Produção *in vitro* de Embriões Bovinos Termotolerantes

Sheila Costa de Souza Marques¹, João Victor Gonçalves da Silva², Agostinho Jorge dos Reis Camargo³, Luiz Sergio de Almeida Camargo⁴, Clara Slade Oliveira⁵

¹Graduanda em Medicina Veterinária, UBM. Bolsista do CNPq. e-mail: sheilacs.marques@gmail.com. O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte da atividade: Identificação de marcadores moleculares de conforto térmico e estudo de estratégias para aumento do desempenho reprodutivo em gado de leite Girolando, MP2 02.14.08.003.00 liderado por Luiz Sergio de Almeida Camargo

² Graduando em Biomedicina, UGB. e-mail: joaobiofarmco@gmail.com

³ Pesquisador, Pesagro-Rio. e-mail: agostinhocamargo@yahoo.com.br

⁴ Pesquisador, Embrapa Gado de Leite. e-mail: luiz.camargo@embrapa.br

⁵ Orientadora. Analista, Embrapa Gado de Leite. e-mail: clara.oliveira@embrapa.br

Resumo: Considerando as mudanças climáticas e a elevação da temperatura, os índices reprodutivos em rebanhos bovinos de Países com clima tropical vem sofrendo reduções e conseqüentemente é possível observar queda de produtividade de sistemas leiteiros em diversos estados do Brasil. Os embriões bovinos são sensíveis ao estresse térmico, mas podem desenvolver mecanismos de defesa ativando proteínas (Hsp – *Heat Shock Proteins*). Em células, a termotolerância é induzida após estresse térmico não letal. Com o objetivo de tentar minimizar perdas embrionárias, desenvolvemos protocolo de produção de embriões termotolerantes, a partir do tratamento térmico de embriões Holandês-Gir (grupo TT), em temperatura de 38,5 a 40,5 °C durante 6 horas). Foram utilizados oócitos de doadoras F1 (1/2 Gir e 1/2 Holandês) coletados por aspiração folicular guiada por ultrassonografia, e fertilizados *in vitro* com sêmen de touro Holandês para a produção de embriões 3/4 Holandês. A análise estatística foi realizada por ANOVA ou Teste T, para comparação de médias, e Teste Exacto de Fisher, para comparação de taxas. No experimento 1, o momento de aplicação do TT foi determinado (96, 120 ou 144 h.p.i.). Definimos o momento 144 h.p.i para experimentos subsequentes. No experimento 2, avaliamos o grupo TT considerando número de células e apoptose. Nenhum efeito foi observado comparando-se ao grupo controle. No experimento 3, desafiamos os grupos com choque térmico no d7, simulando transferência de embriões em situações de estresse. Observamos aumento na sobrevivência dos embriões TT em relação ao grupo controle. Os resultados permitiram concluir que o protocolo desenvolvido não apresentou efeitos negativos para a produção e qualidade embrionária, e tornou os embriões mais resistentes a episódios subsequentes de estresse térmico.

Palavras-chave: Embrião, estresse térmico, fertilização *in vitro*, mudanças climáticas, termotolerância.

***In vitro* production of bovine thermotolerant embryos**

Abstract: Considering the climatic changes and the elevation of temperature, the reproductive performance in bovine herds from tropical climate countries have been reduced and consequently it is possible to observe a decrease in the productivity of dairy systems in several states of Brazil. The bovine embryos are sensitive to thermal stress, but can develop defense mechanisms activating proteins (Hsp - Heat Shock Proteins). In cells, thermotolerance is induced after non-lethal heat stress. In order to try to minimize embryonic losses, we developed a protocol for the production of thermotolerant embryos from the heat treatment of Holstein-Gyr embryos (TT group) at a temperature of 38.5 to 40.5 °C for 6 hours. Oocytes from F1 donors (1/2 Gyr and 1/2 Holstein) were collected by ultrasound - guided follicular aspiration and fertilized *in vitro* using Holstein bull semen for the production of 3/4 Holstein embryos. The statistical analysis was performed by ANOVA or T-Test, for comparison of means, and Fisher's Exact Test, for comparison of rates. In experiment 1, the timing of TT application was determined (96, 120 or 144 h.p.i.). We define the 144 h.p.i moment for subsequent experiments. In experiment 2, we evaluated the TT group considering number of cells and apoptosis. No effect was observed comparing to the control group. In experiment 3, we challenged the groups with heat shock in d7, simulating embryo transfer in stress situations. We observed an increased survival of the TT embryos in comparison to the control group. The results allowed to conclude that the protocol developed did not present negative effects for embryo production and quality, and made the embryos more resistant to subsequent episodes of thermal stress.

Keywords: Climate changes, embryo, *in vitro* fertilization, thermal stress, thermotolerance.

Introdução

Vacas em lactação apresentam maior metabolismo, e em períodos de altas temperaturas, o estresse térmico causa falhas nas funções reprodutivas. As perdas reprodutivas correspondem à disordem econômica que mais afeta o lucro dos produtores, com maior efeito quando ocorrem entre 30 e 60 dias após a concepção. O estresse térmico pode comprometer o sucesso das gestações durante períodos quentes, de estresse cumulativo, ou variações agudas no índice de temperatura e umidade (Santolaria et al., 2010).

Mamíferos apresentam mecanismos que permitem a regulação de sua temperatura corpórea, e esta condição é presente também no nível celular, e é afetada pela genética. A resposta a estímulos de estresse térmico ocorre pela apoptose, estresse oxidativo, ativação de proteínas HSP (“*heat shock protein*”) e biodisponibilidade de IGF (Hansen, 2014).

Mórulas submetidas ao choque térmico apresentam mudanças no transcriptoma, indicando que os embriões – tornam-se resistentes – adquirem termotolerância. As vias relacionadas à resistência envolvem mecanismos de prevenção do acúmulo de proteínas desnaturadas e radicais livres, e contribuem para a elucidação de porquê estádios iniciais (pré-ativação do genoma) são mais sensíveis do que estádios tardios do desenvolvimento embrionário (Sakatani et al., 2013).

Objetivou-se com o presente trabalho produzir embriões in vitro termotolerantes, que apresentassem maior taxa de sobrevivência após a transferência. Sendo assim, a taxa de morte embrionária diminuiria e conseqüentemente a taxa de gestação dos animais submetidos ao estresse térmico aumentaria significativamente.

Material e Métodos

Foram utilizados oócitos coletados de doadoras F1 (1/2 Gir e 1/2 Holandês) por aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU), fertilizados in vitro com sêmen sexado de touro Holandês para a produção de embriões 3/4 Holandês. A metodologia detalhada para produção in vitro de embriões está descrita em (Oliveira et al., 2019). Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela CEUA-EGL (protocolo 3956180316).

O tratamento térmico testado foi aplicado em uma mini estufa desenvolvida, na qual a temperatura oscila de 38,0 a 40,5 °C de uma em uma hora (aumento de 0,5 °C a cada 8 minutos aproximadamente). A mini estufa consiste em uma caixa plástica, preenchida com água destilada, e depositada sobre platina aquecedora a 45 °C. Dois criotubos foram alocados na caixa, em estaque laboratorial: um contendo os embriões em 150 ul de meio SOF e 150 ul de óleo mineral, vedado com atmosfera gasosa de 5% CO₂. O outro, contendo água, vedado com o sensor de temperatura. Quando a tampa da caixa é aberta, a temperatura cai dentro do criotubo, e quando a tampa da caixa é fechada, a temperatura sobe. Assim foi regulado manualmente o ciclo de choque térmico desejado, tratamento feito durante 6 horas somente no grupo tratado (controle permaneceu na estufa a 38,5 °C).

Primeiramente, foi realizado experimento para testar o protocolo de choque térmico suave desenvolvido, e determinar o momento que ele seria aplicado em experimentos posteriores (96, 120 ou 144 h.p.i., exp. 1). Foram realizadas duas repetições, e as taxas de blastocisto no d7 foram avaliadas, bem como o número de células e taxa de apoptose dos embriões. Após, foram realizadas três repetições com o grupo selecionado para análise da qualidade dos embriões (exp.2). Blastocistos d7 foram fixados em paraformaldeído 4% e corados com HOECHST e reação de imunofluorescência para Caspase-3, para estimar o percentual de células apoptóticas em cada embrião (metodologia descrita detalhadamente em Oliveira et al. 2016). No último experimento, com cinco repetições, foram avaliadas as taxas de blastocisto no d7, e a taxa de sobrevivência e eclosão após episódio de estresse térmico, para validar se o fenótipo da termotolerância adquirida estava presente (exp. 3). Após a avaliação das taxas de blastocistos no d7, os embriões dos dois grupos (controle e tratados com choque térmico) foram submetidos a um desafio de choque térmico. O protocolo utilizado foi de 2 horas a 40,5 °C. Os embriões foram alocados na estufa após o desafio, a 38,5 °C, e permaneceram em cultivo até o d8, quando taxas de blastocisto (d8) e eclosão foram avaliadas.

Os resultados foram analisados por ANOVA e tukey (média do número de células e média do index apoptótico, exp. 1), Teste T (média do número de células e média do index apoptótico, exp. 2), ou Teste exato de Fisher (taxas de blastocisto, sobrevivência e eclosão, exp. 1 e 3). O nível de significância de 5% foi adotado.

Resultados e Discussão

No experimento 1, a definição do momento ideal para aplicação do tratamento térmico, foram usados embriões fêmeas 3/4 Girolando (2 replicatas, 402 oócitos, 298 clivados (37-91 por grupo), 76

blastocistos (13-26 por grupo)). Não houve diferença na taxa de blastocistos produzidos entre os grupos TT96 hpi, TT120 hpi, TT144 hpi e Controle, no d7 (28,57%, 35,14%, 23,81%, 19,77%, respectivamente) ou d8 (34,04%, 40,54%, 37,21%, 34,35%, respectivamente). O TT não afetou o n. de células (C 70,5 ± 5,2, TT96 hpi 67,5 ± 3,8, TT120 hpi 57,8 ± 2,8, TT144 hpi 78,0 ± 4,3, média±EP) nem o index apoptótico médio (C 6,5 ± 1,0, TT96 hpi 7,4 ± 1,1, TT120 hpi 7,1 ± 1, TT144 hpi 4,5 ± 0,8, média ± EP) em blastocistos em nenhum dos grupos. O TT144 hpi foi definido para os experimentos posteriores, por ser aplicado mais próximo à transferência e possivelmente possibilitar efeitos mais prolongados após a transferência do embrião para receptora.

No experimento 2, foi estimado o efeito do TT144 hpi no número de células e apoptose. Foram utilizados embriões fêmea 3/4 Girolando (3 repetições, 66 blastocistos 33-30 por grupo). O TT não afetou o número de células (C 86,4, TT 88,4) nem o index apoptótico (C 6,7, TT 6,6), confirmando com maior representatividade o observado no experimento 1. O tratamento térmico desenvolvido mostrou-se seguro para os embriões, não afetando a qualidade embrionária.

No experimento 3, foi avaliada a resposta dos grupos controle e TT a desafio de choque térmico, aplicado no d7, foram utilizados embriões 3/4 Girolando, obtidos em 5 repetições (941 oócitos, 815 clivados, 371 mórulas (173-198), 263 blastocistos (124-139)).

Antes de aplicar o choque térmico, no d7, foi analisada a taxa de blastocistos obtidos sobre mórulas, contabilizadas no d6 antes do tratamento térmico. Não houve diferença entre os grupos (C 71,7, TT 70,2).

Após aplicação do choque térmico e cultivo por 24h em estufa a 38,5 °C, foi analisada a taxa de sobrevivência, no d8. O TT prévio aumentou ($p < 0.05$) a taxa de sobrevivência de blastocistos ao choque térmico (C 71,4, TT 86,6), sugerindo benefícios do protocolo desenvolvido para embriões que serão submetidos ao estresse térmico.

Conclusões

Conclui-se que indução de mecanismos de defesa do embrião pode ser importante para a maior taxa de sobrevivência embrionária. O tratamento aplicado induziu termotolerância nos embriões, que suportaram melhor o choque térmico quando haviam sido tratados antes.

Agradecimentos

Embrapa Gado de Leite, FAPEMIG, Clara Slade Oliveira, Equipe CESM.

Referências

HANSEN, P. J. Genetic variation in resistance of the preimplantation bovine embryo to heat shock. *Reprod Fertil Dev*, v. 27, n. 1, p. 22-30, Dec 2014. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25472041> >.

OLIVEIRA, C. S. et al. Cell death is involved in sexual dimorphism during preimplantation development. *Mech Dev*, v. 139, p. 42-50, Feb 2016. ISSN 1872-6356. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26752320> >.

SAKATANI, M. et al. Changes in the transcriptome of morula-stage bovine embryos caused by heat shock: relationship to developmental acquisition of thermotolerance. *Reprod Biol Endocrinol*, v. 11, p. 3, 2013. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23320502> >

SANTOLARIA, P. et al. Effects of cumulative stressful and acute variation episodes of farm climate conditions on late embryo/early fetal loss in high producing dairy cows. *Int J. Biometeorol*, v. 54, n.1, p.93-8, Jan. 2010. ISSN 1432-1254. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707796>>.