

EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS HSP70.1 E BAX EM EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM SORO FETAL BOVINO OU KNOCKOUT™SR

Serapião, R.V.^{1,4}; Vireque, A.A.²; Ferreira, E.-M.²; Pereira, M.M.¹; Polisseni, J.^{1,3}; Guimarães, M.F.M.¹; Iguma, L.T.¹; Camargo, L.S.A.¹; Viana, J.H.M.¹; Sá, W.F.¹; Fonseca, F.A.⁴

¹Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora - MG; ²Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto - SP; ³Universidade Federal de Juiz de Fora – Juiz de Fora - MG ; ⁴Universidade Estadual do Norte Fluminense – Campos dos Goytacazes - RJ; Brasil; rserapis@yahoo.com.br

A exposição de embriões ao soro fetal bovino (SFB) durante o cultivo *in vitro* pode afetar a morfologia, o metabolismo e a expressão de transcritos específicos. Por outro lado, meios livres de soro parecem minimizar os efeitos causados pelo SFB. O Knockout™ SR (Gibco Labs., Grand Island, NY) é um substituto do soro otimizado para manter células tronco em cultivo e que também pode ser usado como substituto do soro no cultivo de embriões bovinos fertilizados *in vitro*. A expressão de genes associados a resposta ao estresse e apoptose, como a proteína do choque térmico (HSP70.1) e a proteína reguladora de apoptose em *Bos taurus* (BAX), podem ser afetadas pelas condições de cultivo *in vitro*, sendo induzidas por uma variedade de agentes estressores, incluindo os componentes dos meios de cultivo. Este estudo teve como objetivo determinar se o Knockout™ SR ou o SFB alteram a abundância relativa dos transcritos HSP70.1 e BAX em embriões bovinos fertilizados *in vitro*. CCOs obtidos de ovários de matadouro foram maturados e fertilizados *in vitro*. Os possíveis zigotos foram cultivados aleatoriamente com suas células do cumulus em meio CR2aa suplementado com 10% de soro fetal bovino (grupo SFB); 10% de Knockout™ SR (grupo KSR), ou 3 mg/mL polivinil álcool (grupo PVA). Todas as etapas foram realizadas a 38,5°C, em 5% CO₂ em ar e 95% de umidade. Blastocistos de 8 dias pós-fertilização foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e subsequentemente descongelados para extração de RNA. A extração total de RNA foi realizada utilizando o Micro Kit Rneasy (Qiagen, Valencia, CA, USA) e a síntese da primeira fita foi obtida com o Kit Superscript™ III First Strand Synthesis (Invitrogen, Chicago, IL, USA). A quantificação relativa foi realizada em duplicata utilizando o PCR Real Time (ABI Prism 7000 Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) sendo a mistura da reação composta de iTaq™ SYBR Green Supermix, ROX (Bio-Rad, Waltham, MA, USA), cDNA equivalente a 0,8 embriões e primers específicos para cada gene. A expressão do gene H2A foi utilizada como referência endógena. O cálculo da quantificação relativa foi realizado pelo método comparativo Ct, utilizando como calibrador o valor do grupo PVA, e os valores comparados pela análise de variância. Não houve diferença ($P > 0,05$) na expressão dos níveis de HSP70.1 ($5,42 \pm 0,80$ e $3,46 \pm 1,62$) e BAX ($2,08 \pm 1,14$ e $0,92 \pm 0,15$) para os grupos SFB e KSR, respectivamente. Estes dados mostram que embriões cultivados em meio suplementado com KSR apresentam o mesmo padrão de expressão para o HSP70.1 e o BAX, sugerindo que embriões de ambos os grupos estão sob as mesmas condições de estresse e apoptose. Apoio Financeiro: FAPEMIG e CNPq. Agradecimentos: Embrapa Gado de Leite, UENF, Laboratório Agrogenética

EXPRESSION OF HSP70.1 AND BAX TRANSCRIPTS IN BOVINE EMBRYOS CULTURED IN MEDIUM SUPPLEMENTED WITH FETAL CALF SERUM OR KNOCKOUT™ SR

The exposure of embryos to fetal calf serum (FCS) during *in vitro* culture can affect morphology, metabolism and expression of specific transcripts. On the other hand, serum-free medium seems to avoid some of those FCS effects. Knockout™ SR (Gibco Labs., Grand Island, NY) is a serum replacer optimized to support stem cells in culture and can also be used to replace serum during culture of *in vitro* fertilized bovine embryos. The expression of genes associated to stress response and apoptosis, such as heat shock proteins (HSP70.1) and *Bos taurus* apoptosis regulator (BAX), can be affected by *in vitro* culture conditions, being induced by a variety of stress agents, including culture medium components. This study aimed to determine whether Knockout™ SR or FCS in culture medium alters the relative abundance of HSP70.1 and BAX transcripts *in vitro*-fertilized bovine embryos. COCs obtained from slaughterhouse ovaries were *in vitro* matured and fertilized. Presumptive zygotes were randomly cultured with their own cumulus cells in CR2aa medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS group); 10% Knockout™ SR (KSR group), or 3 mg/mL polyvinyl alcohol (PVA group). All steps were performed at 38.5°C, under 5% CO₂ in air and 95% humidity. Blastocysts on day 8 post-fertilization were rapidly frozen in liquid nitrogen and subsequently thawed for RNA extraction. Total RNA extraction was performed using Rneasy Micro kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and first strand synthesized using Superscript™ III First Strand Synthesis kit (Invitrogen, Chicago, IL, USA). Relative quantification was performed in duplicate using Real Time PCR (ABI Prism 7000 Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) and reactions consisted of a mixture of iTaq™ SYBR Green Supermix with ROX (Bio-Rad, Waltham, MA, USA) with cDNA equivalent to 0.8 embryos and gene specific primers. Expression of H2A gene was used as endogenous reference. Calculations of relative quantification were performed by Comparative Ct method, using the value found in PVA group as calibrator, and the values compared by analysis of variance. There was no difference ($P > 0.05$) on expression of HSP70.1 (5.42 ± 0.80 and 3.46 ± 1.62) and BAX (2.08 ± 1.14 and 0.92 ± 0.15) between FCS and KSR groups, respectively. This data shows that bovine embryos cultured in medium supplemented with KSR has the same HSP70-1 and BAX expression pattern as those in medium added with FCS, suggesting that embryos in both groups are under the same stress and apoptosis conditions. Financial Support: FAPEMIG and CNPq. Thanks to Embrapa Gado de Leite, UENF and Agrogenética Laboratory.