerase chain reaction): reação em cadeia da polimerase;  
**PG** – prostaglandina;  
**PGF<sub>2α</sub>** – prostaglandina F<sub>2α</sub>;  
**PHE** - Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina;  
**RNA<sub>m</sub>** – (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- $\tau$  (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- $\tau$ , CDX-2, PLAC8, COX2, HSP70 e HSF1.

### **HIPÓTESE**

Sob a influência ETC, embriões da raça Nelore apresentam maior expressão dos genes IFN- $\tau$ , 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 conseqüentemente 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 blastocele 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- $\tau$  (IFN-tau), 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 blastocele (Strumpf et al., 2005).

Interferon- $\tau$  (IFN- $\tau$ ) 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- $\tau$  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- $\tau$  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- $\tau$  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 blastoclele 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**, 6<sup>th</sup>, 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., EALY, 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.

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

4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12 Silva, C.F.<sup>1</sup>; Castilho, A.C.S.<sup>2</sup>; Satrapa, R.A.<sup>1</sup>; Puelker, R.Z.<sup>1</sup>; Razza, E.M.<sup>1</sup>; Ticianelli,  
13 J.S.<sup>1</sup>, Eduardo, H.P.<sup>3</sup>; Loureiro, B.<sup>1</sup>; Buratini Jr., J.<sup>2</sup>; Barros, C.M.<sup>1a</sup>

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21 <sup>1</sup>Departamento de Farmacologia e <sup>2</sup>Departamento de Fisiologia, Instituto de  
22 Biociências, UNESP, Botucatu-SP, <sup>3</sup>Proget, Botucatu –SP

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34 <sup>a</sup>Autor para correspondência: Ciro Moraes Barros; fax: +55 14 38116253; cmbarrros@ibb.unesp.br

**35 RESUMO**

36 Os efeitos deletérios do estresse térmico calórico (ETC) sobre a fertilidade são menos  
37 pronunciados em raças tolerantes ao calor, devido às diferenças na capacidade de  
38 termorregulação. Para melhor compreender as diferenças entre zebuínos e taurinos em relação  
39 ao ETC, objetivou-se com o presente trabalho comparar a expressão dos genes COX2, CDX-2,  
40 IFN- $\tau$ , HSF1, HSP70 PLAC8, relacionados com o desenvolvimento embrionário inicial, em  
41 embriões bovinos produzidos *in vitro* (zebuínos vs. taurinos), submetidos ou não ao ETC.  
42 Oócitos de vacas Nelore (*Bos indicus*) e Jersey (*Bos taurus*) foram obtidos por aspiração  
43 folicular guiada por ultrassom (OPU) e maturados *in vitro* por 24 horas. Em seguida, foram  
44 fertilizados *in vitro* (D=0) com sêmen Nelore e Jersey, respectivamente. Doze horas após a  
45 fertilização, os prováveis zigotos (zebuínos e taurinos) foram cultivados *in vitro* em temperatura  
46 de 38,5°C. Noventa e seis horas após a fertilização, os embriões  $\geq 16$  células, de ambas as raças,  
47 foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: controle, cultivado  
48 continuamente a 38,5 °C, e ETC, exposto a 41 °C por 6 horas, retornando a seguir para 38,5 °C.  
49 No D7, “pools” contendo 5 blastocistos para cada grupo experimental foram submetidos à  
50 extração de RNA total (RNAeasy-Qiagen). A expressão gênica dos genes-alvo foi analisada por  
51 RT-PCR em tempo real com oligo-dT na transcrição reversa (RT) e primers bovinos específicos  
52 na PCR. A expressão de ciclofilina A (CYC-A) foi utilizada como controle interno. As taxas de  
53 produção de embriões foram analisadas por ANOVA, utilizando o Proc GLM do SAS. As  
54 médias dos níveis de mRNA dos genes alvo entre os grupos foram comparadas por ANOVA  
55 paramétrica, seguido de contraste ortogonal. O ETC reduziu significativamente a produção de  
56 blastocisto na raça Jersey (24,33% vs. 14,16%), mas não alterou ( $p>0,05$ ) na raça Nelore  
57 (33,09% vs. 28,33%). Quanto os níveis de mRNA dos genes analisados, o ETC reduziu  
58 ( $p<0,05$ ) a expressão de mRNA de CDX-2 e PLAC8 nas duas raças, além disso a expressão  
59 destes genes foi maior na raça Nelore comparado com a Jersey. A expressão de mRNA de  
60 COX2 diferiu ( $p<0,05$ ) entre os grupos Nelore quando comparado ao grupo Jersey submetido ao  
61 ETC. Já a expressão de mRNA de HSF1 foi menor ( $p<0,05$ ) no grupo Nelore submetido ao  
62 ETC quando comparado ao controle, entretanto, não houve diferença entre os grupos da raça  
63 Jersey. A expressão de mRNA de IFN- $\tau$  e HSP70 foi inconsistente nos grupos de embriões  
64 analisados. Concluí-se que o ETC (41° C, 6h, 96hpi) reduz significativamente a produção de  
65 blastocisto na raça Jersey, mas não na raça Nelore. Além disso, o ETC altera o perfil de  
66 expressão dos genes CDX-2, COX2, HSF1 e PLAC8, importantes para o desenvolvimento  
67 embrionário inicial, podendo prejudicar a viabilidade destes embriões.

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

69

70

71

## 72 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

117 A aquisição da capacidade de termotolerância pelas células submetidas a algum  
118 tipo de estresse envolve a síntese moléculas citoprotetoras, como as proteínas de choque  
119 térmico (heat shock protein - HSP). Nos mamíferos, a resposta ao estresse inclui  
120 alteração de expressão gênica sob a regulação do fator de transcrição de choque térmico  
121 [16], com uma rápida indução de transcrição de HSPs em uma grande variedade de  
122 células e tecidos [17]. Esta proteína é capaz de estabilizar proteínas e organelas  
123 intracelulares, além de inibir a apoptose celular.

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

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

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

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

140

## 141 MATERIAL E MÉTODO

142

### 143 1) Produção *in vitro* de embriões

144

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

147

#### 148 1.1) Recuperação e classificação dos oócitos

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

157

#### 158 1.2) Maturação *in vitro*

159 Os CCOs classificados como categorias I, II e III foram lavados três vezes em  
160 meio TCM 199 com HEPES contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Langley,  
161 OK, USA), 2 µg/mL de piruvato e 75 µg/mL de gentamicina. Posteriormente, os CCOs  
162 foram lavados duas a três vezes no meio de maturação e distribuídos em gotas contendo  
163 90 µL de meio de maturação, com uma média de 20 oócitos por gota, cobertas com 3,5  
164 mL de óleo mineral em placas de Petri (Corning®; Corning Brasil, São Paulo, SP,  
165 Brasil) de 35 x 10 mm. O meio de maturação utilizado foi o TCM 199 com bicarbonato  
166 contendo 10% de SFB, 2 µg/mL de piruvato, 75 µg/mL de gentamicina, 20 µg/mL de  
167 FSH (Pluset®; Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10 UI/mL de LH (Choriomon®;  
168 Vivimed, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os meios, preparados com 2 horas de  
169 antecedência, foram mantidos a 38,5 °C em incubadora. A maturação do CCOs foi  
170 realizada em incubadora a 38,5 °C (5 % de CO<sub>2</sub> em ar), durante 22 - 24 horas.

171



172 1.3) Preparo do sêmen e fertilização *in vitro*

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

177 Após a centrifugação, os espermatozóides viáveis obtidos do sedimento foram  
178 submetidos à avaliação de motilidade e concentração (câmara de Neubauer) e diluídos  
179 em volume apropriado do meio de fertilização para se obter uma concentração de  $1 \times$   
180  $10^6$  espermatozóides/mL.

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

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

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

193

194 1.4) Desnudamento e cultivo *in vitro* dos embriões

195 De 10 a 12 horas após a fertilização (hpi), os prováveis zigotos foram  
196 desnudados nas gotas de fertilização com o uso de pipetas para remoção das células do  
197 *cumulus* circundante e dos espermatozóides associados. Em seguida, os prováveis  
198 zigotos foram lavados em gotas de TCM 199 com HEPES e por último, em meio de  
199 cultivo, sendo então transferidos para gotas de meio de cultivo de 90 µL (cerca 20  
200 estruturas por gota), cobertas com óleo mineral, em placas de Petri de 35 mm. Utilizou-  
201 se o meio de cultivo SOF (“synthetic oviduct 258 fluid”; [21]), acrescido de 5% de SFB,  
202 5% de BSA e 0,2% de piruvato de sódio.

203 Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas em  
204 sacos plásticos contendo uma mistura gasosa de 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>  
205 (White Martins, São Paulo, SP, Brasil). As trocas parciais do meio de cultivo foram

206 realizadas a cada 48 horas, quando foram retirados 50  $\mu$ L de meio já presente  
207 juntamente com estruturas degeneradas, e acrescentados 50  $\mu$ L de meio de cultivo  
208 fresco em cada gota.

209

## 210 1.5) Grupos experimentais

211 Após o desnudamento (12 hpi) os embriões foram distribuídos em dois grupos  
212 experimentais. No grupo controle, foram cultivados em temperatura constante de 38,5  
213 °C. No grupo ETC, os embriões foram submetidos ao estresse térmico calórico de 41 °C  
214 (96 hpi), por 6 horas, voltando em seguida para o cultivo à temperatura de 38,5 °C.

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

222

## 223 2) Protocolos para investigação da expressão de mRNA

224

225 2.2) Extração de RNA (protocolo RNeasy - Qiagen®) e reação de transcrição reversa  
226 (Ominiscript - Qiagen®)

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

231 Todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase a fim de evitar uma  
232 eventual contaminação por DNA genômico, antes de serem submetidas ao RT-PCR.  
233 Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen®), o  
234 volume da solução de RNA total tratado com DNase foi calculado a fim de conter 8 $\mu$ l  
235 do RNA total do pool de blastocistos. A este volume, foi adicionado 1 $\mu$ l de tampão  
236 DNase, 1 $\mu$ l de DNase I (1unidade/ $\mu$ l) e água “RNase free” suficiente para completar  
237 10 $\mu$ l. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em  
238 seguida, foi acrescida de 1 $\mu$ l de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos para

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

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

252

## 253 2.2) Investigação da expressão gênica por PCR em tempo real

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

261

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

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

264

### 265 2.3) Análise dos dados de PCR em tempo real

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

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

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

280

### 281 3) Análise estatística dos dados

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

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

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

297

## 298 RESULTADOS

299

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

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

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

308

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

311

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

312 Valores expressos como média ± EPM.

313 <sup>a,b,c</sup> representam diferenças estatisticamente significativas nas colunas ( $p < 0,05$ ).

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

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

318 Os níveis de mRNA para os genes PLAC8 e CDX-2 foram menores ( $p < 0,05$ )  
 319 nos “pools” de blastocistos submetidos ao ETC, tanto na raça Nelore quanto na raça  
 320 Jersey, quando comparado ao grupo não submetido ao ETC. Ademais, houve maior  
 321 expressão destes genes nos blastocistos da raça Nelore não submetidos ao ETC (figura  
 322 1).

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

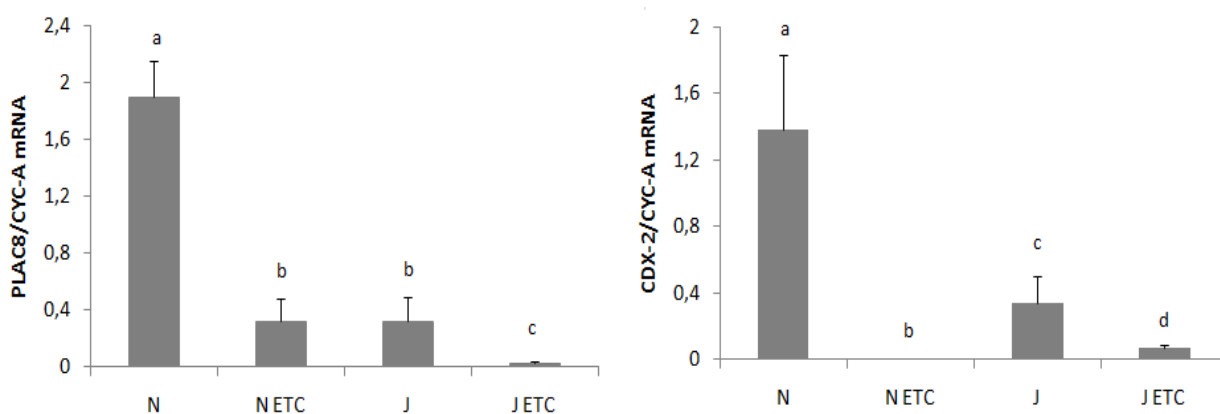
325 Já os níveis de mRNA para o gene COX2 apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) entre  
 326 o grupo Jersey submetido ao ETC e os grupos Nelore, submetido ou não ao ETC (figura

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

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

333

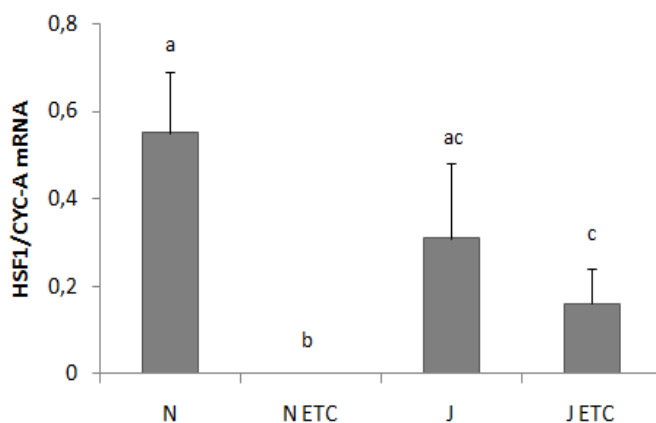
334



335

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

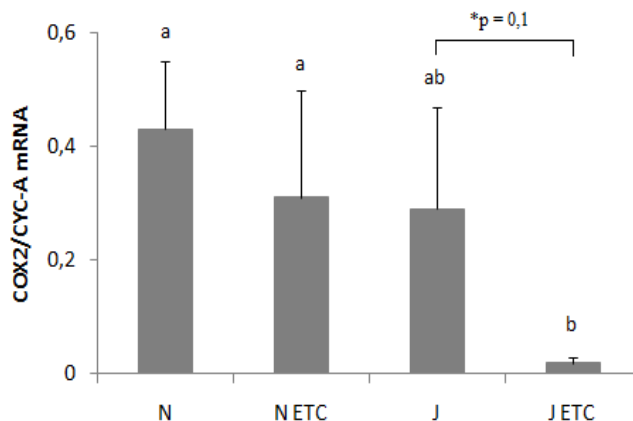
339



340

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

344



345

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

349

350

### 351 DISCUSSÃO

352

353 No presente trabalho, o ETC reduziu significativamente o desenvolvimento  
 354 embrionário inicial até o estágio de blastocisto na raça Jersey (*Bos taurus*). Entretanto,  
 355 na raça Nelore (*Bos indicus*), este efeito não foi evidenciado. Estes resultados estão em  
 356 concordância com os obtidos por Paula-Lopes et al. [11] e por Hernández-Cerón et al.  
 357 [12] que verificaram que embriões de raças adaptadas ao calor (Brahman [11,12] e  
 358 Romosinuano [12]) sobrevivem melhor ao ETC (41 °C, 6h, 96hpi) quando comparado  
 359 aos embriões de raças sensíveis ao calor (HPB [11] e Angus [11,12]). De forma similar,  
 360 Barros et al. [13] e Eberhardt et al. [14] demonstraram que embriões *Bos taurus* e  
 361 mestiços são mais sensíveis ao ETC (41 °C, 12h, 96hpi) quando comparados aos  
 362 embriões *Bos indicus*.

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

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

371 [4]. Por exemplo, linfócitos de vacas Brahman e Senepol são mais resistentes a apoptose  
372 celular causada pelo ETC que linfócitos de vacas Angus ou HPB [11].

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

449

#### 450 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

451

452 [1] Lane, M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. *Theriogenology*  
 453 2001;55:225-36.

454 [2] Badr, H., Bongioni, G., Abdoon, A.S.S., Kandil, O., Puglisi, R. Gene expression in the *in*  
 455 *vitro*-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote* 2007;15:355-67.

456 [3] Hansen, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. B.*  
 457 2009;364:3341-50.

458 [4] Hansen, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim.*  
 459 *Reprod. Sci.* 2004;82-83:p. 349-60.

460 [5] Hansen, P.J. Drost, M., Rivera, R.M., Paula-Lopes, F.F., Al-Katanani, Y.M., Krininger III,  
 461 C.E., Chase Jr, C.C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and  
 462 strategies for mitigation. *Theriogenology* 2001;55:91-103.

463 [6] Thatcher, W.W., Hansen. P.J. Environment and reproduction. *Reprod. Domestic. Anim.*  
 464 Amesterdan: Elsevier World Animals Science Series 1993;9:433-57.

465 [7] Ealy, A.D., Drost, M., Hansen, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to  
 466 adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 1993;76:2899-905.

467 [8] Hansen, P.J. Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the  
 468 mamalian preimplantation embryo from heat shock. *Ann. Rev. Biomed. Sci.* 1999;1:5-29.

469 [9] Edwards, J.L., King, W.A, Kawarsky, S.J., Ealy, A.D.. Responsiveness of early embryos to  
 470 environmental insults: potential protective roles of HSP 70 and glutathione.  
 471 *Theriogenology* 2001;55:209-23.

472 [10] Edwards, J.L., Hansen, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation  
 473 embryos to heat shock. *MoI. Reprod. Dev.* 1997;46:138-45.

474 [11] Paula-Lopes, F.F., Chase Jr, C.C., Al-Katanani, Y.M., Krininger III, C.E., Rivera, R.M.,  
 475 Tekin, S., Majewski, A.C., Ocon, O.M., Olson, T.A, Hansen, P.J. Genetic divergence in  
 476 cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in  
 477 temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract  
 478 tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 2003;125:285-94.

479 [12] Hernández-Cerán, J., Chase Jr, C.C., Hansen, P.J. Differences in heat tolerance between  
 480 preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano and Angus breeds. *J. Dairy Sci.*  
 481 2004;71:53-8.

482 [13]Barros, C.M., Pegorer, M.F., Vasconcelos, J.L.M., Eberhardt, B.G., Mointeiro, F.M.  
 483 Importance of sperm genotype (*indicus* vs. *taurus*) for fertility and embryonic development  
 484 at elevated temperatures. *Theriogenology* 2006;65:210-19.

485 [14] Barros, C.M., Monteiro, F.M., Mello, D.S., Carvalho, L.M., Teixeira, A.B., Trinca, L.A.,  
 486 Freitas, E.C. Resistance of *Bos indicus* to heat shock, compared to crossbred or *Bos*

- 487 *Taurus*, at early stages of *in vitro* embryo development. International Symposium on  
488 Reproduction in Domestic Ruminants, 6<sup>th</sup>, Scotland, 2002;p.A4.
- 489 [15] Eberhardt, B.G., Satrapa, R.A, Capinzaiki, C.R.L., Trinca L.A, Barros, C. M. Influence of  
490 the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos*  
491 *Taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to  
492 heat. Anim. Reprod. Sci 2009;114:54-61.
- 493 [16] Collier, R.J., Collier, J.L., Rhoads, R.P., Baumgard, L.H. Invited review: Genes involved in the  
494 bovine heat stress response. J. Dairy Sci 2008; 91: 445-54.
- 495 [17] Luft, J.C., Dix, D.J. Hsp70 expression and function during embryogenesis. Cell Stress &  
496 Chaperones 1999;4:162-170.
- 497 [18] Chandoli, R.K., Peltier, M.R., Tian, W., Hansen, P.J. Transcriptional control of  
498 development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell  
499 bovine embryos. Biol. Reprod. 1999;61:1644-48.
- 500 [19] El-Sayed, A., Hoelker, M., Rings, F., Salilew, D., Jennen, D., Tholen, E., Sirard, M.A.,  
501 Schellander, K., Tesfaye, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies  
502 in relation to pregnancy success after transfer to recipients. Physiol Genomics 2006;28:84-  
503 96.
- 504 [20] Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine derived *in vitro*  
505 or *in vivo*. Biol Reprod 2000;62: 847-856.
- 506 [21] Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst  
507 development in a static *in vitro* production system using sofaa medium supplemented with  
508 sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology 1999;52:  
509 683-700.
- 510 [22] Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of  
511 quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett 2003;339:62-6.
- 512 [23] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.  
513 Nucleic Acids Research. 2001: 29-45.
- 514 [24] SAS: Statistical Analysis System. A user's guide. SAS Institute C, version 9.1.3.,  
515 2002/2003.
- 516 [25] JMP, versão 7.0, SAS Institute, Cary, NC, USA.
- 517 [26] Camargo, L.S., Viana, J.H., Ramos, A.A., Serapião, R.V., de Sa, W.F., Ferreira, A.M.,  
518 Guimarães, M.F., do Vale Filho, V.R. Development competence and expression of the Hsp  
519 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical  
520 environment. Theriogenology 2007;68: 626-32.
- 521 [27] HANSEN, P.J. Exploration of genetic and physiological determinants of embryonic  
522 resistance to elevate temperatures to improve embryonic survival in dairy cattle during  
523 heat stress. Theriogenology 2007;68:242-49.
- 524 [28] Xiao, X., Zuo, X., Davis, A.A., McMillan, D.R., Curry, B.B., Richardson, J.A., Benjamin,  
525 I.J. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection  
526 during inflammatory response in mice. The EMBO Journal 1999;18: 5943-52.
- 527 [29] Vireque, A.A., Camargo, L.S.A., Serapião, R.V., Rosa e Silva, A.A.M., Watanabe, Y.F.,  
528 Ferreira, E.M., Navarro, P.A.A.S, Martins, W.P., Ferriani, R.A. Preimplantation  
529 development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from  
530 oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic  
531 macromolecules. Theriogenology 2009;71: 620-27.
- 532 [30] WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., KESKINTEPE, L., MARTINS JR., A.,  
533 SIRISATHIEN, S., BRACKETT, B., NIEMANN, H. Effects of culture system and protein  
534 supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. Human  
535 Reprod. 2001;16: 893-901.
- 536 [31] Gómez, E., Gutiérrez-Adán, A., Díez, C., Bermejo-Alvarez, P., Muñoz, M., Rodríguez, A.  
537 et al. Biological differences between *in vitro* produced bovine embryos and parthenotes.  
538 Reproduction 2009;137: 285-95.
- 539 [32] Mundim, T.C.D., Ramos, A.F., Sartori, R., Dode, M.A.N., Melo, E.O., Gomes, L.F.S.,  
540 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.  
542 2009;8: 1398-407.
- 543 [33] Kato, Y., Li, X., Amarnath, D., Ushizawa, K., Hashizume, K., Tokunaga, T., Taniguchi,  
544 M., Tsunoda, Y. Comparative gene expression analysis of bovine nuclear-transferred  
545 embryos with different developmental potential by cDNA microarray and real-Time PCR  
546 to determine genes that might reflect calf normality. Cloning Stem Cells 2007;9: 495-511.
- 547 [34] RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L., SHARBATI, J., SHARBATI, S., COX, J.F., EINSPANIER,  
548 R., CASTRO, F.O. Differential gene expression in bovine elongated (Day 17) embryos  
549 produced by somatic cell nucleus transfer and *in vitro* fertilization. Theriogenology  
550 2010;74: 45-59.
- 551 [35] Chawengsaksophak, K., Graaff, W., Rossant, J., Deschamps, J., Beck, F. Cdx2 is essential  
552 for axial elongation in mouse development. Develop. Bio 2004;101: 7641-5.
- 553 [36] Lazzari, G., Colleoni, S., Duchi, R., Galli, A., Houghton, F.D., Galli, C. Embryonic  
554 genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. Reproduction  
555 2011;141: 625-32.
- 556 [37] Hall, V.J., Ruddock, N.T., French, A.J. Expression profiling of genes crucial for placental  
557 and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro*, and nuclear transfer  
558 blastocysts. Mol. Reprod. and Develop. 2005;72: 16-24.