



RENORBIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EFEITO DO CHOQUE TÉRMICO E DA INIBIÇÃO DA HSP90
DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS
SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

ELIZA DINIZ DE SOUZA

VITÓRIA-ES

2017

ELIZA DINIZ DE SOUZA

**EFEITO DO CHOQUE TÉRMICO E DA INIBIÇÃO DA HSP90
DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS
SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iuri Drumond Louro

Co-orientador: Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

VITÓRIA-ES

2017

|

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas” (Carl Sagan)

ELIZA DINIZ DE SOUZA

**EFEITO DO CHOQUE TÉRMICO E DA INIBIÇÃO DA HSP90
DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS
SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Iuri Drumond Louro
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a Flávia de Paula
(Membro Interno - RENORBIO-UFES)

Prof. Dr. Marco César C. Guimarães
(Membro Interno - RENORBIO-UFES)

Dr.Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista
(Membro Externo - EMBRAPA GADO DE LEITE)

Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo
(Membro Externo - EMBRAPA GADO DE LEITE)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar até aqui e vencer mais uma etapa,

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia RENORBIO – Rede Nordeste de Biotecnologia, à Universidade Federal do Espírito Santo, à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo, CNPq e FAPEMIG, pela oportunidade de realização deste doutorado, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento dos experimentos,

Ao meu co-orientador Doutor Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pelos ensinamentos, disponibilidade e oportunidade de desenvolvimento do experimento junto à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Leite),

Ao meu orientador Professor Doutor Iuri Drumond Louro, pela orientação e pela boa vontade em ajudar sempre na resolução dos problemas surgidos durante esses anos,

Aos amigos que fiz durante todos esses anos no Laboratório de Reprodução Animal, em especial aos nossos grupos de WhatsApp **“Tuplaftchuplaft”**, **“Porque eu não sou obrigada(o)”** e **“Os melhores da Reprodução”**, pela troca de conhecimento, pela ajuda nos experimentos e nas trocas de cultivo pelas madrugadas, pelas nossas confraternizações e momentos inesquecíveis juntos,

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, pela disponibilidade, ajuda em cada análise e pelos momentos de descontração,

À minha família, por estar ao meu lado principalmente nos momentos difíceis,

Àqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

O estresse térmico tem sido um grande problema em sistemas de produção de bovinos. Tem-se sugerido que a HSP90, uma proteína chaperona citoprotetora, possui papel também na manutenção da integridade do genoma, no entanto, seu papel durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário é muito escasso. Este trabalho foi dividido em três experimentos. No primeiro experimento foi avaliado o potencial de desenvolvimento e a apoptose em embriões bovinos, adicionalmente, a abundância de transcritos *c-MOS*, *MAPK*, *MATER*, *ZAR*, *GDF9*, *HSP901A* e *HSP70.1* e progressão da meiose em oócitos submetidos à diferentes doses (0, 1 e 2 μ M) e tempo de exposição (12 e 24h) de 17AAG durante a maturação *in vitro*. No segundo experimento foi avaliado o potencial de desenvolvimento de oócitos bovinos e a apoptose em blastocistos submetidos ao choque térmico e a concentração de 2 μ M de 17AAG por 12h. Ainda foi avaliado o efeito do choque térmico sobre a heterocromatina de embriões nos estágios iniciais do desenvolvimento. O terceiro experimento avaliou o potencial de desenvolvimento de oócitos expostos a 2 μ M 17AAG, ao choque térmico e a interação entre eles, bem como o padrão da expressão gênica em embriões de 8 células para os genes *HSF1*, *HSF2*, *HSP901A*, *HSP40*, *OCT4*. Observou-se no primeiro experimento que 2 μ M do inibidor de HSP90 durante a maturação *in vitro* prejudica o desenvolvimento embrionário posterior à fecundação. O gene da *HSP70.1* foi sub-expresso ($p < 0,05$) quando os oócitos foram cultivados com 1 μ M de 17AAG por 12 h em relação ao controle. Oócitos expostos a 2 μ M por 12h mostraram menor ($p < 0,05$) quantidade de transcritos do gene *GDF9* e uma maior quantidade do *HSF1* em relação ao grupo controle. Para o tratamento com 1 μ M por 24 h houve redução ($p < 0,05$) na quantidade de transcritos de *ZAR1* e *HSP70.1* e aumento ($p < 0,05$) na abundância dos transcritos do gene do *HSF1* e redução de *HSP70.1* quando oócitos foram expostos ao 17AAG por 24h. Não houve diferença ($p > 0,05$) na porcentagem de oócitos em metafase II quando os oócitos foram analisados pelo Hoechst entre grupos tratados e controle. Os blastocistos expostos ao 17AAG apresentaram maior índice apoptótico ($p < 0,05$) e menor número de células ($p < 0,05$) quando os oócitos

foram expostos por 24 h comparado a 12 h. Houve redução da produção de embriões e aumento da apoptose embrionária quando os oócitos foram expostos ao choque térmico por 12 h durante a maturação *in vitro*. A estrutura da cromatina em embriões gerados de oócitos estressados termicamente foi alterada, apresentando uma formação de heterocromatina mais precoce, em estágios de 4 células, do que em embriões do grupo controle. No terceiro experimento, foi observada uma redução ainda maior no desenvolvimento embrionário para o tratamento CT+17AAG, além de redução ($p<0,05$) na quantidade de transcritos da HSP40 quando o grupo CT e o CT+17AAG foram comparados ao grupo controle. Quando o grupo CT+17AAG foi comparado ao CT, houve um aumento ($p<0,02$) na expressão de *HSP90A1*. Conclui-se que a HSP90 é uma proteína importante para a competência do oócito bovino e a inibição da HSP90 na maturação *in vitro*, interfere na abundância relativa de transcritos em oócito e embriões, aumenta a apoptose embrionária e altera a estrutura da cromatina de embriões em estágio inicial de desenvolvimento.

Palavras-chave: HSP90, choque térmico, 17AAG, apoptose, bovino

ABSTRACT

Heat stress has been a major problem in cattle production systems, causing considerable economic losses. It has been suggested that HSP90, a cytoprotective chaperone protein, also has role in the maintenance of genome integrity, however, its role during embryonic development and oocyte maturation is very insufficient. This study was divided in three experiments. First experiment evaluated developmental potential and apoptosis in bovine embryos, additionally, abundance of *c-MOS*, *MAPK1*, *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *HSP90A1* and *HSP70.1* transcripts and nuclear maturation progress in oocytes submitted to HSP90 inhibition induced by 17AAG during *in vitro* maturation. The second experiment, evaluated developmental potential bovine oocytes subjected to heat shock and 17AAG and apoptosis in blastocysts. Also, heat shock effects on embryonic chromatin during early developmental. Third experiment observed developmental potential bovine oocytes that were exposed to 17AAG, heat shock and interaction between two treatments and expression pattern in 8-cell embryos to *HSF1*, *HSF2*, *HSP90*, *HSP40* and *OCT4* genes. We observed in the first experiment 2 μ M 17AAG during *in vitro* maturation affected embryonic development after *in vitro* fertilization. *HSP70.1* gene was down-regulated ($p < 0.05$) when oocytes were cultured with 1 μ M 17AAG for 12h group in comparison to control. Oocytes exposed to 2 μ M for 12 h exhibited lower amount ($p < 0.05$) of *GDF9* transcripts and a higher amount of *HSF1* transcripts then control group. A lower abundance of *ZAR1* and *HSP70.1* transcripts and higher abundance ($p < 0.05$) of *HSF1* was observed in 1 μ M 17AAG for 24 h group ($p < 0.05$) displayed. In addition, there was a lower amount of *HSP70.1* transcripts when the oocytes were exposed to 2 μ M 17AAG for 24 h. There was no difference ($p > 0.05$) in the percentage of oocytes in metaphase II between treated oocytes and control groups when analyzed by Hoechst assay. Higher apoptotic index ($p < 0.05$) and lower number of cells ($p < 0.05$) were observed in embryos produced from oocytes exposed to 17AAG for 24 h, when compared to 12h and increased embryonic apoptosis when oocytes were exposed to heat shock for 12 h during *in vitro* maturation. The chromatin structure of embryos generated from oocytes thermally stressed was altered, provided a

heterochromatin formation earlier in 4 cells stage than embryos control group. In the third experiment, an even greater reduction in embryonic development was observed in CT+17AAG group, as well as a reduction ($p<0.05$) in the number of HSP40 transcripts when the CT and CT+17AAG groups were compared to the control group. When CT+17AAG group was compared to CT, there was increase ($p<0.02$) in HSP90A1 expression. In conclusion, HSP90 is an important protein for bovine oocyte competence and HSP90 inhibition during *in vitro* maturation interferes with relative abundance of transcripts in oocyte and embryos reduce embryo development and increases embryonic apoptosis and alter embryo chromatin structure in early development stages.

Key-words: HSP90, Heat shock, 17AAG, apoptosis, bovine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases do desenvolvimento embrionário.....	22
Figura2. Modelo de regulação do HSF1.....	34
Figura 3. Ciclo <i>in vivo</i> da proteína de choque térmico 90 KDa (HSP90).....	36
Figura 4: Morfologia dos oócitos maturados <i>in vitro</i> por 24 h, distribuídos aleatoriamente em 6 tratamentos conforme a concentração do 17AAG e o tempo de exposição. A, B, C = 0, 1 e 2 μ M de 17AAG, respectivamente, submetidos à 12h de exposição ao inibidor; D, E, F= 0, 1 e 2 μ M de 17AAG, respectivamente, submetidos a 24 h de exposição ao inibidor.....	52
Figura 5: Imagem de embrião bovino oriundo de oócito submetido ao tratamento com 17AAG durante a maturação <i>in vitro</i> mostrando a detecção da fragmentação do DNA foi pela técnica de TUNEL sob aumento de 400x. A) Blastocisto marcando blastômeros pelo DAPI e visualizados em azul no filtro 460 nm. B) Blastocisto apresentando blastômeros sendo visualizados em verde corados pela fluoresceína no filtro 520 nm, indicando apoptose.....	54
Figura 6: Efeito de diferentes concentrações de 17AAG (A) e tempos de exposição (B) na maturação <i>in vitro</i> de oócitos no índice apoptótico de blastocistos no 8º dia de cultivo. Valores com diferentes letras sobrescritas diferem entre os tratamentos ($p<0,05$).....	54
Figura 7: Efeito de diferentes concentrações de 17AAG (A) e tempos de exposição (B) na maturação <i>in vitro</i> de oócitos no número total de células e de células apoptóticas e de blastocistos no 8º dia de cultivo. Valores com diferentes letras sobrescritas diferem entre os tratamentos ($p<0,05$).....	55
Figura 8: Avaliação da abundância dos transcritos <i>c-MOS</i> , <i>MAPK1</i> , <i>MATER</i> , <i>ZAR1</i> , <i>GDF9</i> , <i>HSF1</i> , <i>HSP70.1</i> e <i>HSP90A1</i> em oócitos maturados <i>in vitro</i> por	

24h, submetidos às concentrações de 0, 1 e 2 μ M durante 12 h de exposição. A presença de (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$).....56

Figura 9: Avaliação da abundância dos transcritos *c-MOS*, *MAPK1*, *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *HSF1*, *HSP70.1* e *HSP90A1* em oócitos maturados *in vitro* por 24h, submetidos às concentrações de 0,1 e 2 μ M durante 24 h de exposição. A presença de (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$)..... 57

Figura 10: Curvas de dissociação dos genes endógenos, *YWHAZ*, *GAPDH* e β -*ACTINA*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 77,9°C; 81,6°C e 82,8°C, respectivamente... 58

Figura 11: Curvas de dissociação dos genes *c-MOS*, *MAPK1* e *MATER*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 86,2°C; 82,3°C e 82,2°C, respectivamente... 59

Figura 12: Curvas de dissociação dos genes *ZAR1*, *GDF9* e *HSF1*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 80,7°C; 82,3°C e 85,6°C, respectivamente..... 60

Figura 13: Curvas de dissociação dos genes *HSP90A1* e *HSP70.1*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 82,2°C e 84,1°C, respectivamente..... 61

Figura 14: Fases da maturação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342 submetidos ao 17AAG durante a maturação *in vitro* e avaliados sob microscopia de fluorescência por DAPI e visualizados sob aumento de 400x no filtro de 460 nm em azul. A) Oócito em metáfase I; B) Oócito em metáfase II.....62

Figura 15: Efeito da exposição ao 17AAG por 12 ou 24 h e ao choque térmico (CT) por 12 h durante a maturação *in vitro* no índice apoptótico de oócitos de blastocistos no 8º dia de cultivo. Valores com diferentes letras sobrescritas diferem entre os tratamentos ($p < 0,05$)..... 64

Figura 16: Efeito da exposição ao 17AAG por 12 ou 24 h e ao choque térmico (CT) por 12 h durante a maturação *in vitro* de oócitos no número total de células e de células apoptóticas de blastocistos no 8º dia de cultivo. Valores com diferentes letras sobrescritas diferem entre os tratamentos ($p < 0,05$)..... 64

Figura 17: Padrão de distribuição de trimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9Me3) em núcleos de embriões provenientes de oócitos controle e expostos ao choque térmico por 12h. N= número de embriões analisados em microscopia confocal. Eixo Y= porcentagem de núcleos.....65

Figura 18: Padrão de distribuição da proteína de heterocromatina 1 (P1) em núcleos de embriões provenientes de oócitos controle e expostos ao choque térmico por 12h. N= número de embriões analisados em microscopia confocal. Eixo Y= porcentagem de núcleos.....66

Figura 19: Avaliação da abundância dos transcritos para *HSF1*, *HSF2*, *HSP90A1*, *HSP40* e *OCT4* em embriões de 8 células provenientes de oócitos maturados *in vitro* por 24 h, submetidos ao 17AAG por 12 h (17AAG), ao choque térmico por 12 h (CT) e ao 17AAG durante choque térmico (CT+17AAG). A presença de (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$)..... 68

Figura 20: Avaliação da abundância dos transcritos para *HSF1*, *HSF2*, *HSP90A1*, *HSP40* e *OCT4* em embriões de 8 células provenientes de oócitos maturados *in vitro* por 24 h, submetidos ao 17AAG por 12 h e ao 17AAG associado ao choque térmico por 12 h (CT+17AAG) em relação ao choque térmico (CT) por 12 h. A presença de (*) indica diferença significativa ($p < 0,02$)..... 69

Figura 21: Curva de dissociação dos genes endógenos, *YWHAZ*, *GAPDH* e β -*ACTINA*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 78,27°C; 81,8°C e 83,55°C, respectivamente..... 70

|

Figura 22: Curva de dissociação dos genes *HSF1*, *HSF2* e *HSP90A1*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 86,1°C; 77,93 e 82,0°C, respectivamente..... 71

Figura 23: Curva de dissociação dos genes *HSP40* e *OCT4* resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 83,22°C e 82,8°C, respectivamente..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantificação de oócitos bovinos realizada com 1 µL do RNAm e do cDNA obtida após a extração e a transcrição reversa para cada tratamento e repetição..... 47

Tabela 2: Quantificação dos embriões bovinos de 8 células realizada com 1 µL do RNAm e do cDNA obtida após a extração e a transcrição reversa para cada tratamento e repetição..... 47

Tabela 3: Sequências de *primers* específicos utilizados na análise da expressão gênica de oócitos e embriões bovinos submetidos ao 17AAG e ao choque térmico..... 48

Tabela 4: Taxas de clivagem e de produção de embriões bovinos nos dias 7 (BLD7) e 8 (BLD8) expostos a diferentes concentrações de 17AAG durante a maturação oocitária. Valores com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna diferem ($p < 0,05$). Valores são mostrados como média \pm epm..... 53

Tabela 5: Taxas de clivagem e de produção de embriões bovinos nos dias 7 (BLD7) e 8 (BLD8) expostos ao 17AAG durante a maturação oocitária em diferentes tempos de exposição. Não houve diferença ($p > 0,05$). Valores são mostrados como média \pm epm..... 53

Tabela 6: Avaliação da maturação de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342 submetidos às doses 0, 1 ou 2 µM do inibidor 17AAG por 12 ou 24h de exposição e avaliados sob microscopia de fluorescência. Não houve diferença ($p > 0,05$). Valores são mostrados como média \pm epm.....62

Tabela 7: Taxas de clivagem e de produção de embriões bovinos nos dias 7 (BLD7) e 8 (BLD8) expostos a 2 µM de 17AAG por 12 h (17AAG/12h) ou por 24 h (17AAG/24h) e ao choque térmico (CT) por 12 h durante a maturação *in vitro*. Valores com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna diferem ($P < 0,05$). Valores são mostrados como média \pm epm 63

Tabela 8: Taxas de clivagem e de produção de embriões bovinos nos dias 7 (BLD7) e 8 (BLD8) para os tratamentos Controle, 2 µM de 17AAG com 12 h de exposição, CT (Choque Térmico) por 12 h e 2 µM de 17AAG + CT por 12 h, durante a maturação *in vitro*..... 67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

17AAG – *17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin*

ACTB – beta actina

ADP (*Adenosine Diphosphate*) – Difosfato de Adenosina

ATP (*Adenosine Triphosphate*) – Trifosfato de Adenosina

CCOs – Complexos Cumulus-Oócito

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CIV – Cultivo *in vitro*

c-MOS – *Murine sarcoma viral proto-oncogene homolog*

CV – Coeficiente de Variação

DAPI – *4'6-diamidino-2-phenylindole*

DBD – domínio ligado ao DNA

DNA (*Deoxyribonucleic acid*) – Ácido desoxirribonucleico

EPM – Erro padrão da média

FIV – Fecundação *in vitro*

FSH (*Follicular Stimulating Hormone*) – Hormônio Folículo Estimulante

GAPDH – *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GDF9 – *Growth Differentiation Factor 9*

GVBD (*Germinal Vesicle Breakdown*) – quebra da vesícula germinativa

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

H3K9Me3– trimetilação da lisina 9 da histona H3

HP1 (*Heterochromatin protein 1*) – Proteína 1 de heterocromatina

HSE (*Heat Shock Element*) – Elemento de Resposta ao Choque Térmico

HSF (*Heat Shock Factor*) – Fator de Transcrição do Choque Térmico

HSF1 (*Heat Shock Factor 1*) – Fator de Transcrição do Choque Térmico 1

HSF2 (*Heat Shock Factor 2*) – Fator de Transcrição do Choque Térmico 2

HSP (*Heat Shock Protein*) – Proteína do Choque Térmico

HSP40 (*Heat Shock Protein 40 KDa*) – Proteína do Choque Térmico de 40 KDa

HSP60 (*Heat Shock Protein 60 KDa*) – Proteína do Choque Térmico de 60 KDa

HSP70 (*Heat Shock Protein 70 KDa*) – Proteína do Choque Térmico de 70 KDa

HSP70.1 (*Heat Shock 70kDa Protein 1*) - Proteína do Choque Térmico de 70 KDa membro 1

HSP90 (*Heat Shock Protein 90 KDa*) - Proteína do Choque Térmico de 90 KDa

HSP90A1 (*Heat Shock Protein 90 KDa class A member 1*) - Proteína do Choque Térmico de 90 KDa classe A membro 1

HSP100 (*Heat Shock Protein 100 KDa*) – Proteína do Choque Térmico de 100 KDa

IGF-I – *Insulin-Like Growth Factor I* – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I

LH (*Luteinizing Hormone*) – Hormônio Luteinizante

MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) – Proteína quinase ativada por mitógeno

MATER – *Maternal Antigen that Embryos Require*

mg – miligrama

MI – Meiose I

MII – Meiose II

MIV – Maturação *in vitro*

MI – Meiose I

mm – milímetros

μL – microlitro

μM – micromolar

nm – nanograma

P4 – Progesterona

P450 – Citocromo P450

PBS (*Phosphate-buffered saline*) – Tampão fosfato salino

PCR (*Polymerase chain reaction*) – Reação em cadeia de polimerase

PVA (*Polyvinyl alcohol*) – Álcool polivinílico

REST – *Relative expression software tool*

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

ROS (*Reactive Oxygen Species*) – Espécies Reativas de Oxigênio

SFB – Soro Fetal Bovino

TALP – *Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate*

TCM199 – *Tissue Culture Medium 199* (meio de cultura de tecidos)

TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

YWHAZ – *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta*

ZAR1 – *Zygote Arrest*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. DESENVOLVIMENTO DO OÓCITO IMATURO AO EMBRIÃO.....	22
2.1.1. Maturação oocitária.....	23
2.1.2. Genes relacionados à maturação do oócito e ao desenvolvimento embrionário.....	24
2.2. ESTRESSE TÉRMICO.....	28
2.2.1. Efeito do estresse térmico nas células foliculares.....	29
2.2.2. Efeito do estresse térmico no oócito.....	31
2.3. PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO (HSPs).....	32
2.4. EPIGENÉTICA E O PAPEL DA HSP90 DURANTE O ESTRESSE AMBIENTAL.....	37
3. HIPÓTESES.....	39
4. OBJETIVOS.....	40
4.1. OBJETIVO GERAL.....	40
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
5. METODOLOGIA.....	41
5.1. LOCALIZAÇÃO.....	41
5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
5.2.1. Experimento 1.....	41
5.2.2. Experimento 2.....	41
5.2.3. Experimento 3.....	42
5.3. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS.....	43
5.3.1. Obtenção e maturação <i>in vitro</i> (MIV) dos oócitos.....	43
5.3.2. Choque térmico em oócitos.....	44
5.3.3. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	44
5.3.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	45
5.3.5. Avaliação do índice apoptótico.....	45
5.3.6. Análise quantitativa da expressão gênica em oócitos e embriões.....	46
5.3.7. Análise da progressão da meiose.....	49
5.3.8. Análise da organização da cromatina.....	49

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
6. RESULTADOS.....	51
6.1. EXPERIMENTO 1.....	51
6.1.1. Determinação do tempo de incubação e a dose de inibidor de HSP90 (17AAG) necessários para afetar o desenvolvimento embrionário.....	51
6.1.2. Avaliação do índice apoptótico em blastocistos com 192h pós-fecundação.....	53
6.1.3. Avaliação da expressão gênica em oócitos tratados durante a maturação <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de 17AAG (0, 1 e 2 μ M) por 12h de exposição.....	55
6.1.4. Avaliação da expressão gênica em oócitos tratados durante a maturação <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de 17AAG (0, 1 e 2 μ M) por 24 h de exposição.....	56
6.1.5. Curvas de dissociação dos genes analisados.....	57
6.1.6. Análise da progressão da meiose.....	61
6.2. EXPERIMENTO 2.....	62
6.2.1. Avaliação do efeito do choque térmico e da inibição da atividade da HSP90 na produção de embriões.....	62
6.2.2. Avaliação do índice apoptótico e número de células de blastocistos no D8 pós fecundação <i>in vitro</i>	63
6.2.3. Efeito do choque térmico no remodelamento da cromatina de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento.....	65
6.3. EXPERIMENTO 3.....	66
6.3.1. Avaliação das taxas de clivagem e da produção de embriões a partir de oócitos submetidos ao 17AAG, ao choque térmico e ao 17AAG durante o choque térmico	66
6.3.2. Avaliação da expressão gênica em embriões de 8 células a partir de oócitos tratados durante a maturação <i>in vitro</i> com inibidor 17AAG, choque térmico e 17AAG durante o choque térmico.....	67
6.3.3. Curvas de dissociação dos genes analisados.....	69
7. DISCUSSÃO.....	73
8. CONCLUSÕES.....	80

|

9. REFERÊNCIAS.....	81
----------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais efeitos da elevação da temperatura é a redução da eficiência reprodutiva em animais domésticos, resultando em menor produtividade e consideráveis perdas econômicas (COLLIER; DAHL e VanBAALE, 2006). O estresse térmico causado por altas temperaturas reflete em uma queda de aproximadamente 25% nas taxas de concepção, aumento do intervalo entre partos e redução da produção animal (HANSEN, 2007; PAVANI et al., 2015), perdas que podem ser acentuadas com a previsão de aquecimento global (PORTER et al., 2014).

Segundo estudos *in vivo* e *in vitro*, os oócitos bovinos são susceptíveis ao estresse térmico. As desordens na fisiologia do oócito durante o período de desenvolvimento folicular pode levar a uma redução na competência deste gameta, interferindo na fecundação e subsequente desenvolvimento, com aumento da proporção de embriões tardios e anormais (PUTNEY et al., 1989; EALY et al., 1993). O estresse térmico pode afetar as propriedades físicas e bioquímicas das membranas celulares (ZERON et al., 2001), induzir apoptose (ROTH e HANSEN, 2005), bem como ocasionar alterações ultra-estruturais celulares (RIVERA e HANSEN, 2001), na estrutura da zona pelúcida e nos padrões de microvilos no oolema (JU et al., 1999).

Os mecanismos celulares envolvidos na resposta ao estresse alteram o perfil de expressão gênica nas células submetidas ao estresse (PAULA-LOPES et al., 2003). Em células de mamíferos, além de genes para proteínas de choque térmico (HSPs), outros genes associados à apoptose, diferenciação e divisão celular podem ser afetados pelo estresse térmico (SONNA et al., 2002). Tais respostas podem estar associadas a mecanismos adaptativos celulares, causados por modificações epigenéticas, uma vez que a epigenética é peça importante para adaptação de um organismo a mudanças ambientais (IMHOF, 2006; BELDADE et al., 2011).

HSPs são chaperonas altamente conservadas entre espécies e estão envolvidas em várias funções citoprotetoras como: o enovelamento de proteínas e sua compartimentalização intracelular, a manutenção da conformação estrutural de proteínas, a reconstituição do enovelamento errôneo de proteínas, a translocação de proteínas através de membranas e a

degradação de proteínas instáveis (KREGEL, 2002). A HSP90 é uma das proteínas mais abundantes nas células eucariontes (RICHTER e BUCHNER, 2001; SREEDHAR et al., 2004a). Uma função da HSP90 é a manutenção da integridade do genoma (MITTELMAN e WILSON, 2010), funcionando como um tampão contra alterações morfológicas induzidas genética e epigeneticamente (RUTHERFORD e LINDQUIST, 1998; RUDEN et al., 2005).

A redução da atividade da HSP90 pelo agente inibidor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) em oócitos de camundongos durante a maturação causa alterações na maturação meiótica como bloqueio parcial da quebra da vesícula germinativa (METCHAT et al., 2009). Isso sugere que a HSP90 é necessária para sustentar a atividade da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Em camundongos, o gene pró-oncogênico c-MOS, responsável por desencadear a cascata de MAPK também requer a ação da HSP90 (FISHER; MANDART; DORÉE, 2000).

Em bovinos ainda não se conhece o papel da HSP90 no processo de maturação do oócito e se este pode ser influenciado pelo estresse térmico. O conhecimento das alterações causadas pelo estresse no oócito e no desenvolvimento embrionário inicial ainda é restrito. O entendimento da participação da HSP90 nos processos de maturação do oócito desafiado por altas temperaturas podem colaborar no desenvolvimento de ações que contribuam para mitigar os efeitos maléficos do estresse térmico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DESENVOLVIMENTO DO OÓCITO IMATURO AO EMBRIÃO

O ovário dos mamíferos apresenta, além de uma grande reserva de células germinativas inativas presentes nos folículos primordiais, oócitos em crescimento e oócitos totalmente crescidos. Os oócitos em crescimento são incapazes de responder aos sinais de maturação e permanecem retidos no estágio de diplóteno da metáfase I da meiose. Os oócitos totalmente crescidos são responsivos à sinalização gonadotrófica e atingem a metáfase II em folículos pré-ovulatórios e em cultivo. A transição da primeira para a segunda fase é complexa e envolve mudanças estruturais e bioquímicas nos compartimentos citoplasmático e nuclear, consequentemente, na capacidade do oócito de ser fecundado e suportar o desenvolvimento inicial (BADR et al., 2007).

Após a fecundação, os oócitos passam, então, pelos estágios de zigoto, mórula e blastocisto (período de pré-implantação) (BADR et al., 2007) (**Figura 1**). O desenvolvimento embrionário é caracterizado pela ativação do genoma, durante o qual os genes são expressos de forma específica (NIEMANN e WRENZYCKI, 2000).

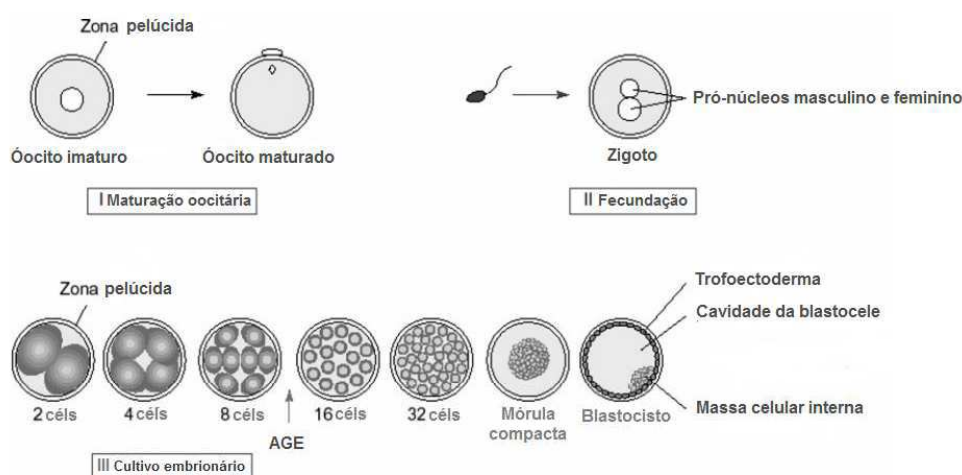


Figura 1. Fases do desenvolvimento embrionário. Fase I: maturação do oócito com quebra da vesícula germinativa, extrusão do primeiro corpúsculo polar e permanência no estágio de metáfase II; Fase II: fecundação e formação do zigoto; extrusão do segundo corpúsculo polar. Fase III: clivagem e divisões dos blastômeros, formando a compactação das células no estágio de mórula e diferenciação em trofoectodermia e massa celular interna no estágio de blastocisto. Antes da ativação do genoma embrionário (AGE), a síntese de proteína embrionária depende principalmente dos transcritos maternos (RNAm e proteínas) estocados no oócito (modificado de BADR et al., 2007).

2.1.1. Maturação oocitária

O processo pelo qual o oócito sofre mudanças citoplasmáticas e completa a primeira divisão meiótica, saindo do estágio de diplóteno na prófase I e chegando à Metáfase II (MII) é chamada de maturação oocitária. É um processo complexo e resulta, na capacidade do oócito ser fecundado e na progressão do desenvolvimento embrionário (BADR et al., 2007).

As mudanças estruturais no citoplasma incluem o aumento do número e alteração na morfologia e redistribuição das mitocôndrias, modificações ultraestruturais no complexo de Golgi, acúmulo de ribossomos e liberação dos grânulos corticais (FERREIRA et al., 2009). O nucléolo passa por uma transição de uma configuração difusa reticulada (rede fibrilogramular) para uma densa e uniforme, composta exclusivamente por material fibrilar, refletindo o período de intensa síntese de RNAs, na qual cessa gradualmente com o crescimento do oócito (FULKA-Jr; FIRST; MOOR, 1998).

- Maturação Citoplasmática

Na maturação citoplasmática ocorrem alterações nos teores de proteínas e na redistribuição de organelas como os grânulos corticais. A movimentação das organelas ocorre pela ação dos microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto sendo que o reposicionamento dessas organelas depende da necessidade da célula durante cada estágio de desenvolvimento. Os grânulos corticais migram do complexo de Golgi e se posicionam próximos à membrana, sendo posteriormente submetidos à exocitose por fusão com a membrana do oócito, liberando seu conteúdo no espaço perivitelino, evitando a polispermia durante a fecundação (HOSOE e SHIOYA, 1997; WANG et al., 1997).

A maturação nuclear e a citoplasmática são eventos interligados que ocorrem simultaneamente e dependem da dinâmica correta da separação dos cromossomos durante a maturação nuclear, da distribuição das organelas citoplasmáticas e do estoque de RNAm, proteínas e fatores de transcrição necessários para esse processo ocorrer. Esse estoque assegura a progressão do desenvolvimento inicial do embrião para o estágio de oito células, quando

há a ativação do genoma embrionário em bovinos e a síntese de novas proteínas tornam-se necessárias. A expressão de alguns genes durante esse período é determinante para o sucesso da embriogênese no estágio de pré-implantação (MEIRELLES et al., 2004).

- Maturação Nuclear

A maturação nuclear envolve a quebra da vesícula germinativa (GVBD) com a dissolução da membrana nuclear, condensação da cromatina, organização dos microtúbulos no fuso meiótico e separação dos cromossomos homólogos resultando na extrusão do primeiro corpúsculo polar. Dessa forma, permite ao oócito reduzir o seu conteúdo de DNA e se preparar para a fertilização e para as clivagens subsequentes. Esse processo é controlado por modificações de histonas, proteínas do centrôssomo, várias proteínas-quinases/fosfatases, pontos de checagem do fuso e citoesqueleto (SUN et al., 2001; WANG et al., 2006; SASKOVA et al., 2008; YIN et al., 2008; SCHINDLER et al., 2009).

Na regulação da retomada da meiose, a ativação do MPF promove a fosforilação de proteínas que dão origem ao envelope nuclear e àquelas envolvidas com a condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto (TROUNSON et al., 2001). A atividade do MPF é baixa no estágio de vesícula germinativa, possui uma elevação em metáfase I, declina entre a metáfase I e II, tornando-se elevada em metáfase II, sendo inativado com a fecundação (KUBELKA et al., 2000).

A atividade da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), requerida no processo de maturação oocitária, é importante na manutenção da atividade do MPF, formação do fuso meiótico e manutenção e permanência do oócito em metáfase II (GAUTIER, et al., 1990; TROUNSON et al., 2001).

2.1.2. Genes relacionados à maturação do oócito e ao desenvolvimento embrionário

Os oócitos sintetizam e acumulam certo número de transcritos e proteínas cruciais para a formação dos folículos, crescimento do oócito e

progressão da meiose como o *maternal antigen that embryos require* (MATER), o *zigote arrest1* (ZAR1) e o *growth differentiation factor 9* (GDF9) os quais irão contribuir para fertilização e o início do desenvolvimento embrionário e permitir que o embrião passe o período da transição materno-zigótica (TMZ). Entretanto, uma contribuição alterada para a expressão correta de genes leva a um bloqueio no desenvolvimento no momento da TMZ, impedindo o embrião de continuar o seu desenvolvimento (SIRARD, 2001).

Além dos fatores diretamente relacionados à aquisição de competência de desenvolvimento, os principais transcritos produzidos durante a maturação dos COCs codificam reguladores do ciclo celular como o *maturation promoting factor* (MPF), a proteína do pró-oncogene c-mos (MOS), a *mitogen activated protein kinases* (MAPK), além de outros RNAm (CALDER et al., 2003).

- MOS (*Murine sarcoma viral proto-oncogene homolog*) / MAPK (*Mitogen activated protein kinases*)

A MOS é uma serina/treonina quinase, produto do proto-oncogene c-MOS que é expressa exclusivamente em células germinativas. É responsável pela fosforilação da MEK (quinase ativadora da MAPK) a qual ativa a cascata de MAPK, além de ser importante na organização de microtúbulos durante a maturação em camundongos (WATANABE et al., 1991; POSADA et al., 1993; VERLHAC et al., 1996).

A ativação da MAPK também é requerida para a ativação eficiente do MPF (Fator Promotor da Maturação), um complexo formado pelas ciclina B e quinase p34cdc2 (GAUTIER, et al., 1990). Assim, o oócito é submetido à GVBD e completa a primeira divisão meiótica liberando o primeiro corpúsculo polar (FISSORE; HE; WOUDE, 1996).

Em bovinos, MAPK está presente e ativa durante a maturação. Mediada pela elevação do AMPc (Adenosina monofosfato cíclico) nas células foliculares, leva à diminuição na permeabilidade das junções comunicantes entre as células somáticas e o oócito por fosforilação, causando redução nas concentrações de AMPc dentro do oócito, necessário para maturação oocitária. Sua ativação por injeção de RNAm de MOS em oócitos acelera a GVBD,

sugerindo que a cascata de MAPK seja iniciada pela proteína MOS (FISSORE; HE; WOUDE, 1996).

- MATER (*Maternal antigen that embryos require*)

MATER é um gene de efeito materno primeiramente identificado em camundongos (TONG et al., 2000). O transcrito e a proteína são expressos exclusivamente em oócitos acumulados durante a oogênese a partir do folículo primário. Durante a maturação e a ovulação, os transcritos são degradados e a proteína persiste até o estágio de blastocisto expandido, sendo degradada após a eclosão (PENNETIER et al., 2006; PISANI et al., 2010).

Oócitos de camundongos na ausência da proteína MATER exibem aparentemente competência normal para realizar a meiose e expulsar o primeiro corpúsculo polar, entretanto, eles apresentam organização citoplasmática dos F-actina e migração do fuso para o córtex durante a primeira divisão meiótica irregulares. Os embriões não ultrapassam o estágio de 2 células, coincidindo com a transição materno-zigótica, o que sugere um papel fisiológico além da primeira clivagem embrionária (TONG et al., 2000). É possível que tenha importância na regulação das funções mitocondriais, distribuição do retículo endoplasmático e homeostase do cálcio em oócitos e embriões (FERNANDES et al., 2012; KIM et al., 2014).

A diminuição na expressão da proteína MATER resulta em maior frequência na separação precoce de cromátides irmãs em conjunto com o aumento da distância inter-centrômero em oócitos. Oócitos que não expressam transcritos nem a proteína MATER mostram um enfraquecimento na coesão do centrômero, local que detém as cromátides irmãs unidas até a anafase II, levando ao desalinhamento dos cromossomos na placa metafásica em MI ou MII (LU et al., 2016).

Em bovinos, os transcritos e a proteína são expressos em oócitos a partir de folículos primários e sua proteína é estocada no citoplasma de oócitos em crescimento, persistindo durante a maturação, fertilização e embriões até o estágio de expansão, quando são então degradadas após a eclosão (PENNETIER et al., 2006).

- ZAR1 (*Zigote Arrest 1*)

Originalmente identificado em camundongos, o *ZAR1*, semelhante ao *MATER*, é um gene de efeito materno, importante na transição materno-zigótica, expresso durante o crescimento do oócito, zigoto e embriões nos estágios iniciais (UZBEKOVA et al., 2006).

Comparados a embriões *MATER knockout*, os embriões *ZAR1 knockout* são bloqueados predominantemente no estágio de 1 célula e quase que completamente bloqueados na ativação do genoma, onde menos de 20% dos embriões progridem para o estágio de 2 células nenhum embrião se desenvolve ao estágio de 4 células (WU et al., 2003).

Em bovinos os transcritos podem ser encontrados em embriões até o estágio de blastocisto, entretanto, há um aumento significativo de RNAm no estágio de 4 células, sugerindo que *ZAR1* não é exclusivamente de origem materna como em camundongos (BREVINI et al., 2004).

- GDF9 (*Growth differentiation factor 9*)

O *GDF9* é uma proteína expressa por oócitos ao longo do desenvolvimento folicular, sendo apontado como um marcador de célula germinativa (McPHERRON e LEE, 1993). Apresenta um papel na regulação do desenvolvimento e maturação do oócito e na diferenciação e proliferação da célula da granulosa, sendo importante na comunicação oócito-células foliculares (GUI e JOYCE, 2005).

Estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mostram a importância do gene na estimulação do crescimento folicular inicial, expansão das células do cumulus, fertilidade, desenvolvimento embrionário e viabilidade fetal (DONG et al., 1996; JUENGEL et al., 2004; ORISAKA et al., 2006; YEO et al., 2008).

Por desempenhar papel crucial na foliculogênese, fêmeas de camundongos *knockout* para o gene são inférteis devido ao bloqueio do crescimento folicular no estágio primário (ELVIN et al., 1999). Em oócitos bovinos, o *GDF9* é expresso a partir de folículos primordiais até os estágios subsequentes da fertilização, em embriões de 8 células (PENNETIER et al., 2004).

- *OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) ou POU5F1 (POU domain, class 5, transcription factor 1)*

É um fator de transcrição pertencente à família POU (Pit-Oct-Unc), essencial à manutenção da pluripotência em células germinativas primordiais e em células embrionárias, frequentemente utilizado como marcador para células indiferenciadas (OKAMOTO et al., 1990). Assim, alterações na expressão desse gene induzem diferenciação celular (NIWA et al., 2000). OCT4 é um dos genes de efeito materno e é considerado funcionalmente importante para ativação do genoma embrionário (LI; ZENG; DEAN, 2010).

A ausência da expressão de OCT4 nas células germinativas primordiais de camundongos leva à apoptose ao invés de diferenciação (KEHLER et al., 2004). Uma redução na expressão de *OCT4* pode prejudicar o equilíbrio entre os factores pró e anti-apoptóticos, o que por sua vez pode levar ao aumento das células apoptóticas em oócitos bovinos e embriões pré-implantação (ROTH e HANSEN, 2004).

Em embriões bovinos *in vitro*, a transcrição de OCT4 é expressa durante os estádios iniciais de desenvolvimento de embriões pré-implantação com alta expressão em oócitos imaturos até ao estágio de quatro células e com expressão descendente do estágio de oito células para mórula, posteriormente com expressão elevada no estágio do blastocisto (NGANVONGPANIT et al., 2006).

2.2. ESTRESSE TÉRMICO

Os impactos atribuídos a fatores climáticos sobre os animais de produção geram respostas negativas para o agronegócio tornando essencial a implantação de práticas adequadas que minimizem os efeitos do estresse. Um aquecimento climático pode contribuir para acentuar ainda mais o efeito da temperatura na redução da produtividade de rebanhos bovinos e a resposta do animal varia de acordo com o tipo de estresse térmico sofrido, afetando o crescimento, a reprodução e eficiência, resultando em taxas de concepção

menores e, conseqüentemente, em mais vacas vazias por mais tempo (NARDONE et al., 2010).

As respostas ao estresse, não apenas relacionadas à temperatura, são um tipo de defesa celular, que envolvem a expressão de proteínas importantes que favorecem mecanismos de tamponamento contra a variação genética pelo seu caráter protetor frente a mudanças ambientais (YOUNG et al., 2001; PIGLIUCCI, 2002).

Na reprodução, a exposição de oócitos ao estresse térmico por longos períodos leva a perturbações no microambiente folicular e na fisiologia do oócito em mamíferos (PICTON et al., 1998; McNATTY et al., 1999) resultando em competência reduzida para a fecundação e subsequente desenvolvimento, reduzindo tanto a taxa de clivagem quanto a de blastocistos (ROTH e HANSEN, 2004). A elevação da temperatura causa desorganização da arquitetura do fuso meiótico e de microfilamentos, reduzindo a maturação nuclear e morte por apoptose em oócitos (ROTH e HANSEN, 2005), além de reduzir a síntese de proteínas (EDWARDS et al., 1997) e induzir a translocação prematura dos grânulos corticais para o oolema comprometendo a capacidade do oócito em atingir o estágio de metáfase II (PAYTON et al., 2004).

2.2.1. Efeito do estresse térmico nas células foliculares

O estresse durante os estágios iniciais da foliculogênese compromete a função folicular alterando a secreção de gonadotrofinas, inibina e de esteroides, com efeitos negativos na competência do oócito (WOLFENSON et al., 2000; ROTH, 2008) e sobrevivência embrionária (EDWARDS e HANSEN, 1997; RIVERA e HANSEN, 2001), influenciando negativamente na taxa de concepção (OZAWA et al. 2005). O estágio de desenvolvimento folicular susceptível ao estresse térmico não é precisamente definido, mas segundo Roth et al. (2000), folículos antrais com aproximadamente 0,5–1,0 mm de diâmetro são sensíveis ao estresse térmico.

Essa elevação da temperatura resulta em maior sobrevivência de folículos subordinados e induz a codominância devido ao comprometimento da dinâmica folicular e inabilidade do maior folículo exercer dominância (BADINGA

et al., 1993; WILSON et al., 1998; ROTH et al., 2000; SARTORI et al., 2004). Isso pode explicar o aumento da ocorrência de gemelaridade que pode ser vista no verão (RYAN e BOLAND, 1991; LÓPEZ-GATIUS et al., 2005). O comprometimento da função das células da granulosa pelo calor, a principal fonte de estradiol plasmático e de inibina, leva a esse aumento da concentração plasmática de FSH (ROTH et al., 2000).

Temperaturas elevadas reduzem a viabilidade das células da teca e da granulosa, resultando em produção reduzida de androstenediona e estradiol devido ao baixo substrato de androgênio e da atividade da aromatase (WOLFENSON et al., 1997; BRIDGES et al., 2005). A queda na produção de estradiol e androstenediona pode ser registrada nas células da granulosa e da teca obtidas de folículos de 3 ou 4 semanas após o estresse térmico agudo (ROTH et al., 2000). A extensão dos efeitos do estresse térmico na função folicular é transitória, mostrando melhora espontânea da fertilidade ao longo do outono e início do inverno (ZERON et al., 2001).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ser elevada em consequência do estresse térmico devido à interferência na atividade das enzimas envolvidas no processo (SKIBBA et al., 1986). A esteroidogênese também pode ser afetada pelo estado oxidativo das células folicular e/ou luteal (KAYO et al., 1997; RONCHI et al., 1999). Esse aumento na produção de ROS afeta a síntese de progesterona (P4) por insuficiência de receptores de LH, inibição da translocação de colesterol para a mitocôndria ou a atividade da enzima citocromo P450 (GATZULI et al., 1991; BEHRMAN e ATEN, 1991; CARLSON et al., 1995).

Comparado aos meses de inverno, as concentrações de insulina no plasma, IGF-I e glicose são reduzidas no verão provavelmente pela baixa ingestão de matéria seca e ocorrência de balanço energético negativo (WHITAKER et al., 1993; JOLLY et al., 1995; JONSSON et al., 1997; HAMILTON et al., 1999; De RENSIS et al., 2002). A insulina é necessária para o desenvolvimento de folículos e apresenta efeitos benéficos sobre a qualidade do oócito (O'CALLAGAN e BOLAND, 1999). Tanto o IGF-I quanto a glicose são estimuladores de crescimento folicular e implantação embrionária (RABIEE et al., 1997). A disponibilidade de glicose também está diretamente envolvida na modulação da secreção de LH e a hipoglicemia grave inibe a secreção pulsátil

de LH e a ovulação (BUCHOLTZ et al., 1996; JOLLY et al., 1995). Como todos estes fatores são essenciais para foliculogênese normal, suas baixas concentrações plasmáticas levam ao desenvolvimento folicular prejudicado, redução nas detecções de estro e oócitos de baixa qualidade. Segundo Putney et al. (1989), a exposição de novilhas ao estresse térmico entre o início do estro e a inseminação aumenta a proporção de embriões anormais e atrasados.

Desta forma, a magnitude da resposta dos oócitos bovinos às elevadas temperaturas corporais depende da severidade e da sua duração (EDWARDS e HANSEN 1996, PAYTON et al., 2004). Reduções do desenvolvimento embrionário por estresse térmico estão entre 37-65% (EDWARDS e HANSEN, 1996; ROTH e HANSEN, 2004; EDWARDS et al., 2005; SCHROCK et al., 2007; RISPOLI et al., 2011) e modificações na competência de embriões morfológicamente normais também são relatados (EDWARDS et al. 2009). O dano causado ao *pool* de oócitos ovariano pelo estresse térmico durante os estágios iniciais da foliculogênese necessita de um período de 3 a 4 ciclos estrais para a restauração da competência dos oócitos (ROTH et al., 2001).

2.2.2. Efeito do estresse térmico no oócito

Oócitos maturados sob estresse térmico mostram anormalidades no estágio de MII e nos grânulos corticais (PAYTON et al., 2004; MAYA-SORIANO et al., 2013), sugerindo excitose prematura (ANDREU-VAZQUEZ et al., 2010), o que resulta em alterações cromossômicas, no rearranjo do citoesqueleto e na formação do fuso meiótico (TSENG et al., 2004; JU et al, 2005). Tais alterações podem levar à maturação nuclear incompleta, falha na fertilização, e/ou formação anormal do zigoto (PAYTON et al., 2004; ROTH e HANSEN, 2005). O choque térmico durante a maturação provoca anomalias compatíveis com o envelhecimento do oócito, resultando em menor desenvolvimento de blastocistos (EDWARDS et al., 2005; ANDREU-VAZQUEZ et al., 2010; RISPOLI et al., 2011).

Quando coletados durante a estação fria, os oócitos são mais sensíveis aos efeitos negativos do estresse térmico que os coletados na estação quente (MAYA-SORIANO et al., 2013). O fato de que os oócitos obtidos na estação

quente serem mais capazes de se adaptar a temperaturas elevadas pode refletir um mecanismo de tolerância ao choque térmico. A tolerância ao calor pode estar relacionada à expressão de proteínas do choque térmico, que protegem os oócitos de estímulos apoptóticos que afetam negativamente o DNA (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a).

ROS são essenciais na retomada da meiose durante a maturação por servirem como moléculas sinalizadoras (TAKAMI et al. 1999). Entretanto, o aumento de espécies reativas de oxigênio dentro dos folículos, sob altas temperaturas, resulta em uma segregação cromossômica anormal e alterações citoplasmáticas do oócito (BLONDIN et al., 1997; SCHROCK et al., 2007).

O dano causado pelo choque térmico ao oócito cultivado *in vitro*, durante a maturação é relevante para entender a redução na fertilidade causada pelo estresse térmico *in vivo*. A exposição de COCs bovinos a temperaturas elevadas durante as primeiras 12 horas da maturação *in vitro* interrompe a arquitetura citoesquelética e reduz a maturação nuclear (JU e TSENG, 2004; ROTH e HANSEN, 2005).

Ainda não está claro o mecanismo pelo qual o estresse térmico leva a uma interrupção no desenvolvimento do oócito, mas um dos processos que pode estar envolvido nessa interrupção é a apoptose. O choque térmico pode induzir a apoptose em diversos tipos de células, incluindo oócitos e embriões pré-implantação (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a,b; KRININGER III et al., 2002; ROTH et al., 2004).

2.3. PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO (HSPs)

As HSPs são importantes proteínas maternas classificadas como chaperonas por se ligarem a outras proteínas, denominadas clientes, para auxiliarem numerosos processos celulares que variam desde a montagem do citoesqueleto ao controle do ciclo celular (KREGEL, 2002). A função das chaperonas HSPs é auxiliar no enovelamento, tráfego e manutenção de proteínas (WHITESELL e LINDQUIST, 2005). Desta forma, quando as proteínas-clientes são danificadas por condições de estresse, as HSPs medeiam seu transporte para organelas para o reparo ou degradação

(VABULAS et al., 2010). São exemplos de proteínas-clientes: tirosinaquinases, fatores de transcrição e proteínas estruturais (GOETZ et al., 2003).

A descoberta da indução da transcrição das proteínas do choque térmico ocorreu em cromossomos de *Drosophila melanogaster* após a exposição ao calor (RITOSA, 1966). Baseadas no seu peso molecular, as HSPs são divididas nas seguintes classes: HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 e as pequenas HSPs (FU, 1996). A indução da chaperona é uma modalidade de adaptação que não envolve mudanças genéticas, mas reflete uma capacidade para manter a homeostase proteica (KAPLAN e LI, 2012).

- FATOR DE TRANSCRIÇÃO DO CHOQUE TÉRMICO (HSF)

Existem três homólogos do HSF (HSF1, HSF2 e HSF4) que partilham um domínio semelhante de ligação ao DNA em mamíferos, mas o principal regulador da transcrição responsável pela expressão de HSPs induzidas pelo estresse é o HSF1 (McMILLAN et al., 1998; CHRISTIANS e BENJAMIN, 2006). Dos diferentes domínios funcionais que compõe o HSF, o domínio ligado ao DNA (DBD), na porção N-terminal, é o mais preservado. O HSF se liga ao DNA onde o DBD reconhece o Elemento de Resposta ao Choque Térmico (HSE) no sulco maior da dupla hélice. Os HSEs são formados por múltiplas repetições de sequências nGAAn pentaméricas (AMIN; ANANTHAN; VOELLMY, 1988).

O HSF1, sob condições de não-estresse, existe na forma de monômeros transcrionalmente inativos no citoplasma. Em resposta a estímulos de estresse, sofrem fosforilação e se organizam em trímeros ativos translocados para o núcleo se ligando aos HSEs nos promotores dos genes das HSPs e ativam a sua transcrição. Após a expressão de uma quantidade apropriada de HSPs ou ao retorno da condição de não-estresse, os trímeros ativos são convertidos a monômeros inativos (FUJIMOTO e NAKAI, 2010).

A HSP90 atua como um repressor do HSF1 (ZOU et al., 1998) e participa na modulação tanto da transição monômero-trímero quanto da atividade transcrional (ALI et al., 1998). Em condições normais, o monômero de HSF está associado à HSP90 e à HSP70, porém, sob condições de estresse, o monômero HSF1 converte em um trímero e interage com HSE para iniciar a transcrição de genes HSPs (**Figura 2**).

O HSF1 também regula a HSP em condições fisiológicas apresentando importante função na manutenção da homeostase da célula (YAN et al., 2002). Numerosos genes não classificados como HSPs são dependentes de HSF1, não sendo este restrito ao controle da expressão de HSP ou resposta ao choque térmico (TRINKLEIN et al., 2004).

Durante o choque térmico, tanto HSF1 quanto HSF2 podem modular a expressão de HSPs e é possível que haja uma interação entre os dois fatores de transcrição, além de que a capacidade de ligação ao DNA induzida pelo estresse do HSF2 parece ser modulada pelo HSF1 (ÖSTLING et al., 2007).

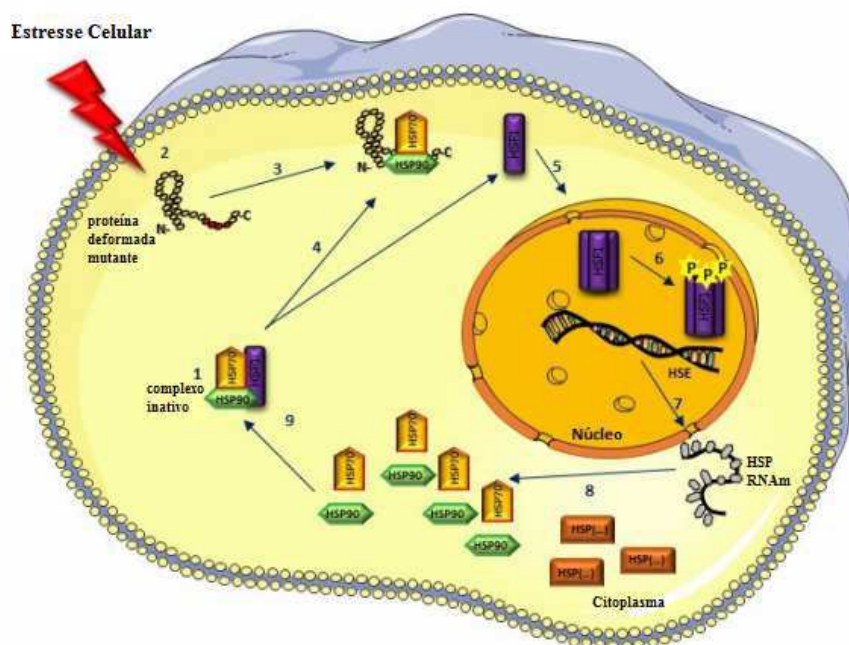


Figura 2. Modelo de regulação do HSF1. Sob condições normais o HSF1 está na forma inativa formando um complexo com HSP90 e HSP70 (1). A presença de proteínas deformadas (2) na célula leva ao deslocamento das HSPs do HSF1 para essas proteínas (3 e 4). Os monômeros livres de HSF1 formam trimeros e se deslocam para o núcleo (5) onde sofrem modificações pós-traducionais (6) e a exportação para o citoplasma é inibida. Uma vez em estado competente, o HSF1 se liga ao HSE em uma região promotora de vários genes que codificam chaperonas (7), induzindo sua expressão (8). Com o aumento do nível de chaperonas, essas proteínas se reassociam ao HSF1 inativando-o (9) (Modificado de Jalles e Maciel, 2015).

- PROTEÍNA DO CHOQUE TÉRMICO DE 90 kDa (HSP90)

HSP90 é uma das mais abundantes e conservadas chaperonas presentes em eucariontes (PICARD, 2002), sendo essencial à sobrevivência da célula (PEARL e PRODROMOU, 2006). É ubiquamente expressa em células

não estressadas, abrangendo 1-2% das proteínas celulares em eucariontes (SREEDHAR et al., 2004a) e o complexo da HSP90 auxilia no enovelamento e na função de uma variedade de proteínas-clientes (WHITESELL e LINDQUIST, 2005). Os mamíferos apresentam duas isoformas de Hsp90 citosólica, uma isoforma induzida pelo choque térmico, HSP90 α , codificada pelo gene HSP90aa1, e uma isoforma expressa constitutivamente, HSP90 β , codificada pelo gene HSP90ab1 (SREEDHAR et al., 2004). Estas isoformas são reguladas de forma independente e apresentam funções especializadas em tipos de células específicas (METCHAT et al., 2009).

Apresenta os domínios N-terminal, médio e C-terminal e uma quarta hélice garantindo que ela seja um homodímero sob condições fisiológicas (HARRIS et al., 2004). O domínio N-terminal é importante para a hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) em difosfato de adenosina (ADP) e na interação com chaperonas. A mudança conformacional de um estado “relaxado” ou aberto para um estado “tenso” ou fechado ocorre com a ligação do ATP ao domínio N-terminal da HSP90, permitindo que as proteínas-clientes ligadas à chaperona sejam estabilizadas e ativadas (PEARL e PRODROMOUS, 2002). A ligação de uma cliente induz uma conformação parcialmente fechada da HSP90 ao mesmo tempo em que a atividade da ATPase aumenta (STREET et al., 2011). Para o enovelamento correto das proteínas-clientes, o complexo multiproteico da HSP90 se associa a co-chaperonas e a co-fatores (**Figura 3**). Algumas co-chaperonas regulam a atividade de ATPase da HSP90, outras auxiliam no enovelamento da proteína e outras atuam como um arcabouço no complexo (ZHAO e HOURY, 2005).

Inibidores da HSP90, como a geldanamicina e o radicicol (WHITESELL et al., 1994), apresentam como alvo o sítio de ligação do domínio N-terminal com maior afinidade que o ATP ou ADP. Além disso, esses inibidores aumentam o recrutamento de ubiquitina-ligases ao complexo da HSP90, levando a elevada degradação da proteína-cliente via proteossoma (SEPP-LORENZINO et al., 1995).

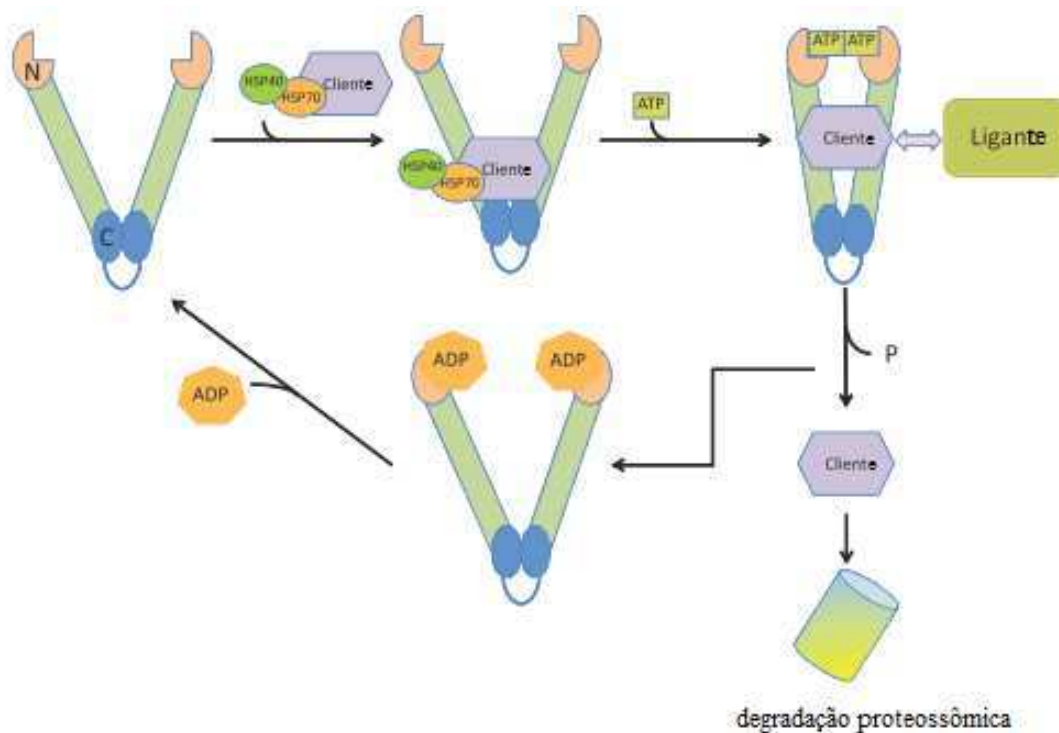


Figura 3. Ciclo *in vivo* da proteína do choque térmico 90KDa (HSP90). A proteína-cliente liga-se às co-chaperonas HSP70 e HSP40 e, em seguida, é carregada para o homodímero de HSP90. A ligação subsequente de trifosfato de adenosina (ATP) provoca uma alteração conformacional que estabiliza a proteína-cliente para interações com outros ligantes ou estímulos. Se não ocorrer nenhuma interação adicional, a hidrólise de ATP para o difosfato de adenosina (ADP) facilita a libertação da proteína-cliente, que pode ser submetida à degradação através do proteossoma. A dissociação de ADP do homodímero restaura a HSP90 à sua conformação aberta (modificado de Den e Lu, 2012).

A HSP90 não é capaz de ocultar seu local de ligação do substrato, logo, não evita que as proteínas clientes tenham acesso ao sítio de ligação em nenhum momento. Existem mais de 175 clientes envolvidas em uma grande variedade de processos celulares, uma propriedade que explica seus papéis multifacetados em uma ampla gama de vias celulares, incluindo desenvolvimento, diferenciação, regulação do ciclo celular, apoptose e termotolerância (RICHARDSON et al., 2011). As proteínas-clientes são entregues a HSP90 pela HSP70 e outros co-fatores (TAIPALE; JAROSZ; LINDQUIST, 2010).

Em eucariontes, a principal localização da HSP90 é no citoplasma e em situações de estresse, sofre uma translocação para o núcleo (KATSCHINSKI et al., 2002), sendo encontrada na região de intercromatina (SEGUI-SIMARRO et al., 2003).

- PROTEÍNA DO CHOQUE TÉRMICO DE 70 kDa (HSP70)

Produzida constitutivamente, localizada em todos os compartimentos celulares, a HSP70 auxilia em processos como o enovelamento e montagem de proteínas recém-sintetizadas, previne a agregação de proteínas sob condições fisiológicas e de estresse, promovendo o re-enovelamento das proteínas defeituosas, além de proteger as células contra danos oxidativos e bloquear a apoptose induzida pela temperatura (MOSSER et al., 1997; HARTL e HAYER-HARTL, 2002).

Assim como a HSP90, o mecanismo de ação da HSP70 é dependente de ATP e conta com o auxílio da chaperona HSP40 e co-fatores durante esse processo (KAMPINGA e CRAIG, 2010). Proteínas são enviadas pela HSP70 ao sistema da HSP90 para o processo de enovelamento (TAIPALE; JAROSZ; LINDQUIST, 2010).

- PROTEÍNA DO CHOQUE TÉRMICO DE 40 kDa (HSP40)

Preservada ao longo da evolução, a HSP40 é importante na tradução, enovelamento, translocação e degradação proteica, principalmente estimulando a atividade de ATPase da HSP70 (MINAMI et al., 1996). Assim, uma das funções da HSP40 é como co-chaperona da HSP70, estabilizando sua interação com o substrato e transferindo-o para a HSP90, sendo encontradas em complexo com a HSP90 (QIU et al., 2006).

2.4. EPIGENÉTICA E O PAPEL DA HSP90 DURANTE O ESTRESSE AMBIENTAL

O termo epigenética descreve alterações estáveis no potencial de expressão gênica que surgem durante o desenvolvimento e a proliferação celular, seja por alteração aleatória ou sob o efeito do ambiente. São hereditárias, mas não envolvem mutações do próprio DNA e são, portanto, potencialmente reversíveis (JAENISCH e BIRD, 2003). A regulação epigenética da expressão gênica é um processo dinâmico, e a capacidade de mudar e se

adaptar em resposta a sinais de desenvolvimento e/ou estímulos ambientais residem principalmente sobre modificações no próprio DNA (metilação) ou por proteínas que estão intimamente associadas ao DNA (acetilação, metilação ou fosforilação de histona) (JONES e TAKAI, 2001; JENUWEIN e ALLIS, 2001).

A capacidade de tamponamento da HSP90 em mascarar os efeitos fenotípicos das proteínas mutantes, permitindo o enovelamento correto ou controlando a transdução de sinal, resulta em consequências importantes para a evolução das populações (RUTHERFORD, 2003). A redução dos níveis dessa chaperona sensibiliza a cromatina-alvo para a ativação ou repressão gênica (SOLLARS et al., 2003). O estresse ambiental compromete o sistema tampão e revela variantes genéticas que podem ser herdáveis. Assim, quando o número de clientes excede a capacidade da HSP90, os efeitos fenotípicos da variação genética pré-existente podem ser liberados. Sob condições de estresse, em que a HSP90 apresenta-se reduzida, diversas formas de mutações podem ser induzidas, proporcionando uma diversidade fenotípica (SPECCHIA et al., 2010).

Em *Drosophila melanogaster*, alterações na função da HSP90 por mutação, inibição farmacológica ou estresse ambiental podem causar mudanças morfológicas. Em plantas, a inibição da HSP90 também é capaz de afetar forma, cor e expansão de cotilédones. Na ausência do inibidor, apenas 1-2% das plantas mostraram morfologias de variantes muito mais sutis (QUEITSCH; SANGSTER; LINDQUIST, 2002).

3. HIPÓTESES

A inibição da HSP90 prejudica a maturação *in vitro* do oócito e desenvolvimento embrionário subsequente, indicando a importância da participação desta proteína em mecanismos celulares oocitários;

Alterações de cromatina ocorrem em embriões derivados de oócitos estressados pelo calor durante a maturação *in vitro*;

Os efeitos do estresse térmico durante a maturação *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário subsequente são aumentados quando se inibe a HSP90.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL:

Identificar modificações de desenvolvimento, transcricionais e epigenéticas em embriões, causadas pela inibição da atividade da HSP90 e pelo choque térmico aplicados em oócitos bovinos.

4.2. ESPECÍFICOS:

- Avaliar o efeito da inibição da HSP90 durante a maturação *in vitro*, na competência, progressão da meiose e expressão gênica de oócitos bovinos, bem como na apoptose embrionária;
- Avaliar o efeito do choque térmico e da inibição da HSP90 em oócitos sobre o desenvolvimento embrionário e apoptose;
- Avaliar o efeito do choque térmico durante a maturação em oócitos sobre a organização da cromatina e o efeito da inibição da HSP90 e do choque térmico sobre a expressão gênica embrionária.

5. METODOLOGIA

5.1. LOCALIZAÇÃO

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal e no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, localizados em Juiz de Fora – MG. Os oócitos foram obtidos de fêmeas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) abatidas em matadouro no município.

As análises da estrutura da cromatina foram executadas no Laboratório RIO-IBiSA MIMA2 no Centro de Biologia do Desenvolvimento e Reprodução do INRA (Institut Scientifique de Recherche Agronomique) em Jouy-en-Josas na França.

5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.2.1. Experimento 1

Foram determinados o tempo de incubação e a dose de inibidor de HSP90, a 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG), necessários para interferir no desenvolvimento embrionário. Foram avaliadas três concentrações de 17AAG (0, 1 e 2 μ M) por 12 e 24h de maturação *in vitro* a 38,5°C, 5% CO₂ e umidade saturada. Foi avaliado o efeito das doses do 17AAG sobre a maturação nuclear e a expressão gênica em oócitos, a taxa de clivagem no terceiro dia e de blastocistos nos sétimo e oitavo dias após a fecundação e apoptose em blastocistos no oitavo dia.

5.2.2. Experimento 2

Foram avaliados os efeitos do choque térmico e da inibição da atividade da HSP90 (utilizando a dose de 2 μ M com efeito na produção de embriões no Experimento 1) e com tempos de incubação de 12 e 24 h. Neste experimento os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram maturados em quatro grupos, de

acordo com a temperatura para se induzir o choque térmico ou com a presença de 17AAG, conforme segue:

- Grupo Controle – maturação dos CCOs por 24 h em temperatura de 38,5°C;
- Grupo 17AAG/12h – maturação dos CCOs na presença de 17AAG durante as primeiras 12 h em temperatura de 38,5°C, seguindo 12 h de maturação na ausência do inibidor;
- Grupo 17AAG/24h – maturação dos CCOs na presença do inibidor 17AAG por 24 h em temperatura de 38,5°C;
- Grupo CT/12h (Choque Térmico) – maturação dos CCOs por 12 h em temperatura de 41,5°C, seguida por cultivo por mais 12 h em temperatura de 38,5°C.

Foram avaliadas as taxas de clivagem (D3) e de blastocistos nos dias 7 (D7) e 8 (D8), e realizada análise da estrutura da cromatina em embriões em estágio de 4 e 8 células e apoptose em blastocistos no oitavo dia.

.

5.2.3. Experimento 3

Foram avaliados o efeito do choque térmico, do 17AAG na concentração de 2 μ M e a ação do 17AAG sobre o choque térmico. Os CCOs foram maturados em quatro grupos, de acordo com a temperatura para induzir o choque térmico ou a presença de 17AAG, conforme segue:

- Grupo Controle – maturação dos CCOs por 24 h em temperatura de 38,5°C;
- Grupo 17AAG – maturação dos CCOs na presença do inibidor 17AAG durante as primeiras 12 h em temperatura de 38,5°C, seguindo 12 h de maturação na ausência do inibidor;

- Grupo CT – maturação dos CCOs por 12 h em temperatura de 41,5°C, seguido por cultivo por mais 12 h em temperatura de 38,5°C.
- Grupo CT+17AAG – maturação dos CCOs na presença do inibidor 17AAG por 12 h em temperatura de 41,5°C e 38,5°C nas 12 h posteriores na ausência do inibidor e do choque térmico;

Foram avaliadas as taxas de clivagem (D3) e de blastocistos nos dias 7 (D7) e 8 (D8) e a expressão gênica em embriões de 8 células.

5.3. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

5.3.1. Obtenção e maturação *in vitro* dos oócitos (MIV)

Os ovários obtidos no matadouro FriPai, em Juiz de Fora - MG, utilizados para a obtenção dos oócitos foram transportados em solução fisiológica, acrescida de antibiótico ($0,1 \text{ gL}^{-1}$ de estreptomicina) à temperatura de 37°C. No laboratório os ovários foram lavados e colocados em banho-maria (37°C). Foram aspirados folículos com diâmetro de 2 a 8 mm com auxílio de seringa descartável de 10 mL e agulha 25x8 mm e o conteúdo aspirado foi depositado em cálice cônico. Após 15 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em meio TALP-Hepes e vertido em placa de Petri descartável de 100x20 mm.

Foram selecionados os CCOs que apresentaram citoplasma homogêneo com no mínimo três camadas de células. Os CCOs selecionados foram lavados duas vezes em meio TALP-Hepes e uma vez em meio de maturação *in vitro* (TCM199) suplementado com FSH e soro de vaca em cio. A maturação ocorreu em placa de cultivo do tipo Nunc, em poços contendo 400 µL de meio TCM199 de maturação contendo 40-50 CCOs por poço, em incubadora com 5% de CO₂ em atmosfera com umidade saturada, a 38,5°C por 24 horas.

5.3.2. Choque térmico em oócitos

Os CCOs imaturos selecionados foram lavados duas vezes em meio TALP-Hepes e uma vez em meio de maturação *in vitro* (TCM199) suplementado com FSH e soro de vaca em cio. Em seguida foram transferidos para placa de cultivo do tipo Nunc, em poços contendo 400 µL de meio TCM199 de maturação, contendo 40-50 oócitos por poço e levados para estufa incubadora com 7% de CO₂ em atmosfera, umidade saturada e temperatura a 41,5 °C, durante as primeiras 12 h.

Em seguida, a placa contendo os CCOs foi transferida para incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade saturada para cultivo por mais 12 h, completando as 24 h de maturação *in vitro*.

5.3.3. Fecundação *in vitro* (FIV)

Foram utilizadas doses de sêmen previamente avaliado quanto à motilidade e vigor antes de serem utilizados para a fecundação *in vitro*. Somente doses com motilidade igual ou superior a 60% e vigor a 3,0 foram utilizadas. As partidas de sêmen também foram avaliadas previamente quanto ao seu potencial de induzir a clivagem em oócitos, utilizando-se somente partidas com taxas de clivagem igual ou superior a 70%. A paleta foi descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos e o sêmen colocado em tubo de Eppendorf, previamente aquecido, e homogeneizado. Em seguida o sêmen foi transferido em tubo Eppendorf contendo gradiente Percoll (90% e 45%), onde ocorreu a separação dos espermatozoides vivos dos mortos por diferença de densidade. Após a primeira centrifugação a 8000 rpm por 7 min em 400 µL de Fert-Talp acrescido de heparina, o sobrenadante foi retirado e o *pelet* centrifugado novamente a 3200 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 70 µL de meio Fert-Talp. Após descongelamento e Percoll, foram avaliados motilidade e vigor do sêmen. Os COCs maturados foram lavados duas vezes em meio Fert-Talp e transferido para gotas de fecundação de 100 µL com o sêmen diluído, com concentração ajustada de forma a se obter dose fecundante de 2×10^6 espermatozóides/mL. A

FIV foi realizada por 18 a 22 h em estufa incubadora, nas mesmas condições de maturação do grupo controle.

5.3.4. Cultivo in vitro (CIV)

Após a FIV, os possíveis zigotos foram desnudados em solução de TALP. Os zigotos desnudos obtidos por FIV foram cultivados em poços com 500 µL de meio CR2aa, suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (SFB), em incubadora com 5% CO₂, 5% O₂, 90% de N₂ e umidade saturada por oito dias, em uma concentração de 20-30 estruturas por poço.

5.3.5. Avaliação do índice apoptótico

Blastocistos em D8 do desenvolvimento embrionário (no mínimo 15 por tratamento) foram fixados em solução de paraformaldeído 4% por 25 min, lavados e armazenados em solução de PBS 0,1% de PVA em geladeira. O Kit comercial utilizado foi o *Dead end fluorimetric terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end (TUNEL) System* (Promega, Madison, WI, EUA). Os embriões foram permeabilizados em solução de 0,2% de Triton X-100 e em seguida foram incubados em gotas contendo tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeos e enzima *recombinant terminal deoxynucleotidyltransferase* (rTdT) e corante de fluoresceína-12-desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP), recobertas com óleo em atmosfera umidificada, no escuro, por 1 hora. Passada esta etapa, os embriões foram corados com DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole; corante de fluorescência) em Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA) e, então, transferidos para lâmina e observados em microscópio de fluorescência. O número de células totais e o número de células apoptóticas foram analisados utilizando o software *ImageJ* 1.49. O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número de células contendo corpos apoptóticos e o número total de células.

5.3.6. Análise quantitativa da expressão gênica em oócitos e embriões

Nesta avaliação, onze genes foram avaliados em oócitos e 8 genes em embriões, incluindo os endógenos. Oócitos e os embriões dos tratamentos avaliados foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido em meio PBS acrescido de 0,1% de álcool polivinil e armazenados até posterior extração do RNA total. A extração e a transcrição reversa do RNA foram realizadas utilizando kits comerciais (Micro Kit RNAeasy, Quiagen e Superscript III kit, Invitrogen, respectivamente) em *pools* de 10 estruturas. A quantificação do RNA e do cDNA das amostras foi realizada pelo Nanodrop 1000 (**Tabelas 1 e 2**). As análises dos tratamentos foram realizadas em triplicata. A amplificação para quantificação relativa foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real. As reações foram feitas utilizando-se kit comercial com SYBR Green (Power Sybr Green, Applied Biosystem), de acordo com as recomendações do fabricante. As reações contendo cDNA, par de *primers*, Master Mix e 0,1U Taq DNA polimerase, em um volume final de 25µL, foram incubadas a 95°C por 15 min, seguido de 45 ciclos de 94°C por 15 seg, anelamento a temperatura específica para cada *primer* (**Tabela 3**) por 30 seg e extensão a 60°C por 30 seg. Controles negativos foram preparados em que o cDNA foi omitido durante a reação de amplificação. As reações foram feitas em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seladas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems). As amostras foram então incubadas no termociclador Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Os *primers* utilizados para avaliar a expressão dos genes alvos e dos genes endógenos (*GAPDH*, *β-ACTINA* e *YWHAZ*) foram desenhados utilizando o programa Primer3 a partir de sequências obtidas do banco de dados do GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e a sequência do *primer GAPDH* foi obtida a partir da referência de LEUTENNEGGER et al. (2000). A eficiência dos *primers* para cada reação foi determinada pelo *software* LinRegPCR® e considerada no cálculo da quantificação relativa. A análise dos resultados do PCR quantitativo foi realizada utilizando o *software* REST®, sendo que os resultados foram expressos relativos a um calibrador. Para avaliação da expressão foi utilizado

como calibrador oócitos do grupo controle. Deste modo, os dados obtidos foram expressos como N vezes relativas ao tratamento calibrador.

Tabela 1: Quantificação de oócitos bovinos realizada com 1 μ L do RNAm e do cDNA obtida após a extração e a transcrição reversa para cada tratamento e repetição.

Tratamentos	Quantificação do RNAm	Quantificação do cDNA
0 μ M de 17AAG por 12h (Repetição1)	4,4ng/ μ L	648,8 ng/ μ L
1 μ M de 17AAG por 12h(Repetição1)	18,0ng/ μ L	665,2 ng/ μ L
2 μ M de 17AAG por 12h(Repetição1)	25,0ng/ μ L	642,0 ng/ μ L
0 μ M de 17AAG por 24h(Repetição1)	2,1ng/ μ L	675,1 ng/ μ L
1 μ M de 17AAG por 24h(Repetição1)	14,0ng/ μ L	644,1 ng/ μ L
2 μ M de 17AAG por 24h(Repetição1)	5,5ng/ μ L	653,3 ng/ μ L
0 μ M de 17AAG por 12h (Repetição 2)	4,3ng/ μ L	644,2 ng/ μ L
1 μ M de 17AAG por 12h (Repetição 2)	6,0ng/ μ L	640,2 ng/ μ L
2 μ M de 17AAG por 12h (Repetição 2)	10,2ng/ μ L	644,3 ng/ μ L
0 μ M de 17AAG por 24h (Repetição 2)	34,3ng/ μ L	650,0 ng/ μ L
1 μ M de 17AAG por 24h (Repetição 2)	4,5ng/ μ L	659,6 ng/ μ L
2 μ M de 17AAG por 24h (Repetição 2)	6,1ng/ μ L	665,8 ng/ μ L
0 μ M de 17AAG por 12h (Repetição 3)	8,8ng/ μ L	655,5 ng/ μ L
1 μ M de 17AAG por 12h (Repetição 3)	6,9ng/ μ L	657,8 ng/ μ L
2 μ M de 17AAG por 12h (Repetição 3)	23,2ng/ μ L	624,0 ng/ μ L
0 μ M de 17AAG por 24h (Repetição 3)	10,5ng/ μ L	675,0 ng/ μ L
1 μ M de 17AAG por 24h (Repetição 3)	15,0ng/ μ L	651,0 ng/ μ L
2 μ M de 17AAG por 24h (Repetição 3)	24,0ng/ μ L	642,6 ng/ μ L

Tabela 2: Quantificação dos embriões bovinos de 8 células realizada com 1 μ L do RNAm e do cDNA obtida após a extração e a transcrição reversa para cada tratamento e repetição.

Tratamentos	Quantificação do RNAm	Quantificação do cDNA
Controle (Repetição1)	10,7 ng/ μ L	623,6ng/ μ L
17AAG (Repetição1)	7,0 ng/ μ L	630,8ng/ μ L
CT (Repetição1)	11,9 ng/ μ L	623,7ng/ μ L
CT +17AAG (Repetição1)	6,7 ng/ μ L	615ng/ μ L
Controle (Repetição2)	4,4 ng/ μ L	614,3 ng/ μ L
17AAG (Repetição2)	7,6 ng/ μ L	622,2ng/ μ L
CT (Repetição2)	5,9 ng/ μ L	566,4ng/ μ L
CT +17AAG (Repetição2)	5,5 ng/ μ L	615,7ng/ μ L
Controle (Repetição2)	13,3 ng/ μ L	662,7ng/ μ L
17AAG (Repetição2)	16,7 ng/ μ L	669,8 ng/ μ L
CT(Repetição2)	9,9 ng/ μ L	658,5ng/ μ L
CT +17AAG (Repetição2)	19,3 ng/ μ L	664,1ng/ μ L

Tabela 3: Sequências de *primers* específicos utilizados na análise da expressão gênica de oócitos e embriões bovinos submetidos ao 17AAG e ao choque térmico.

Genes	Sequência 5'-3' do <i>primer</i>	Temperatura de ligação	Tamanho do produto	Nº de acesso no GenBank/Referência
<i>YWHAZ</i>	F GCAAAAGACGGAAGGTGCTG R CCTCAGCCAAGTAGCGGTAG	59°C	197pb	NM_174814.2
<i>GAPDH</i>	F GGCCTGAACCACGAGAAGTATAA R CCCTCCACGATGCCAAAGT	53°C	120pb	Leutenegger et al. (2000)
<i>β-ACTINA</i>	F CAGGCTCTCTTCCAGCCTTC R GGGCAGTGATCTCTTTCTGC	53°C	184pb	NM_173979.3
<i>c-MOS</i>	F CACCTTGACACAGGTCATCT R GATGTCGGCCTTGGGTGTAA	59°C	325pb	XM_590874.5
<i>MAPK1</i>	F CCTGCTCTCTTCCACACA R TCATCGCTCGGGTCGTAGTA	59°C	177pb	NM_175793.2
<i>MATER</i>	F TAATGACGACGCTGTGTTCTG R GCGGTTCTCAGGTTCTTCAG	53°C	206pb	NM_001007814
<i>ZAR1</i>	F TGCCGAACATGCCAGAAG R TCACAGGATAGGCGTTTG	53°C	188pb	NM_001076203
<i>GDF9</i>	F GACCCCTAAATCCAACAGAA R AGCAGATCCACTGATGGA	53°C	120pb	NM-174681
<i>HSF1</i>	F ACTCCAACCTGGACAACCTG R TGAGTCTGGGCTGCTTTTCT	59°C	209pb	XM_010811828.2
<i>HSF2</i>	F AGCAAAACATGCACAACAGC R AAATCCGCTCCCTTGACTTT	55°C	233pb	NM_001083405
<i>HSP90A1</i>	F GAGGATCCCCAGACACATGC R GACGTGTCGTCTCCTTC	62°C	143pb	NM_001012670.2
<i>HSP70.1</i>	F AACAAGATCACCATACCAACG R TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG	59°C	192pb	NM_174550
<i>HSP40</i>	F AGGACTGACCAGGGACCTTT R AGACTGCATTGCCTTTGCTT	55°C	220pb	NM_001033763.1
<i>OCT4</i>	F GCTTGATCGTTTGCCCTTCT R CCCACCCTGCAGCAAATTA	55°C	105pb	XM_019985832.1

5.3.7. Análise da progressão da meiose

Após as 24h de maturação, os oócitos foram retirados do meio contendo TCM199, adicionados em tubo falcon contendo 1 mL de TALP e vortexados por 5 minutos para remoção das células do cumulus. Posteriormente, foram lavados em solução de PBS 0,1% de PVA três vezes e fixados por 30 minutos em paraformaldeído 4%. Após a fixação, os oócitos foram novamente lavados em solução 0,1% de PVA.

Os oócitos foram incubados por 10 minutos em solução corante (5 mL de PBS com PVA + 25 µL de Hoechst 33342 estoque [1mg/mL]) à temperatura ambiente no escuro. Após esse procedimento, cada tratamento foi lavado três vezes em solução de PVA e os oócitos transferidos para solução de montagem (6,25 mL PBS com PVA + 6,25 mL de Glicerol + 6,25µL Hoechst 33342). A partir daí, foram colocados sobre lâmina de vidro cobertos com lamínula. A taxa de maturação foi avaliada em aumento de 400x em microscopia de fluorescência. No total, três réplicas por tratamento foram realizadas.

5.3.8. Análise da organização da cromatina

Para avaliar a estrutura organizacional do núcleo foi realizada análise da trimetilação na lisina 9 da histona 3 (H3K9m3), assim como análise de proteína heterocromatina 1 (HP1), em embriões de 4 e 8 células, usados como marcadores de heterocromatina. Os embriões foram fixados em paraformaldeído 4% e estocados em geladeira previamente. Inicialmente os embriões foram permeabilizados com Triton 100x por 30 minutos e então incubados com albumina sérica bovina 2% por 1h para saturar os sítios de ligação inespecíficos. Incubação com os anticorpos primários *anti-mouse* HPB1β (diluição de 1/200) e *anti-rabbit* H3K9me3 (diluição de 1/500) foi realizada *over night*. No dia seguinte, os embriões foram lavados e incubados com os anticorpos secundários (isotiocianato de fluoresceína [FITC] para H3K9m3 e Rodamina para HP1) por 1h em temperatura ambiente. Em seguida, os embriões foram corados com DAPI e fixados em lâmina com meio *anti-fade*.

A captura das imagens foi realizada em 3D em microscópio confocal Zeiss LSM 510 META, equipado com lasers para 488, 543 e 633nm, disponível

no laboratório RIO-IBiSA MIMA2 em Jouy-en-Josas, INRA. Os núcleos foram classificados de acordo com o padrão de distribuição de imunofluorescência observado em: difuso, difuso com pequenas manchas e concentrado com grandes manchas. A proporção de embriões com núcleos apresentando os diferentes padrões foi comparada entre tratamentos.

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de clivagem e de blastocistos foram analisadas por Modelo Linear Geral (Proc GLM) e as médias comparadas pelo teste Student Newman Keulus. O índice apoptótico e a proporção de maturação nuclear foram analisados por Regressão Logística (Proc Logistic) e o número total de células e de células apoptóticas foram analisados pelo Modelo Linear Misto (Proc Mixed) utilizando o *software* estatístico SAS (versão 9.1).

A eficiência do primer foi calculada utilizando o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003) e utilizado para quantificação. Os resultados do grupo endógeno de referência e controle foram analisados pelo *software* REST® (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002), considerando $p < 0,05$ nível de significância. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média.

6. RESULTADOS

6.1. EXPERIMENTO 1

6.1.1. Determinação do tempo de incubação e a dose de inibidor de HSP90 (17AAG) necessários para afetar o desenvolvimento embrionário

Foram testadas três concentrações (0, 1 e 2 μ M) de 17AAG por 12 e 24h durante a maturação por 24h. Os oócitos que foram expostos a 2 μ M de inibidor da HSP90 por 24h apresentaram menor expansão das células do cumulus em relação a 0 μ M. Na **Figura 4** é mostrada a morfologia dos oócitos maturados na presença de 17AAG adicionado ao meio de maturação.

Não houve interação ($p>0,05$) entre tempo de exposição e concentração de 17AAG. Foi observado que a concentração de 2 μ M reduziu as taxas de blastocistos no D7 ($p<0,02$) e D8 ($p<0,01$) em relação a 0 μ M enquanto a concentração de 1 μ M resultou em valores intermediários entre 0 e 2 μ M (**Tabela 4**).

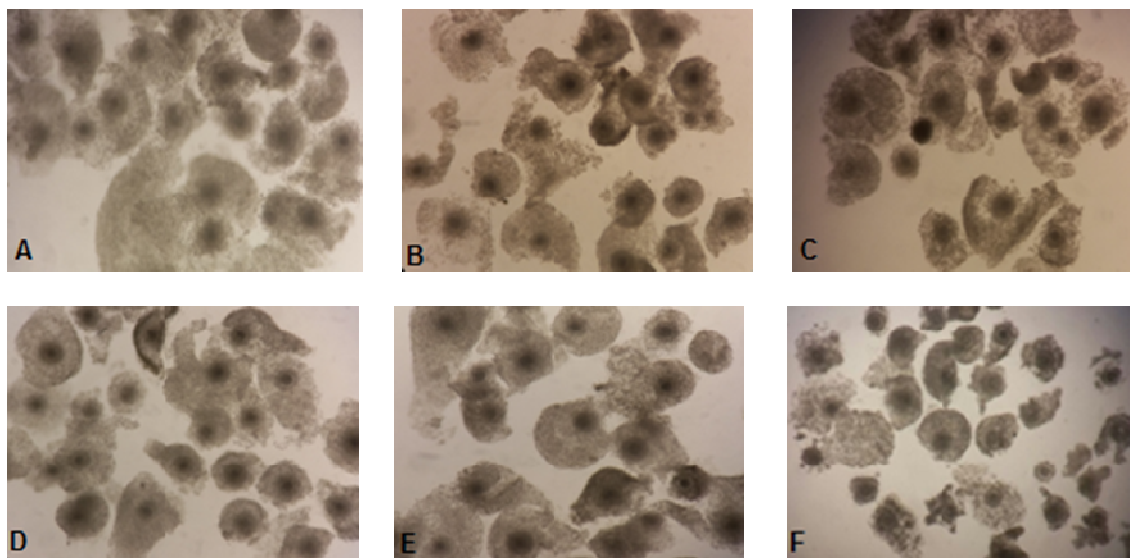


Figura 4: Morfologia dos oócitos maturados *in vitro* por 24h, distribuídos aleatoriamente em 6 tratamentos conforme a concentração do 17AAG e o tempo de exposição. A, B, C = 0, 1 e 2 μ M de 17AAG, respectivamente, submetidos a 12h de exposição ao inibidor; D, E, F= 0, 1 e 2 μ M de 17AAG, respectivamente, submetidos a 24h de exposição ao inibidor.

Tabela 4. Taxas de clivagem e de produção de embriões bovinos nos dias 7 (BLD7) e 8 (BLD8) expostos a diferentes concentrações de 17AAG durante a maturação oocitária.

Concentração de 17AAG	n	Clivagem (%)	BLD7 (%)	BLD8 (%)
0 μ M	591	70,8 \pm 2,1	29,2 \pm 2,5 ^a	34,0 \pm 3,3 ^a
1 μ M	627	66,5 \pm 2,7	25,6 \pm 2,7 ^{ab}	27,9 \pm 3,1 ^{ab}
2 μ M	618	63,2 \pm 2,7	18,6 \pm 2,2 ^b	20,4 \pm 2,2 ^b

Valores com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna diferem ($p < 0,05$). Valores são mostrados como média \pm epm. n= número de oócitos.

Entretanto, em relação ao tempo de exposição dos oócitos ao inibidor 17AAG, não houve diferença ($p > 0,05$) nas taxas de clivagem no D3 e de blastocistos no D7 e no D8 entre 12h e 24h (**Tabela 5**).

Tabela 5. Taxas de clivagem e de produção de embriões bovinos nos dias 7 (BLD7) e 8 (BLD8) expostos ao 17AAG durante a maturação oocitária em diferentes tempos de exposição.

Tempo de exposição ao 17AAG	n	Clivagem (%)	BLD7 (%)	BLD8 (%)
12h	842	66,06 \pm 1,9	26,6 \pm 2,2	29,4 \pm 2,9
24h	994	67,7 \pm 2,3	22,3 \pm 2,0	25,5 \pm 2,2

Não houve diferença ($p > 0,05$). Valores são mostrados como média \pm epm. n= número de oócitos.

6.1.2. Avaliação do índice apoptótico em blastocistos com 192h pós-fecundação

Os embriões gerados a partir dos oócitos tratados com diferentes concentrações de inibidor da HSP90 e tempos de exposição foram avaliados para apoptose pela técnica de TUNEL (**Figura 5**) quanto à quantidade total de células, de células apoptóticas e o índice de células apoptóticas nos blastocistos em D8. Os dados agrupados mostraram haver diferença no índice de células apoptóticas, número total de células e número de células apoptóticas.

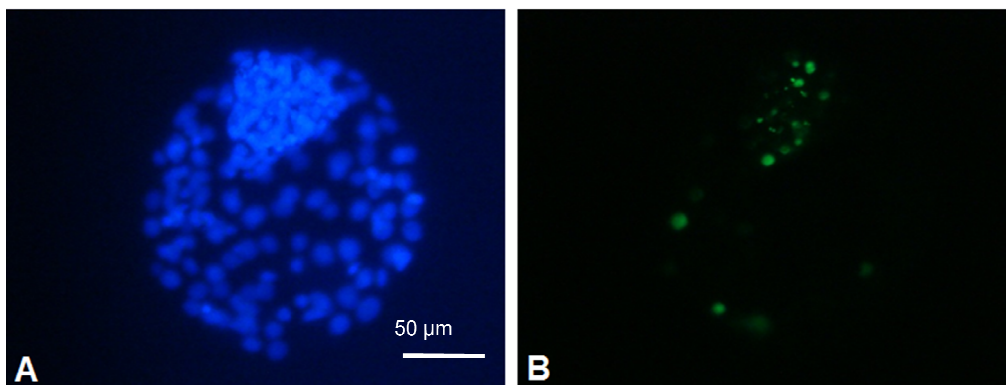


Figure 5. Imagens de embrião bovino oriundo de oócito submetido ao tratamento com 17AAG durante a maturação *in vitro*, mostrando a detecção da fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL sob aumento de 400x. A) Blastômeros de blastocistos marcados pelo DAPI e visualizados em azul no filtro de 460 nm. B) Blastocistos apresentando blastômeros sendo visualizados em verde corados pela fluoresceína no filtro 520 nm, indicando apoptose.

O índice de células apoptóticas em embriões foi menor ($p < 0,05$) para a concentração de 2 μM de 17AAG ($18,69 \pm 1,15$) em relação a 0 μM ($20,69 \pm 1,64$) e 1 μM ($21,23 \pm 1,67$) (**Figura 6A**). Houve efeito ($p < 0,05$) da dose e do tempo quando os oócitos foram expostos à concentração de 2 μM do inibidor durante as 24h de maturação ($p < 0,05$). O índice apoptótico com 24h de exposição ao 17AAG foi $21,10 \pm 1,10\%$ e para a exposição por 12h foi $19,13 \pm 1,56\%$ (**Figura 6B**).

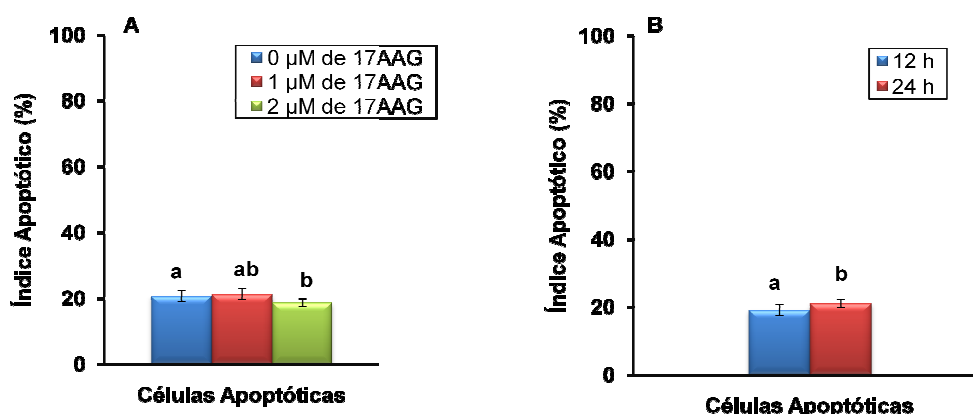


Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de 17AAG (A) e tempos de exposição (B) na maturação *in vitro* de oócitos no índice apoptótico de blastocistos no 8º dia de cultivo. Valores com diferentes letras sobrescritas diferem entre os tratamentos ($p < 0,05$).

O número total de células embrionárias foi afetado pela exposição dos oócitos ao 17AAG durante a maturação *in vitro*. A concentração de 2 μM de 17AAG reduziu o número de células embrionárias ($113,82 \pm 5,81$) em comparação ao grupo controle ($131,31 \pm 7,88$). O número de células apoptóticas foi $25,51 \pm 3,03$; $24,22 \pm 1,73$ e $21,60 \pm 1,84$, respectivamente para 0, 1 e 2 μM de 17AAG (**Figura 7A**).

A exposição ao inibidor da HSP90 durante 12 e 24h resultou em redução do número de células embrionárias ($134,92 \pm 6,93$; $113,36 \pm 3,81$; respectivamente) quando os oócitos foram expostos por mais tempo ao 17AAG durante a maturação *in vitro* (**Figura 7B**).

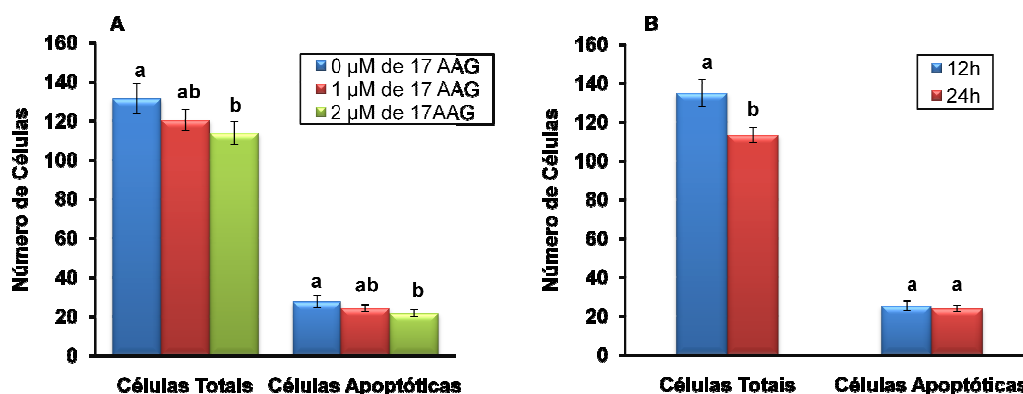


Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de 17AAG (A) e tempos de exposição (B) na maturação *in vitro* de oócitos no número total de células e de células apoptóticas de blastocistos no 8º dia de cultivo. Valores com diferentes letras sobrescritas diferem entre os tratamentos ($p < 0,05$).

6.1.3. Avaliação da expressão gênica em oócitos tratados durante a maturação *in vitro* com diferentes concentrações de 17AAG (0, 1 e 2 μM) por 12 h de exposição

Oócitos expostos durante as primeiras 12h ao inibidor, não mostraram diferença ($p > 0,05$) entre o grupo 1 μM de 17AAG e o grupo controle (0 μM) na quantidade de transcritos dos genes *c-MOS* ($0,99 \pm 0,16$), *MAPK1* ($0,98 \pm 0,21$), *MATER* ($1,08 \pm 0,17$), *ZAR1* ($1,12 \pm 0,18$), *GDF9* ($1,12 \pm 0,23$), *HSF1* ($1,08 \pm 0,14$) e *HSP90A1* ($0,81 \pm 0,13$). Entretanto, houve uma menor quantidade de transcritos

($p < 0,05$) de *HSP70.1* ($0,76 \pm 0,11$). Para o grupo em que foi adicionado 2 μM de 17AAG ao meio de maturação, houve diferença ($p < 0,05$) para os genes *GDF9* ($0,78 \pm 0,13$) e *HSF1* ($1,39 \pm 0,22$), que foram sub-expresso e super-expresso, respectivamente, em relação ao grupo controle. Não houve diferença ($p > 0,05$) para *c-MOS* ($1,05 \pm 0,18$), *MAPK1* ($0,83 \pm 0,14$), *MATER* ($0,97 \pm 0,15$), *ZAR1* ($0,90 \pm 0,14$), *HSP70.1* ($0,84 \pm 0,13$) e *HSP90A1* ($0,79 \pm 0,11$) (**Figura 8**).

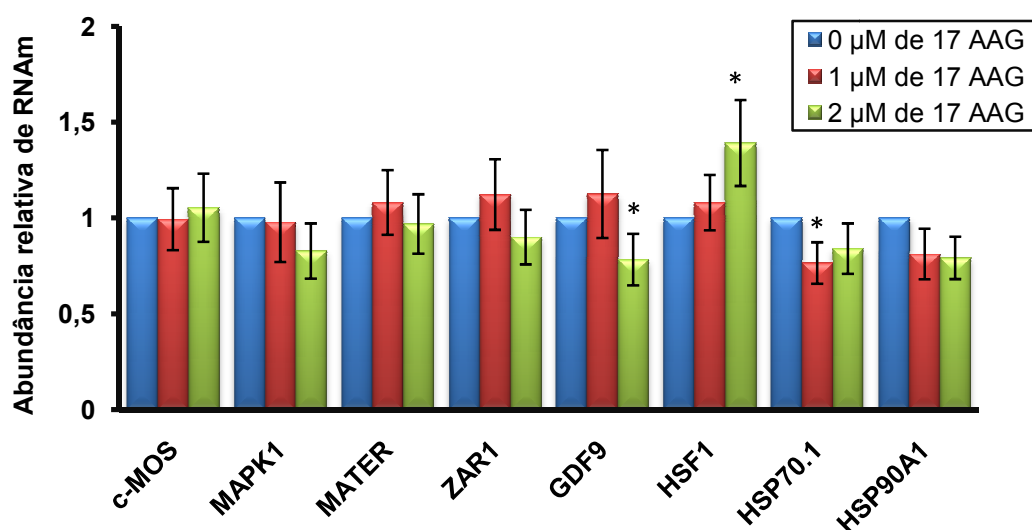


Figura 8: Avaliação da abundância dos transcritos *c-MOS*, *MAPK1*, *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *HSF1*, *HSP70.1* e *HSP90A1* em oócitos maturados *in vitro* por 24h, submetidos às concentrações de 0, 1 e 2 μM durante 12h de exposição. A presença de (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$).

6.1.4. Avaliação da expressão gênica em oócitos tratados durante a maturação *in vitro* com diferentes concentrações de 17AAG (0, 1 e 2 μM) por 24 h de exposição

Quando os oócitos foram expostos ao 17AAG por 24h na maturação, não houve diferença ($p > 0,05$) entre o grupo 1 μM e o grupo controle (0 μM) na quantidade de transcritos para os genes *c-MOS* ($0,98 \pm 0,38$), *MAPK1* ($1,10 \pm 0,42$), *MATER* ($0,98 \pm 0,39$), *GDF9* ($1,14 \pm 0,46$), *HSF1* ($1,08 \pm 0,38$), e *HSP90A1* ($0,81 \pm 0,33$). Apenas *ZAR1* ($0,80 \pm 0,34$) e *HSP70.1* ($0,44 \pm 0,16$) apresentaram diminuição na quantidade de transcritos ($p < 0,05$). Para o grupo com 2 μM do inibidor, a quantidade de transcritos dos genes *c-MOS*

($0,99 \pm 0,37$), *MAPK1* ($1,02 \pm 0,40$), *MATER* ($1,03 \pm 0,39$), *ZAR1* ($0,89 \pm 0,38$), *GDF9* ($1,17 \pm 0,49$), *HSP90A1* ($0,99 \pm 0,35$) não diferiu ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle. Houve sub-expressão do gene da *HSP70.1* e super-expressão de *HSF1* ($p < 0,05$; $0,52 \pm 0,17$ e $1,43 \pm 0,48$; respectivamente) (**Figura 9**).

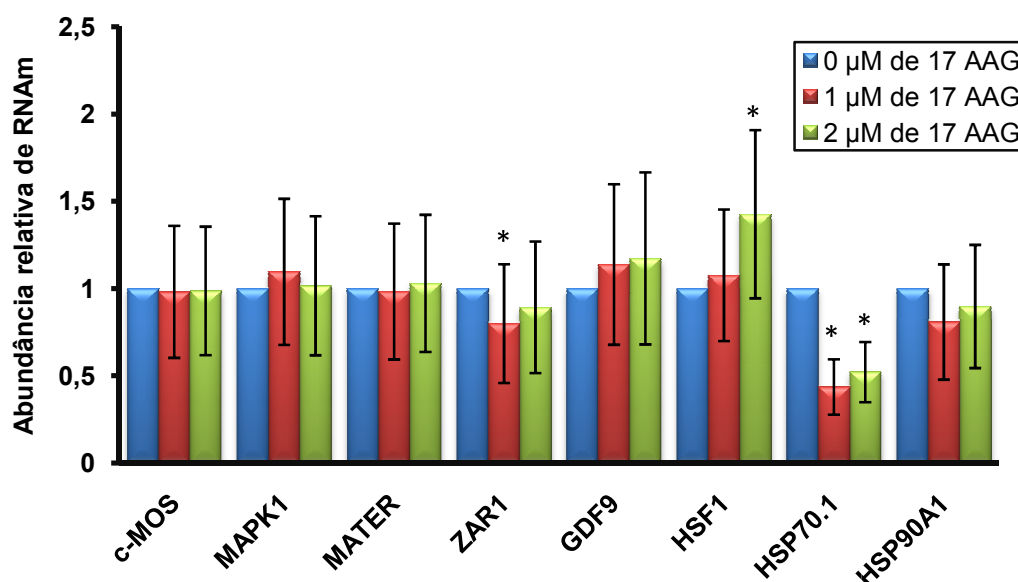


Figura 9: Avaliação da abundância dos transcritos *c-MOS*, *MAPK1*, *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *HSF1*, *HSP70.1* e *HSP90A1* em oócitos maturados *in vitro* por 24h, submetido às concentrações de 0, 1 e 2 μM durante 24 h de exposição. A presença de (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$).

6.1.5. Curvas de dissociação dos genes analisados

Foram utilizados nas análises os três genes endógenos e os coeficientes de variação para *YWHAZ*, *GAPDH* e β -*ACTINA* foram 2,87; 2,63 e 2,83; respectivamente.

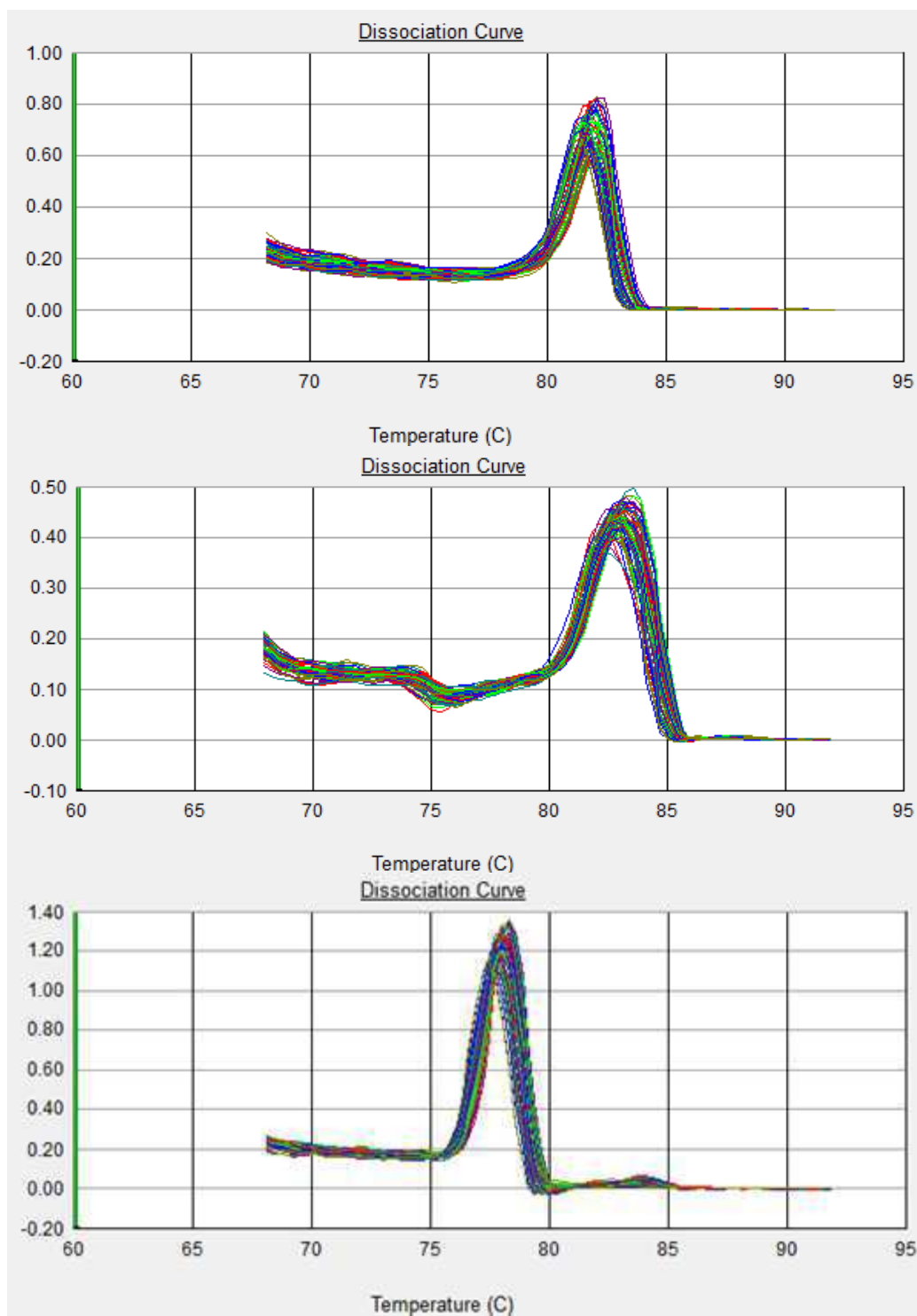


Figura10: Curvas de dissociação dos genes endógenos, *YWHAZ*, *GAPDH* e β -*ACTINA*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 77,9°C; 81,6°C e 82,8°C, respectivamente.

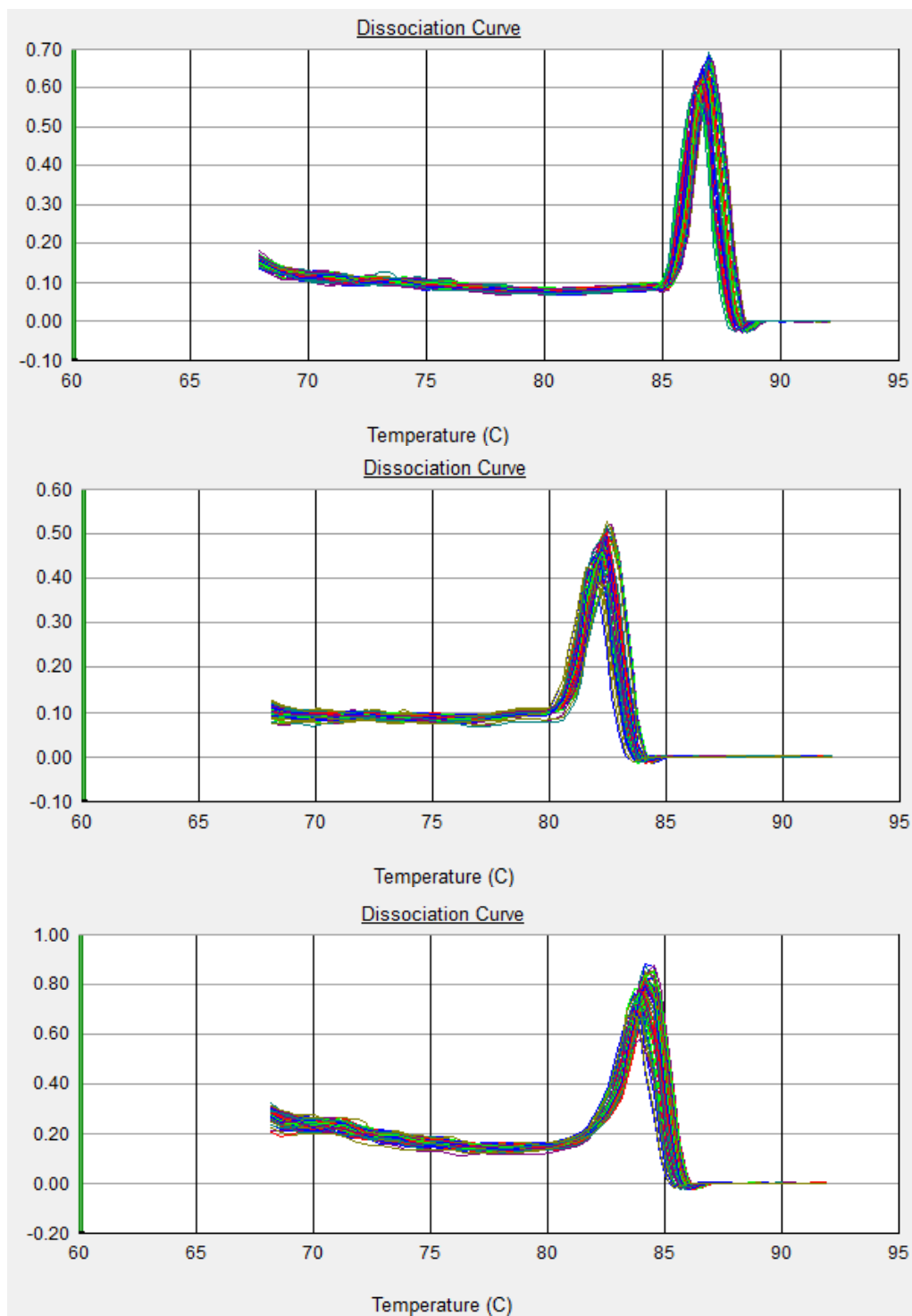


Figura11: Curvas de dissociação dos genes *c-MOS*, *MAPK1* e *MATER*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 86,2°C; 82,3°C e 82,2°C, respectivamente.

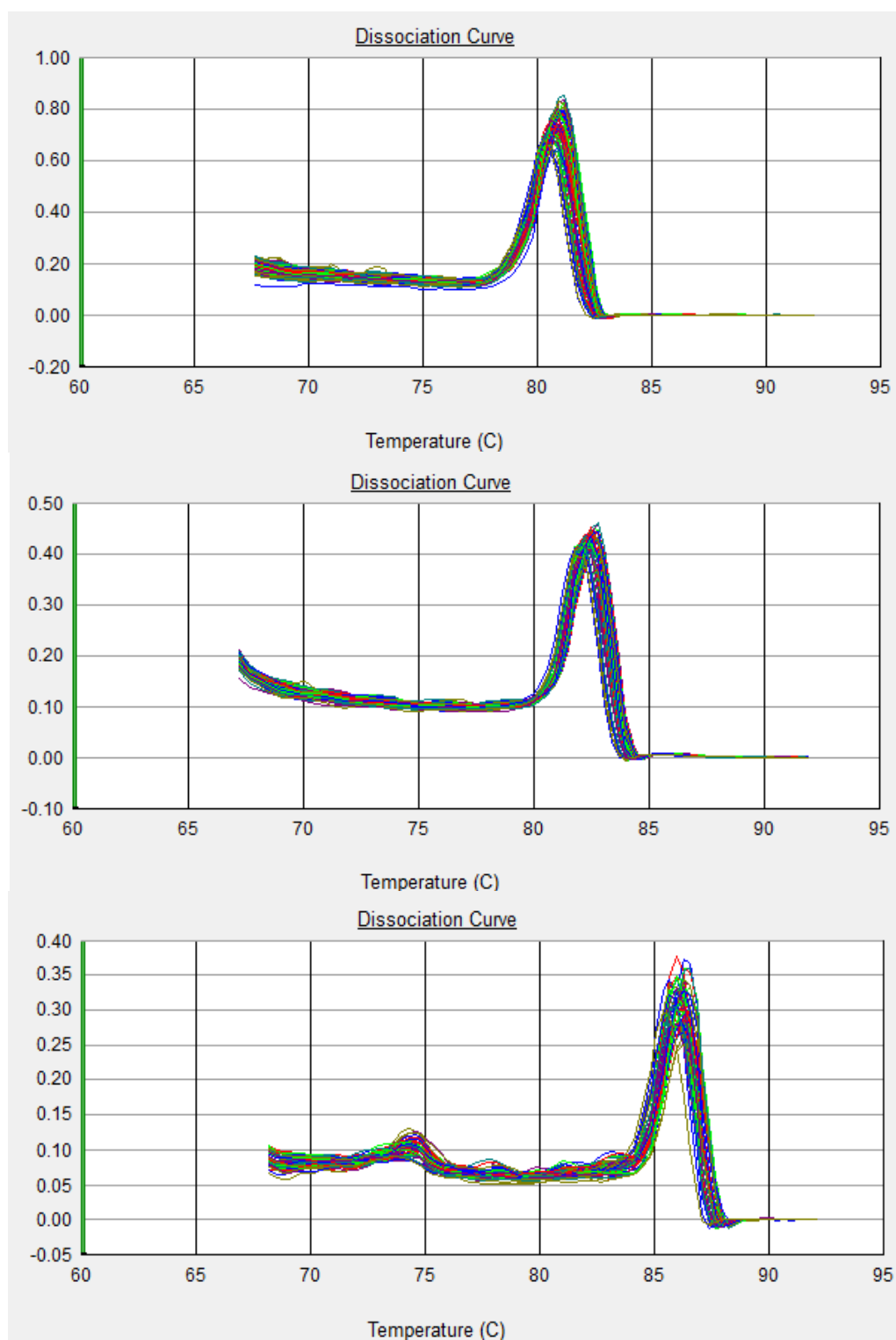


Figura12: Curvas de dissociação dos genes *ZAR1*, *GDF9* e *HSF1*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 80,7°C; 82,3°C e 85,6°C, respectivamente.

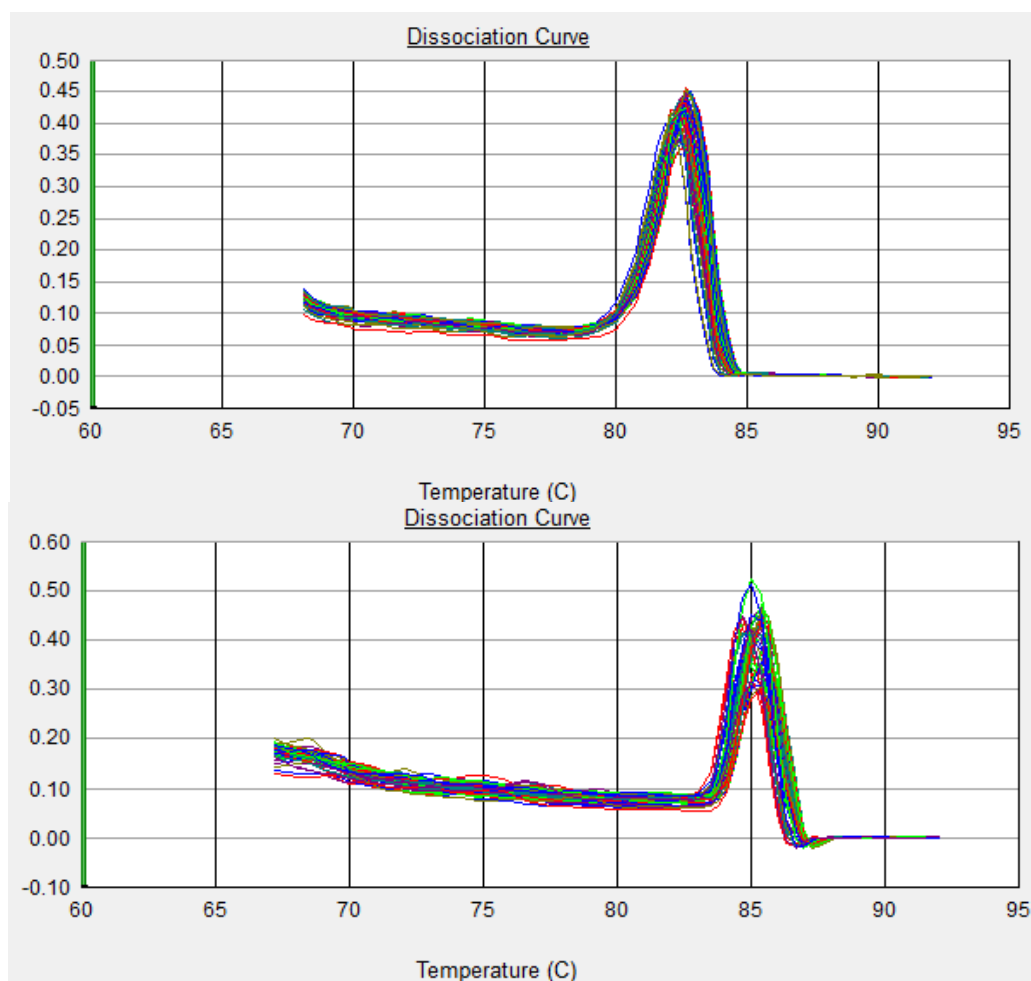


Figura13: Curvas de dissociação dos genes *HSP90A1* e *HSP70.1*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 82,2°C e 84,1°C, respectivamente.

5.1.6. Análiseda progressão da meiose

Pela análise da maturação dos oócitos submetidos à microscopia de fluorescência (**Figura 14**), não houve diferença na taxa de maturação nuclear entre as diferentes doses de inibidor e tempos de exposição (**Tabela 6**).

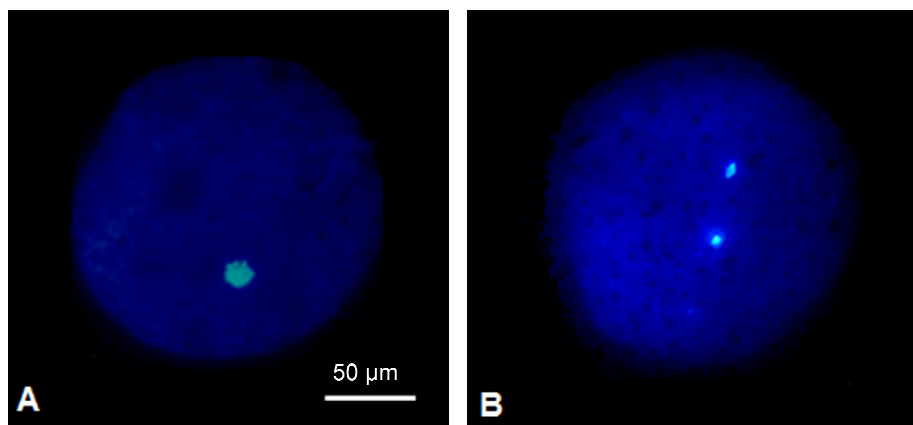


Figura 14: Fases da maturação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342 submetidos ao 17AAG durante a maturação *in vitro* e avaliados sob microscopia de fluorescência por DAPI e visualizados sob aumento de 400x no filtro de 460nm em azul. A) Oócitos em metáfase I; B) Oócitos em metáfase II.

Tabela 6: Avaliação da maturação de oócitos bovinos corados com Hoechst 33342 submetidos às doses 0, 1 ou 2 µM do inibidor 17AAG por 12 ou 24h de exposição e avaliados sob microscopia de fluorescência.

Oócitos	n	0 µM de 17AAG (%)	1 µM de 17AAG (%)	2 µM de 17AAG (%)	12h (%)	24h (%)
Imaturos	115	23,57±2,26	22,65±2,85	23,59±4,43	21,15±2,64	25,39±2,48
Maturados	385	76,43±2,26	77,35±2,85	76,40±4,43	78,85±2,64	74,61±2,48

Não houve diferença significativa ($P>0,05$). Valores são mostrados como média \pm epm.

6.2. EXPERIMENTO 2

6.2.1. Avaliação do efeito do choque térmico e da inibição da atividade da HSP90 na produção de embriões

A clivagem foi avaliada no dia 3 (D3) e os blastocistos foram avaliados nos dias 7 (D7) e 8 (D8) após a fertilização. Não houve diferença ($p>0,05$) na taxa de clivagem entre os tratamentos. A inibição da HSP90 pela exposição ao 17AAG por 12 ou 24 h e o choque térmico por 12 h durante a maturação *in vitro* reduziram a taxa de blastocisto em D7 ($p<0,01$) e D8 ($p<0,05$) quando comparados ao controle. Semelhantemente aos tratamentos com inibidor de

HSP90, o choque reduziu a competência do oócitos em produzir blastocistos (**Tabela 7**).

Em adição, a inibição da HSP90 por 24 h de exposição e o choque térmico reduziram ($p<0.05$) a proporção de embriões eclodidos no D8 ($9,5\pm5,0\%$ e $13,8\pm5,1\%$, respectivamente) quando comparados ao controle ($35,8\pm3,9\%$).

Tabela 7. Taxas de clivagem e de produção de embriões bovinos nos dias 7 (BLD7) e 8 (BLD8) expostos a 2 μ M de 17AAG por 12 h (17AAG/12h) ou por 24 h (17AAG/24h) e ao choque térmico (CT) por 12 h durante a maturação *in vitro*.

Tratamentos	n	Clivagem (%)	BLD7 (%)	BLD8 (%)
Controle	240	74,2 \pm 4,1	31,8 \pm 2,5 ^a	34,1 \pm 2,9 ^a
17AAG/12h	250	68,2 \pm 6,8	20,4 \pm 3,0 ^b	22,6 \pm 4,1 ^b
17AAG/24h	243	52,6 \pm 5,8	14,3 \pm 2,6 ^b	16,9 \pm 2,7 ^b
CT/12h	230	64,5 \pm 5,4	19,0 \pm 3,5 ^b	21,2 \pm 3,8 ^b

Valores com diferentes letras sobscritas na mesma coluna diferem ($p<0,05$). Valores são mostrados como média \pm epm. n= número de oócitos.

6.2.2. Avaliação do índice apoptótico e do número de células de blastocistos no D8 pós-fecundação *in vitro*

Menor ($p<0,05$) índice de apoptose foi observado no controle e no tratamento com 2 μ M do inibidor por 24 h comparado aos tratamentos com 2 μ M do inibidor por 12 h e no estresse térmico. O choque térmico aumentou o índice apoptótico semelhante ao observado com inibição da HSP90 por 12 h de maturação (**Figura 15**). Contudo, não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos quanto aos parâmetros de células totais (113,15 \pm 6,62; 105,28 \pm 6,50; 102,06 \pm 6,10; 96,40 \pm 6,92). Em relação ao número de células apoptóticas (10,05 \pm 0,99; 13,78 \pm 1,46; 10,00 \pm 0,92; 12,45 \pm 1,22), houve diferença entre os tratamentos ($p<0,05$) (**Figura 16**).

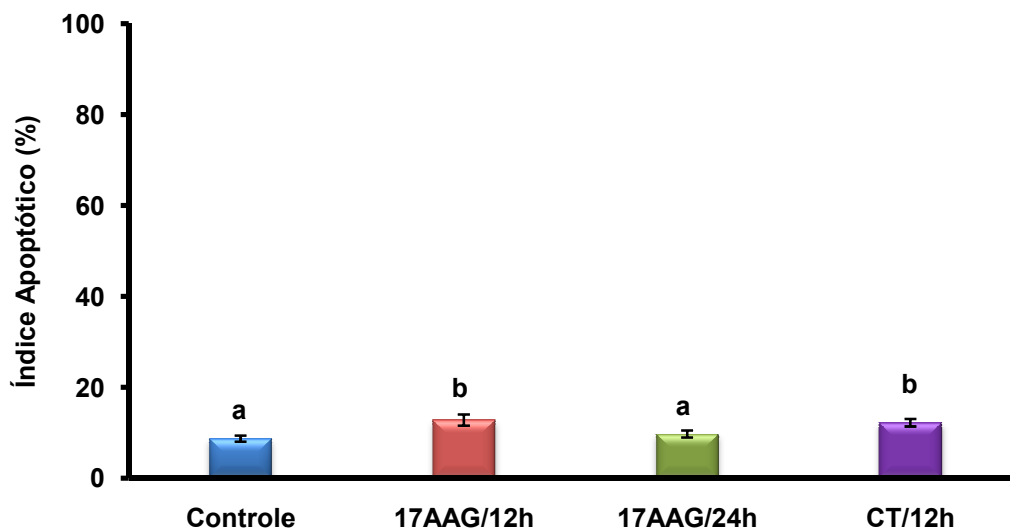


Figura 15. Efeito da exposição ao 17AAG por 12 ou 24h e ao choque térmico (CT) por 12h durante a maturação *in vitro* de oócitos no índice apoptótico de blastocistos no 8º dia de cultivo. Valores com diferentes letras sobrescritas diferem entre os tratamentos ($p < 0,05$). Controle por 24h; 17AAG/12h – tratamento com 2µM de 17AAG por 12h; 17AAG/24h – tratamento com 2µM de 17AAG por 24h; CT/12h – choque térmico por 12h.

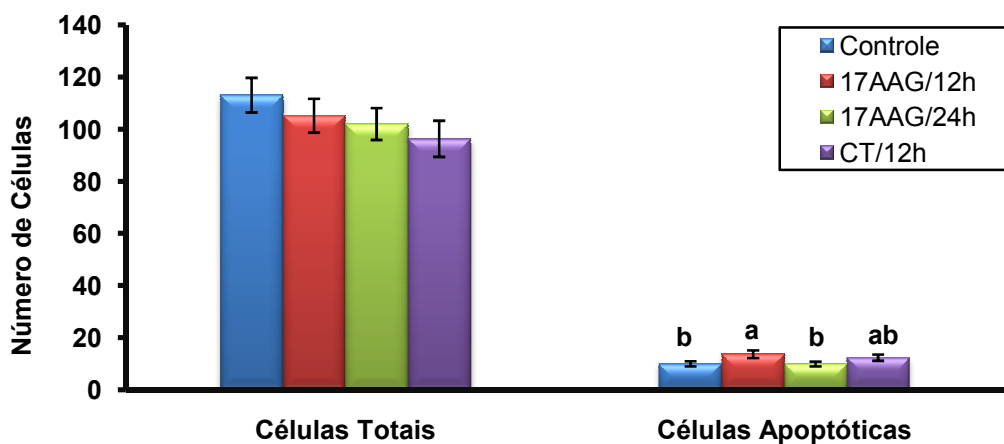


Figura16: Efeito da exposição ao 17AAG por 12 e 24h e ao choque térmico (CT) por 12h durante a maturação *in vitro* de oócitos no número total de células e de células apoptóticas de blastocistos no 8º dia de cultivo. Valores com diferentes letras sobrescritas diferem entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Controle por 24h; 17AAG/12h – tratamento com 2µM de 17AAG por 12h; 17AAG/24h – tratamento com 2µM de 17AAG por 24h; CT/12h – choque térmico por 12h.

6.2.3. Efeito do choque térmico no remodelamento da cromatina de embriões em estágios iniciais do desenvolvimento

Foi avaliada a distribuição da proteína de heterocromatina 1 (HPB1) e a trimetilação da lisina 9 na histona 3 (H3K9Me3), ambos relacionados com a formação de heterocromatina. A imunocoloração fluorescente foi aplicada em embriões bovinos em estágios iniciais de desenvolvimento com anticorpos para HP1 e H3K9Me3. Os embriões foram observados sob microscópio confocal e a análise visual revelou três padrões identificados segundo os critérios morfológicos: difuso, difuso com pequenas manchas e concentrado com grandes manchas.

Embriões em estágio de 4 células provenientes do choque térmico mostraram um aumento ($p < 0,01$) na proporção de núcleos concentrados em grandes manchas para H3K9me3 (44%; 28/64 núcleos) quando comparado ao controle (5%; 4/72 núcleos). No estágio de 8 células, a distribuição de H3K9me3 foi menor ($p < 0,01$) para núcleos de embriões que receberam o choque térmico para esse mesmo padrão em relação ao controle (**Figura 17**).

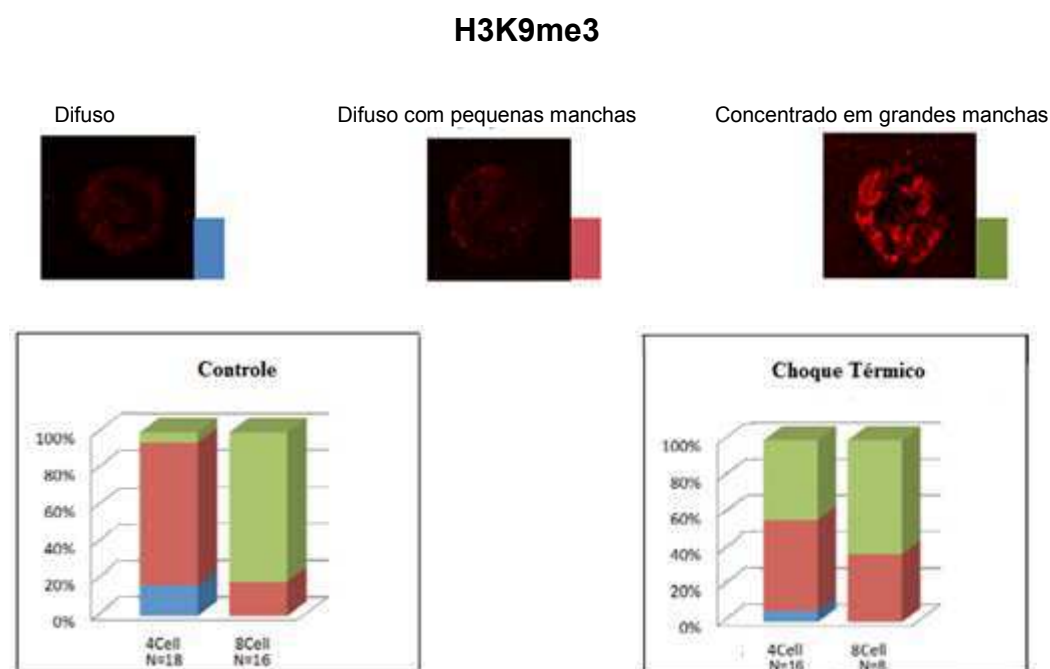


Figura17: Padrão de distribuição de trimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me3) em núcleos de embriões provenientes de oócitos controle expostos ao choque térmico 12h. N= número de embriões analisados em microscopia confocal. Eixo Y= porcentagem de núcleos.

O padrão de HP1 também diferiu entre embriões dos oócitos dos grupos controle e choque térmico. O padrão difuso com pequenas manchas de HP1 surgiu com maior ($p<0,01$) proporção nos embriões de 4 células originados de oócitos que receberam choque térmico (81%; 52/64 núcleos), enquanto que embriões provenientes do grupo controle apresentaram menor proporção (39%; 28/72 núcleos) de núcleos com esse mesmo padrão (**Figura 18**).

HP1

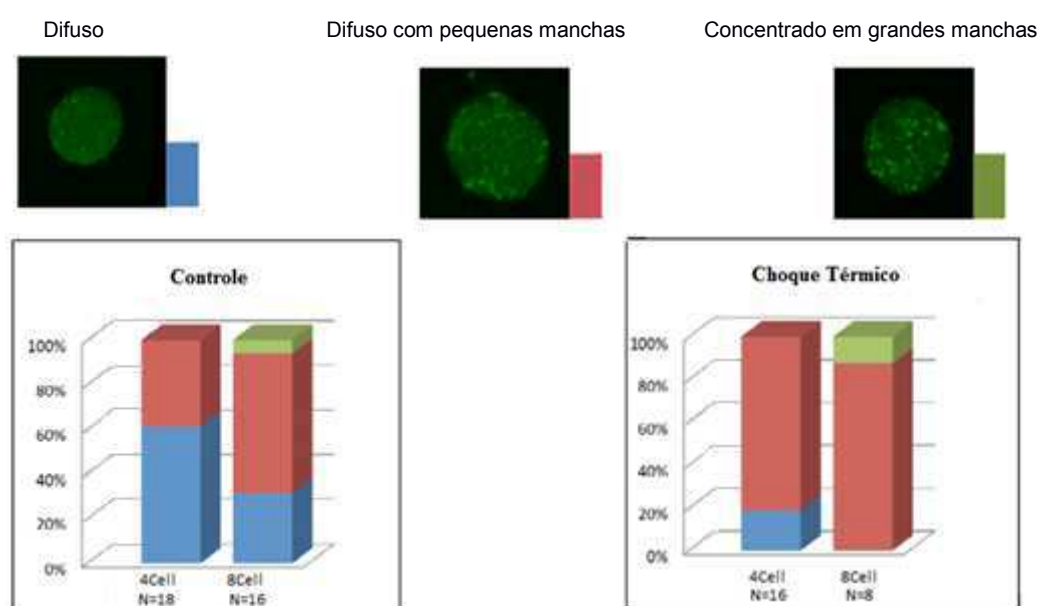


Figura18: Padrão distribuição da proteína de heterocromatina 1 (P1) em núcleos de embriões provenientes de oócitos controle e expostos ao choque térmico 12h. N= número de embriões analisados em microscopia confocal. Eixo Y= porcentagem de núcleos.

6.3. EXPERIMENTO 3

6.3.1. Avaliação das taxas de clivagem e de produção de embriões a partir de oócitos submetidos ao 17AAG, ao choque térmico e ao 17AAG durante o choque térmico.

Não houve diferença na a taxa de clivagem entre os tratamentos analisados, entretanto, os resultados para produção de blastocistos no D7 e no

D8 foram semelhantes entre os tratamentos 17AAG e choque térmico (**Tabela 8**).

Tabela 8: Taxas de clivagem e de produção de embriões bovinos nos dias 7 (BLD7) e 8 (BLD8) para os tratamentos Controle, 2 μ M de 17AAG com 12 h de exposição, CT (Choque Térmico) por 12 h e 2 μ M de 17AAG+CT por 12 h, durante a maturação *in vitro*.

Tratamentos	n	Clivagem (%)	BLD7 (%)	BLD8 (%)
Controle	315	73,35 \pm 4,59	32,67 \pm 3,76 ^a	33,54 \pm 4,08 ^a
17AAG	298	60,39 \pm 7,85	22,44 \pm 2,39 ^b	23,01 \pm 1,94 ^b
CT	281	62,49 \pm 5,97	17,00 \pm 1,61 ^b	17,29 \pm 0,96 ^b
17AAG+CT	312	52,46 \pm 6,16	6,04 \pm 2,18 ^c	5,84 \pm 1,75 ^c

Valores com diferentes letras na mesma coluna diferem ($p < 0,05$). Valores são mostrados com média \pm epm

6.3.2. Avaliação da expressão gênica em embriões de 8 células a partir de oócitos tratados durante a maturação *in vitro* com inibidor 17 AAG, choque térmico e 17AAG durante o choque térmico

Os embriões de 8 células provenientes de oócitos expostos ao 17AAG durante a maturação não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) na quantidade de transcritos comparado ao controle para os genes *HSF1* (1,36 \pm 0,26), *HSF2* (0,42 \pm 0,15), *HSP90A1* (1,03 \pm 0,19), *HSP40* (0,89 \pm 0,19) e *OCT4* (0,85 \pm 0,19). Quando os embriões em estágio inicial receberam choque térmico durante as primeiras 12h de maturação oocitária, houve uma menor quantidade ($p < 0,02$) de transcritos de *HSP40* (0,80 \pm 0,28), entretanto, não houve diferença ($p > 0,05$) para os genes *HSF1* (1,02 \pm 0,39), *HSF2* (0,42 \pm 0,16), *HSP90A1* (0,82 \pm 0,27) e *OCT4* (1,07 \pm 0,37). Semelhante ao grupo CT, o grupo CT+17AAG, também mostrou quantidade reduzida de transcritos de *HSP40* ($p < 0,02$; 0,83 \pm 0,11), não havendo diferença ($p > 0,05$) na expressão dos demais genes *HSF1*, *HSF2*, *HSP90A1* e *OCT4* (1,02 \pm 0,17; 0,81 \pm 0,22; 1,29 \pm 0,21; 1,19 \pm 0,15; respectivamente) (**Figura 19**).

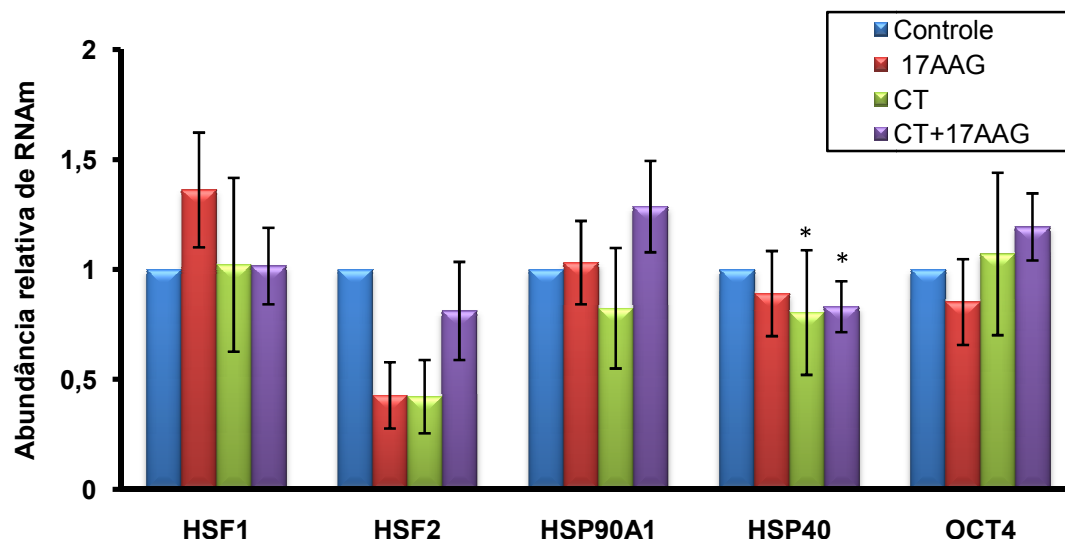


Figura 19: Avaliação da abundância dos transcritos para *HSF1*, *HSF2*, *HSP90A1*, *HSP40* e *OCT4* em embriões de 8 células provenientes de oócitos maturados *in vitro* por 24h, submetidos ao 17AAG por 12h (17AAG), ao choque térmico por 12h (CT) e ao 17AAG durante choque térmico (CT+17AAG). A presença de (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$).

Os embriões em estágio inicial provenientes de oócitos submetidos ao tratamento 17AAG não houve diferença ($p > 0,05$) na quantidade dos transcritos de *HSF1* ($1,30 \pm 0,48$), *HSF2* ($0,97 \pm 0,43$), *HSP90A1* ($1,24 \pm 0,45$), *HSP40* ($1,10 \pm 0,44$) e *OCT4* ($0,79 \pm 0,32$) em relação ao CT. Quando o tratamento CT+17AAG foi comparado ao CT, houve uma super-expressão ($p < 0,02$) do gene da *HSP90A1* ($1,58 \pm 0,55$), não havendo diferença ($p > 0,05$) para *HSF1* ($0,98 \pm 0,35$), *HSF2* ($1,87 \pm 0,73$), *HSP40* ($1,03 \pm 0,38$) e *OCT4* ($1,10 \pm 0,38$) (Figura 20).

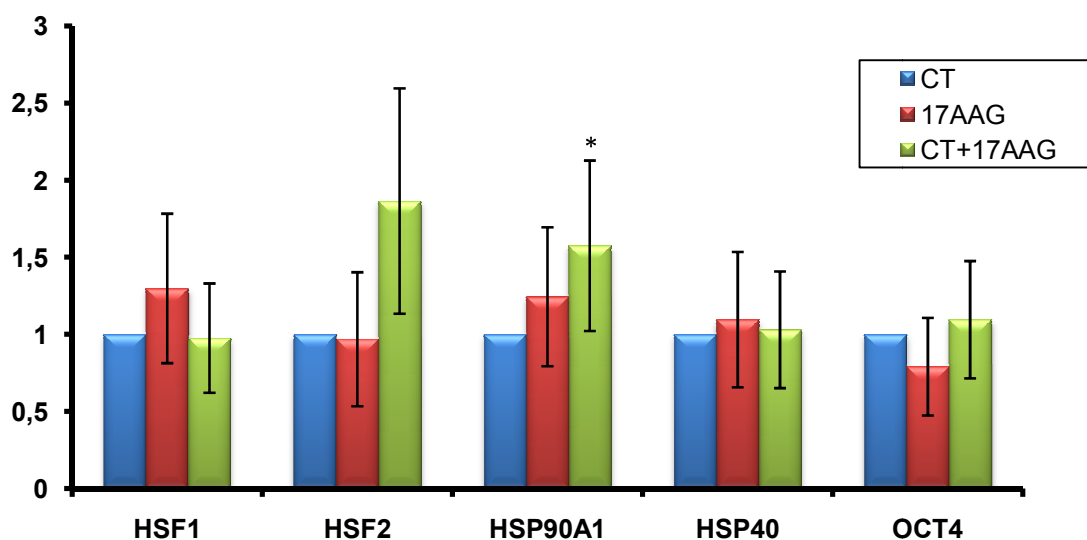


Figura 20: Avaliação da abundância dos transcritos para *HSF1*, *HSF2*, *HSP90A1*, *HSP40* e *OCT4* em embriões de 8 células provenientes de oócitos maturados *in vitro* por 24h, submetidos ao 17AAG por 12h e ao 17AAG associado ao choque térmico por 12h (CT+17AAG) em relação ao choque térmico (CT) por 12h. A presença de (*) indica diferença significativa ($p < 0,02$).

6.3.3. Curvas de dissociação dos genes analisados

Foram utilizados nas análises três genes endógenos, *YWHAZ*, *GAPDH* e β -*ACTINA*, e os coeficientes de variação foram 3,49%; 3,07% e 3,83%; respectivamente.

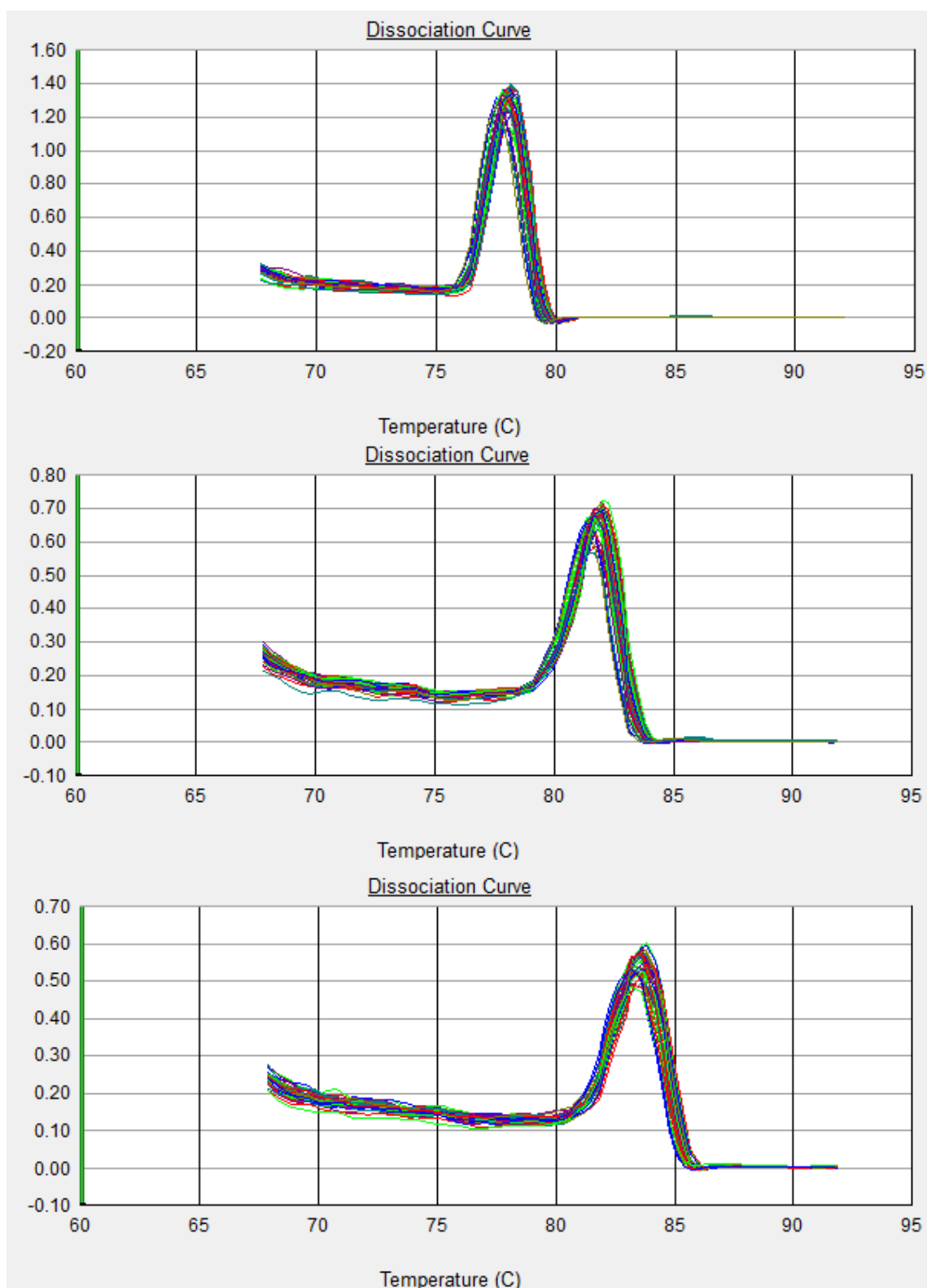


Figura 21: Curva de dissociação dos genes endógenos, *YWHAZ*, *GAPDH* e β -*ACTINA*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 78,27°C; 81,8°C e 83,55°C, respectivamente.

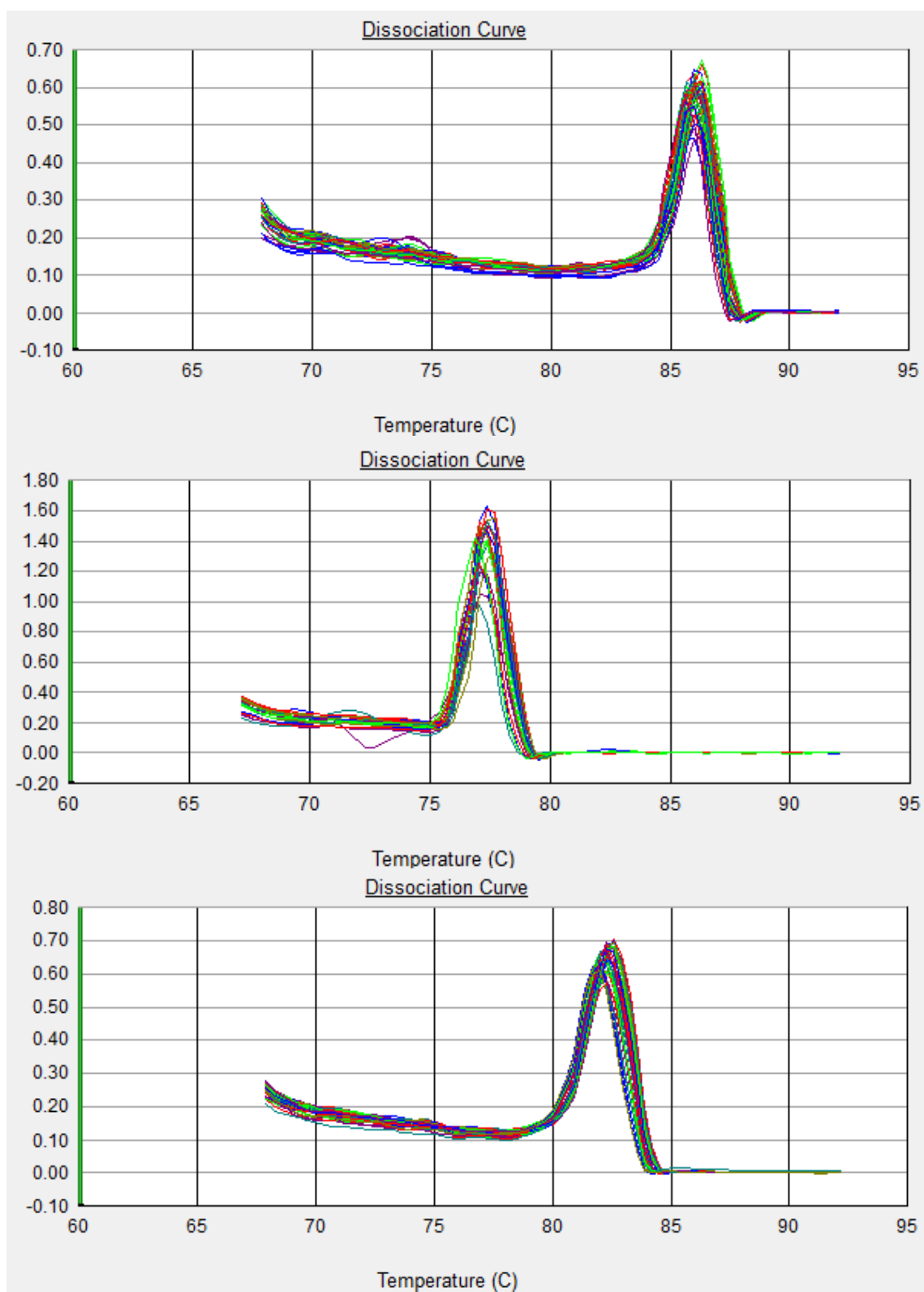


Figura 22: Curva de dissociação dos genes *HSF1*, *HSF2* e *HSP90A1*, resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 86,1°C; 77,93 e 82,0°C, respectivamente.

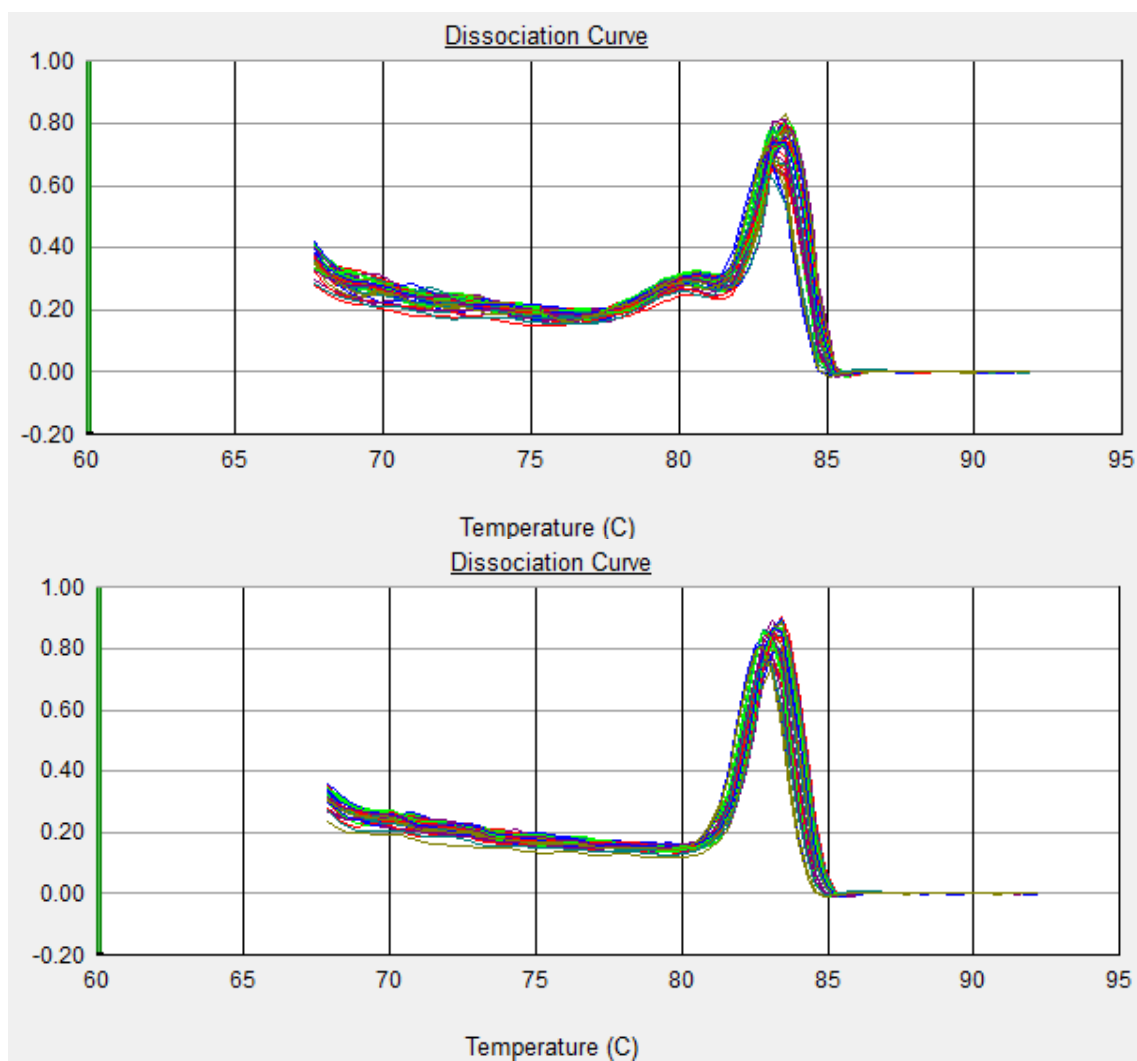


Figura 23: Curva de dissociação dos genes *HSP40* e *OCT4* resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 83,22°C e 82,8°C, respectivamente.

7. DISCUSSÃO

Experimento 1: Avaliação da exposição de oócitos ao 17AAG por 12 e 24 h durante a maturação

Os resultados obtidos utilizando o inibidor da HSP90, 17AAG, no experimento 1 mostraram que a concentração de 2 μ M reduziu a produção de embriões em relação à concentração de 0 μ M, determinando a importância desta proteína de choque térmico para a maturação e competência do oócito bovino. Embriões provenientes de oócitos que foram submetidos ao 17AAG durante a maturação foram capazes de se desenvolver e apesar de apresentarem morfologia aparentemente normal, sua capacidade de desenvolvimento mostrou-se comprometida pela análise de apoptose. Este efeito deletério envolvendo o processo de apoptose mostrou blastocistos com maior índice apoptótico e menor número de células quando os embriões eram provenientes de oócitos expostos ao 17AAG por 24h. Apoptose é um mecanismo que remove as células danificadas, sem comprometer a integridade de células circundantes e o desenvolvimento embrionário, entretanto, uma extensa apoptose pode deixar o embrião com poucas células para sustentar o desenvolvimento (MEIER et al., 2000; PAULA-LOPEZ e HANSEN, 2002a). Esta pode ter sido a razão pela queda na taxa de blastocistos quando os oócitos foram expostos a 2 μ M de 17AAG.

Nesse primeiro experimento também foi investigada a abundância de transcritos em oócitos no final do período de 24h de maturação *in vitro*, após a exposição a diferentes concentrações do inibidor 17AAG por 12 ou 24 h para os genes *c-MOS*, *MAPK1*, *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *HSF1*, *HSP70.1* e *HSP90A1*. A alteração dos transcritos confirmou a importância da HSP90 durante a maturação dos oócitos. Com a exposição dos oócitos por 12h a 1 μ M de 17AAG, houve uma diminuição na quantidade dos transcritos da *HSP70.1* e quando se aumentou a dose para 2 μ M, houve diminuição e aumento dos transcritos de *GDF9* e *HSF1*, respectivamente. Oócitos expostos à maior concentração do inibidor 17AAG por 12 h, tiveram menor quantidade de transcritos de *ZAR1* e *HSP70.1*. Quando a exposição permaneceu por 24h, os

transcritos para *HSP70.1* permaneceram diminuídos e o *HSF1* tornaram-se elevados.

Transcritos maternos e proteínas acumulados no oócito durante seu crescimento têm um papel crucial no sucesso do desenvolvimento embrionário inicial, antes da ativação do genoma o que em bovinos, acontece com 8-16 células (HAMATANI et al., 2004; MEIRELLES et al., 2004). O *GDF9* é um transcrito materno marcador de células germinativas produzido no oócito atuando nas células do cumulus e importante na comunicação oócito-células foliculares (GUI e JOYCE, 2005; SPICER et al., 2008). Uma avaliação visual após a maturação foi a menor expansão das células do cumulus ao utilizar o inibidor da HSP90 em relação ao controle (0 μ M de 17AAG), isso pode resultar de uma comunicação ineficiente entre o oócito e as células do cumulus, afetando o subsequente desenvolvimento embrionário. O transcrito *ZAR1* é importante durante a transição materno-zigótica, sua ausência resulta em não desenvolvimento dos estágios posteriores do embrião (WU et al., 2003). A redução desses dois transcritos pode resultar em redução da competência de desenvolvimento.

Alterações na expressão de *HSF1* foram observadas quando oócitos foram maturados com 2 μ M de 17AAG por 12 ou 24h. *HSF1* apresenta a função de proteger contra o estresse severo e regula a expressão de chaperonas como a HSP90 e a HSP70 (AKERFELT; MORIMOTO; SISTONEM, 2010). A alta expressão desse gene no presente estudo sugere uma resposta celular ao estresse causado pela inibição da proteína HSP90, mas insuficiente para regular a expressão da HSP70. Os transcritos de *HSP70.1* foram reduzidos quando expostos ao 17AAG por 12 ou 24 h, indicando a dificuldade dos oócitos em lidar com o estresse. Isso pode significar que oócitos com menores níveis da proteína HSP70 podem ser mais sensíveis ao estresse térmico, comprometendo sua competência de desenvolvimento. A quantidade de transcritos da *HSP90A1* foi similar ao controle quando expostos ao inibidor por 12 ou 24 h, sugerindo que o aumento da expressão de *HSF1* foi suficiente pra manter a expressão da *HSP90A1*, apesar de ser insuficiente para a expressão de *HSP70.1*. A HSP70 tem um papel na proteção da célula contra a apoptose (MOSSER et al., 1997) e o maior índice apoptótico em blastocistos

derivados de oócitos tratados com 17AAG por 24h coincide com a menor quantidade de transcritos da *HSP70.1* em oócitos.

O mecanismo pelo qual a HSP90 afeta a competência de desenvolvimento dos oócitos ainda não está claro. Tem sido sugerido que em oócitos de *Xenopus* a inibição da Hsp90 pode bloquear a ativação da MAPK e GVBD, impedindo a maturação oocitária (FISHER; MANDART; DORÉE, 2000). No presente estudo, a inibição da HSP90 não alterou a expressão do gene *MAPK1* nem a maturação nuclear de oócitos bovinos expostos ao 17AAG.

A HSP90 é competente em proporcionar a manutenção da homeostase celular e a manutenção da integridade do genoma (MITTELMAN e WILSON, 2010; TAIPALE; JAROSZ; LINDQUIST, 2010). No trabalho atual, a inibição da HSP90 pelo 17AAG causou distúrbios à homeostasia resultando em alteração na expressão gênica, que não foi suficiente para causar prejuízo na maturação nuclear oocitária, entretanto, refletiu na redução da produção de embriões e no aumento da apoptose. Esses dados sugerem que a HSP90 é requerida durante a maturação para a expressão correta de alguns genes.

Experimento 2: Avaliação da inibição da HSP90 e do choque térmico por 12 h em oócitos e em embriões

O Experimento 2 utilizou a concentração de 17AAG (2 μ M) de maior efeito sobre a competência oocitária utilizando dois tempos de exposição (12 e 24h) durante a maturação e confirmou o resultado do experimento 1 de que a inibição do HSP90 prejudica a competência do oócito em se desenvolver após a fertilização *in vitro*. Contudo, adiciona ainda a informação de que este efeito prejudicial pode ser alcançado mesmo com 12 h de exposição durante a maturação. O choque térmico nos oócitos foi incluído como um dos tratamentos neste experimento. Já é sabido que o estresse térmico durante as primeiras 12h da maturação *in vitro* prejudica a viabilidade do oócito e influencia a apoptose, podendo alterar ou não a taxa de clivagem (JU e TSENG, 2004; ROTH e HANSEN, 2005; RISPOLI et al., 2011). Semelhante aos tratamentos com inibidor da HSP90, o estresse térmico por 12 h de maturação reduziu a competência do oócitos em produzir blastocistos e aumentou o índice apoptótico semelhante ao observado com inibição da HSP90 por 12 h de

maturação. Além disso, a inibição da HSP90 por 24 h e o choque térmico reduziram a proporção de embriões eclodidos no D8 quando comparados ao controle, o que sugere uma redução na qualidade do embrião.

Além de reduzir o desenvolvimento do blastocisto, as consequências do choque térmico durante a maturação do oócito incluem perturbações na morfologia do embrião. Embora embriões provenientes de oócitos que sofreram choque térmico sejam capazes de desenvolver para estágios mais avançados e parecerem morfológicamente normais, a competência de desenvolvimento não é equivalente aos embriões que se desenvolvem a partir de oócitos que não sofreram choque térmico. Podem apresentar consequências futuras como desenvolvimento fetal prejudicado, aumento da incidência de doenças e aumento da taxa de mortalidade (EDWARDS et al., 2009).

É possível que o choque térmico cause um efeito de “envelhecimento” do oócito e a consequência da fecundação de um oócito envelhecido é a redução de transcritos maternos, de proteínas intracelulares e da produção de embriões (WARD et al., 2002). O choque térmico pode induzir a apoptose tanto em oócitos quanto em embriões, causando a perda da competência durante o desenvolvimento do oócito (ROTH e HANSEN, 2004). As células do cumulus têm um papel crucial na proteção contra a apoptose induzida pelo estresse térmico, fornecendo termoproteção aos oócitos bovinos (EDWARDS e HANSEN, 1996; TATEMOTO et al., 2000). Lenz et al. (1983) demonstraram que a cultura de COCs a 41°C durante 24h altera sua função e reduz a produção de ácido hialurônico pelas células do cumulus e impede a retomada da meiose. As células do cumulus em oócitos termo-tolerantes permitem um aumento da síntese de HSPs nos oócitos após o choque térmico (EDWARDS e HANSEN, 1997).

Em bovinos, a apoptose é primeiramente observada no momento da ativação embrionária quando o embrião está no estágio de 8-16 células (MATWEE; BETTS; KING, 2000). Sob certas condições, quantidades limitadas de apoptose desempenham um papel benéfico em embriões pré-implantação, eliminando as células danificadas. A apoptose pode ser um dos mecanismos que embriões bovinos pré-implantação adquirem para permitir a sobrevivência após o choque térmico. Dado que o choque térmico induz apoptose em apenas uma fração de células (15-29%), e não na maioria dos blastômeros, a apoptose

pode assegurar que as células danificadas sejam removidas do embrião submetido ao choque térmico, de modo a facilitar o desenvolvimento (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a). O experimento 1 mostrou o aumento da apoptose quando a HSP90 foi inibida durante a maturação, resultando na produção de blastocistos com menor número de células. No experimento 2, em que o tratamento com choque térmico em oócitos foi adicionado, foi mostrado que, assim como embriões provenientes de oócitos expostos ao inibidor por 12h, os embriões cujos oócitos foram expostos ao choque térmico também apresentaram maior apoptose.

Na análise do padrão de organização da cromatina realizada por imunofluorescência observou-se que a metilação da H3K9 inicia-se em um estágio mais precoce (4 células) nos embriões oriundos de oócitos estressados. Isso resultou em formação de heterocromatina também mais precoce como visualizada pela imunofluorescência para HP1, em relação ao controle. Esse comportamento de condensação precoce da heterocromatina foi previamente observado em embriões clones durante o período de desenvolvimento inicial (PICHUGIN et al., 2010). A metilação da H3K9 é uma herança epigenética transgeracional conservada de leveduras a seres humanos (RISSMAN e ADLI, 2014). A metilação da H3K9 está correlacionada com a repressão transcricional e serve como um local de ligação específico para a proteína de heterocromatina 1 (HP1) que reconhece a cromatina metilada H3K9, oligomeriza e forma uma plataforma versátil que participa de diversas funções nucleares. Tem sido bem documentado na literatura que a metilação da H3K9 associada à heterocromatização é responsável pelo silenciamento gênico (EISSENBERG et al., 2000; LACHNER et al., 2001; HALL et al., 2002; GREWAL e JIA et, 2007).

Um possível efeito desse arranjo diferencial da cromatina é uma alteração na expressão de genes. Oócitos estressados e blastocistos produzidos de oócitos estressados podem ter expressão de genes alterada (GENDELMAN e ROTH, 2012) e isso pode envolver uma alteração na ativação do genoma induzida por uma estrutura da cromatina inadequada em estágio celular inadequado, como observado neste estudo. A inativação da atividade da HSP90 pelo choque térmico dos oócitos causa falhas em silenciar ou ativar

genes, o que provocaria variações morfológicas e que constituiriam uma resposta de adaptação (RUDEN et al., 2005).

Experimento 3: Avaliação do desenvolvimento e expressão gênica de embriões provenientes de oócitos tratados com 17AAG durante o choque térmico

Confirmando o experimento 2, tanto o tratamento com inibidor 17AAG quanto o choque térmico comprometeram a competência de desenvolvimento do oócito e reduziram, de forma semelhante, a produção de blastocistos tanto em D7 quanto em D8. A interação dos dois tratamentos durante a maturação prejudicou ainda mais desenvolvimento de blastocistos em relação aos tratamentos 17AAG e choque térmico separadamente. Alguns trabalhos mostram que tanto a inibição da HSP90 quanto o choque térmico durante a maturação alteram a viabilidade do oócito e prejudicam a produção de embriões (EDWARDS et al., 2009; SON et al., 2011; RISPOLI et al., 2011; (GENDELMAN e ROTH, 2012). Essas alterações que resultam em perda da competência de desenvolvimento do oócito e redução das taxas de embriões pode ser devido a alterações na quantidade de proteínas e de transcritos, além do aumento da apoptose (WARD et al., 2002; ROTH e HANSEN, 2004).

A avaliação da abundância de transcritos em embriões em estágio inicial (8 células) mostrou que tanto a inatividade da HSP90 quanto o estresse durante a maturação dos oócitos alteram a quantidade de transcritos. Análise em oócitos da expressão gênica exposição ao inibidor da HSP90 durante a maturação, mostrou uma redução na quantidade dos transcritos para *HSP70.1*. Em embriões, a análise dos transcritos da *HSP70.1* não pôde ser realizada, entretanto, os transcritos da *HSP40* estavam reduzidos para os tratamentos CT (choque térmico) e CT+17AAG (choque térmico associado ao inibidor). Para o tratamento 17AAG essa diferença não ocorreu em relação ao controle.

Uma função específica para a HSP40 não tem sido descrita em bovinos, entretanto, em outras espécies, desempenha importante função na proteção de células sob condições de estresse (LANNEAU et al., 2007). Gotoh et al (2004) descreveram que a HSP40 e HSP70 associadas atuam na proteção das células da apoptose. Al-Katanani e Hansen (2002) sugeriram que a HSP70

está envolvida no desenvolvimento embrionário, e uma utilização de anticorpos anti-HSP70 reduziu a taxa de blastocistos e aumentou a apoptose.

Quando embriões provenientes dos tratamentos 17AAG e CT+17AAG foram comparados ao tratamento pelo choque térmico (CT), houve uma tendência no aumento na quantidade de transcritos da *HSP90A1* para o grupo 17AAG e houve um aumento significativo dos transcritos para essa proteína para o grupo 17AAG+CT. Isso pode significar uma tentativa do embrião em lidar com o estresse sofrido frente à interação dos dois tratamentos.

Quando células são expostas a condições de estresse, a expressão das HSPs é induzida, pela sua função na recuperação de células e na citoproteção (MORIMOTO, 1998). Essa maior quantidade de transcritos de *HSP90A1* em embriões sob o tratamento CT+17AAG pode estar relacionada à tolerância ao estresse celular na tentativa de proteger o embrião de estímulos apoptóticos que afetam negativamente o DNA (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002a).

As HSPs desempenham papéis vitais no desenvolvimento inicial de embriões bovinos (ZHANG et al., 2011) e pequenas mudanças (aumento ou diminuição) no nível expressão de HSPs podem resultar em anormalidades de crescimento e morte celular (NOLLEN e MORIMOTO, 2002).

8. CONCLUSÕES

A inibição da HSP90 utilizando o 17AAG durante a MIV interfere negativamente na produção de embriões afetando a abundância de transcritos de genes importantes na maturação e no desenvolvimento embrionário sem alterar a maturação nuclear dos oócitos.

A inibição da HSP90 e o choque térmico aumentam a apoptose em embriões. O efeito deletério envolve um processo apoptose relacionado à redução do número de células e maior índice apoptótico.

Os efeitos negativos do estresse térmico e da inibição da HSP90 são potencializados quando ambos ocorrem concomitantemente durante a MIV

O choque térmico na MIV promove alteração no padrão de organização da cromatina de embriões.

9. REFERÊNCIAS

ALI, A.; BHARADWAJ, S.; O'CARROLL, R.; OVSENEK N. HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, 1998, p. 4949–4960.

AI-KATANANI, Y. M.; HANSEN, P. J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, 2002, p.174–180.

AMIN, J.; ANANTHAN, J.; VOELLMY, R. Key features of heat shock regulatory elements. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, 1988, p. 3761–3769.

ANDREU-VAZQUEZ, C.; LOPEZ-GATIUS, F.; GARCIA-ISPIERTO, I.; MAYA-SORIANO, M. J.; HUNTER, R. H.; LOPEZ-BEJAR, M. Does heat stress provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation? **Zygote**, v. 18, 2010, p. 293–299.

AKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEM, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, 2010, p.545-555.

BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; DIAZ, T.; DROST, M.; WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 39, 1993, p. 797–810.

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, 2007, p. 355–367.

BEHRMAN, H. R.; ATEN, R. F. Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. **Endocrinology**, v. 128, 1991, p. 2958–2966.

BELDADE, P.; MATEUS, A. R.; KELLER, R. A. Evolution and molecular mechanisms of adaptive developmental plasticity. **Molecular Ecology**, v. 20, 2011, p. 1347-1363.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. A.The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v. 18, 1997, p.454–460.

BREVINI, T.; CILLO, F.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; GANDOLFI, F. Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (Zar1) in bovine tissues, oocytes, and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, 2004, p. 375–380.

BRIDGES, P. J.; BRUSIE, M. A.; FORTUNE, J. E. Elevated temperature (heat stress) in vitro reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, 2005, p. 508–522.

BUCHOLTZ, D. C.; VIDWANS, N. M.; HERBOSA, C. G.; SCHILLO, K. K.; FOSTER, D. L. Metabolic interfaces between growth and reproduction: pulsatile luteinizing hormone secretion is dependent on glucose availability. **Endocrinology**, v. 137, 1996, p. 601–607.

CALDER, M. D.; CAENEY, A. N.; SMITH, L. C.; WATSON, A. J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, 2003, p.1–14.

CARLSON, J. C.; SAWADA, M.; BOONE, D. L.; STAUFFER, J. M. Stimulation of progesterone secretion in dispersed cells of rat corpora lutea by antioxidants. **Steroids**, v. 60, 1995, p. 272–276.

CHRISTIANS, E. S.; BENJAMIN, I. J. Heat shock response: lessons from mouse knockouts. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 172, 2006, p. 139–152.

COLLIER, R. J.; DAHL, G. E.; VANBAALE, M. J. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, 2006, p. 1244–1253.

DE RENSIS, F.; MARCONI, P.; CAPELLI, T.; GATTI, F.; FACCIOLONGO, F.; FRANZINI, S.; SCARAMUZZI, R. J. Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrous synchronization and fixed time A.I. after the induction of an LH surge with Gonadotropin releasing hormone (GnRH) or human chorionic gonadotropin (hCG). **Theriogenology**, v. 58, 2002, p. 1675–1687.

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R. LU, N. MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, 1996, p. 531–535.

EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, 1993, p. 2899–2905.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, 1996, p. 340–346.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, 1997, p.138–145.

EDWARDS, J. L.; EALY, A. D.; MONTERROSO, V. H.; HANSEN, P. J. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, 1997, p. 25–33.

EDWARDS, J. L.; SAXTON, A. M.; LAWRENCE, J. L.; PAYTON, R. R.; DUNLAP, J. R. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 88, 2005, p. 4326–4333.

EDWARDS, J. L.; BOGART, A. N.; RISPOLI, L. A.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F. N. Developmental competence of bovine embryos from heat-stressed ova. **Journal of Dairy Science**, v. 92, 2009, p. 563–570.

EISSENBERG, J. C.; ELGIN, S. C. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Current Opinion in Genetics and Development*, v. 10, 2000, p. 204–210.

ELVIN, J. A.; CLARK, A. T.; WANG, P.; WOLFMAN, N. M.; MATZUK, M. M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 13, 1999, p. 1035–48.

EPPIG, J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, 1996, p. 485–489.

FERNANDES, R.; TSUDA, C.; PERUMALSAMY, A. L.; NARANIAN, T.; CHONG, J.; ACTON, B. M.; TONG, Z. B.; NELSON, L. M.; JURISICOVA, A. NLRP5 Mediates Mitochondrial Function in Mouse Oocytes and Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 138, 2012, p. 1–10.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, 2009, p. 836–848.

FISHER, D. L.; MANDART, E.; DOREÉ, M. Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in *Xenopus* oocytes. **The EMBO Journal**, v. 19, 2000, p. 1516–1524.

FISSORE, R. A.; HE, C. L.; WOUDE, G. F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 55, 1996, p. 1261–1270.

FU H. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, 1996, p. 571–580

FUJIMOTO, M.; NAKAI, A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. **FEBS Journal**, v. 277, 2010, p. 4112–4125.

FULKA-Jr, J.; FIRST, N. L.; MOOR, R. M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Molecular Human Reproduction**, v.4, 1998, p. 41–49.

GATZULI, E.; ATEN, R. F.; BEHRMAN, H. R. Inhibition of gonadotropic action and progesterone synthesis by xanthine oxidase in rat luteal cells. **Endocrinology**, v. 128, 1991, p. 2253–2258.

GAUTIER, J.; MINSHULL, J.; LOHKA, M.; GLOTZER, M. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. **Cell**, v. 60, 1990, p. 487–494.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Seasonal Effect on Germinal Vesicle-Stage Bovine Oocytes Is Further Expressed by Alterations in Transcript Levels in the Developing Embryos Associated with Reduced Developmental Competence. **Biology of Reproduction**, v. 86, 2012, p. 1–9.

GOETZ, M. P.; TOFT, D. O.; AMES, M. M.; ERLICHMAN, C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. **Annals of Oncology**, v. 14, 2003, p. 1169–1176.

GOTOH, T.; TERADA, K.; OYADOMARI, S.; MORI, M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. **Cell Death & Differentiation**, v.11, 2004, p. 390–402.

GREWAL, S. I. S.; JIA S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, 2007, p. 35–46.

GUI, L. M.; JOYCE, I. M.; RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. **Biology of Reproduction**, v. 72, 2005, p. 195–199.

HALL, I. M.; SHANKARANARAYANA, G. D.; NOMA, K.; AYOUB, N., COHEN, A.; GREWAL, S. I. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. **Science**, v. 297, 2002, p. 2232–2237.

HAMATANI, T.; MARK, C. G.; SHAROV, A. A.; KO, M. S. H. Dynamics of Global Gene Expression Changes during Mouse Preimplantation Development. **Developmental Cell**, v. 6, 2004, p. 117–131.

HAMILTON, T. D.; VIZCARRA, J. A.; WETTMAN, R. P.; KEEFER, B. E.; SPICER, L. J. Ovarian function in nutritionally induced anoestrous cows: effect of exogenous gonadotrophin-releasing hormone in vivo and effect of insulin and insulin-like growth factor I in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, 1999, p. 179–187.

HANSEN, P.J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic

survival in dairy cattle during heat stress. **Theriogenology**, v. 68S, 2007, p. S242–S249.

HARRIS, S. F.; SHIAU, A. K.; AGARD, D. A. The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the Escherichia coli Hsp90, reveals a potential substrate binding site. **Structure**, v. 12, 2004, p. 1087–1097.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, 2002, p. 1852–1858.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, 1997, p. 371–376.

IMHOF, A. Epigenetic regulators and histone modification. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 5, 2006, p. 222–227.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, 2003, v. 33, p. 245–254.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, 2001, 1074–1080.

JOLLY, P. D.; McDOUGALL, S.; FITZPATRICK, L. A.; MACMILLAN, K. L.; ENTWHITSLE, K. Physiological effects of under nutrition on postpartum anoestrous in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, 1995, p. 477–492.

JONES, P. A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, v. 293, 2001, p. 1068–70.

JONSSON, N. N.; McGOWAN, M. R.; McGUIGAN, K.; DAVISON, T. M.; HUSSAIN, A. M.; KAFI, M.; MATSCHOSS, A. Relationship among calving season, heat load, energy balance and postpartum ovulation of dairy cows in a subtropical environment. **Animal Reproduction Science**, v. 47, 1997, p. 315–326.

JU, J. C.; PARKS, J. E.; YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after shortterm heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, 1999, p. 336–340.

JU, J. C.; TSENG, J. K. Nuclear and cytoskeletal alterations of in vitro matured porcine oocytes under hyperthermia. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, 2004, 125–133.

JU, J. C.; JIANG, S.; TSENG, J. K.; PARK, J. E.; YANG, X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 64, 2005, p. 1677–1689.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; WHITING, L.; MCNATTY, K. P. Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 70, 2004, p. 557–561.

KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, 2010, p. 579–592.

KAPLAN, K. B.; LI, R. A prescription for ‘stress’ – the role of Hsp90 in genome stability and cellular adaptation. **Trends in Cell Biology**, v. 22, 2012, p. 576–583.

KATSCHINSKI, D. M.; LE, L.; HEINRICH, D.; WAGNER, K. F.; HOFER, T.; SCHINDLER, S. G.; WENGER, R. H. Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1 is dependent on heat shock protein-90 activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, 2002, p. 9262–9267.

KAYO, H.; SUGINO, N.; TAKIGUCHI, S.; KASHIDA, S.; NAKAMURA, Y. Roles of reactive oxygen species in the regulation of luteal function. **Reviews of Reproduction**, v. 2, 1997, p.81–83.

KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B.; PESCE, P.; GENTILE, L.; BOIANI, M.; LOMELÍ, H.; NAGY, A.; MCLAUGHLIN, K. J.; SCHÖLER, H. R.; TOMILIN, A. Oct4 is required for primordial germ cell survival. **EMBO reports**, v. 5, 2004, p. 1078–1083.

KIM, B.; ZHANG, X.; KAN, R.; COHEN, R.; MUKAI, C.; TRAVIS, A. J.; COONROD, S. A. The role of MATER in endoplasmatic reticulum distribution and calcium homeostasis in mouse oocytes. **Developmental Biology**, v. 386, 2014, p. 331–339.

KREGEL, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, 2002, p. 2177–2186.

KRININGER III, C. E.; STEPHENS, S. H.; HANSEN, P. J. Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, 2002, p. 335–340.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, 2000, p. 292–302.

LACHNER, M.; O’CARROLL, D.; REA, S.; MECHTLER, K.; JENUWEIN, T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. **Nature**, v. 410, 2001, p. 116–120.

LANNEAU, D., A. de THONEL, S. MAUREL, C. DIDELOT, and C. GARRIDO. Apoptosis versus cell differentiation: Role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. **Prion**, v. 1, 2007, p. 53–60.

LENZ, R. W.; BALL, G. D.; LEIBFRIED, M. L.; AX, R. L.; FIRST, N. L. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. **Biology of Reproduction**, v. 29, 1983, p. 173-179.

LEUTENEGGER, C. M.; ALLUWAIMIB, A. M.; SMITHC, W. L.; PERANID, L.; CULLOR, J.S. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan® polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, 2000, p. 275-287.

LI, L.; ZHENG, P.; DEAN, J. Maternal control of early mouse development. **Development**, v. 137, 2010, p.859 – 870.

LÓPEZ-GATIUS, F.; LÓPEZ-BÉJARB, M.; FENECHB, M.; HUNTERA, R. H. F. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. **Theriogenology**, v. 63, 2005, 1298–307.

LU, Y.; HE, X; ZHENG, P. Decrease in expression of maternal effect gene Mater is associated with maternal ageing in mice. **Molecular Human Reproduction**, v. 0, 2016, p. 1–9.

MATWEE, C; BETTS, D. H. KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, 2000, p. 57–68.

MAYA-SORIANO, M. J.; LÓPEZ-GATIUS, F.; ANDREU-VÁZQUEZ, C.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. **Theriogenology**, v. 79, 2013, p. 299–305.

McPHERRON, A. C.; LEE, S. J. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- β superfamily containing a novel pattern of cysteines. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, 1993, p. 3444–3449.

McMILLAN, D. R.; XIAO, X.; SHAO, L.; GRAVES, K.; BENJAMIN, I. J. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. **Journal of Biological and Chemistry**, v. 273, 1998, p. 7523–7528.

McNATTY, K. P.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; FILDER, A. E.; QUIRKE, L.; O'CONNELL, A.; SMITH, P.; GROOM, N.; TISDALL, D. J. Control of early ovarian follicular development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, 1999, p. 3–16.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, 2000, p. 796–801.

MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K. GARCIA, S. M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82, 2004, p. 13–20.

METCHAT, A.; AKERFELT, M.; BIERKAMP, C.; DELSINNE, V.; SISTONEN, L.; ALEXANDRE, H.; CHRISTIANS, E. S. Mammalian heat shock factor 1 is essential for oocyte meiosis and directly regulates Hsp90alpha expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, 2009, p. 9521-9528.

MINAMI, Y.; HÖHFELD, J.; OHTSUKA, K.; HART F. U Regulation of the Heat-shock Protein 70 Reaction Cycle by the Mammalian DnaJ Homolog, Hsp40. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, 1996, p. 19617–19624.

MITTELMAN, D.; WILSON, J. H. Stress, genomes, and evolution. **Cell Stress Chaperones**, v. 15, 2010, p. 463-466.

MORIMOTO, R. I Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes & Development**, v. 12, 1998, p. 3788-3896.

MOSSER, D. D.; CARON, A. W.; BOURGET, L.; DENIS-LAROSE, C.; MASSIE, B. Role of human heat shock protein HSP70 in protection against heat-induced apoptosis. **Molecular Cell Biology**, v. 17, 1997, p. 5317–5327.

NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; RANIERI, M. S.; BERNABUCCI, U. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, v. 130, 2010, p. 57-69.

NGANVONGPANIT K, MU"LLER H, RINGS F, HOELKER M, JENNEN D, THOLEN E, HAVLICEK V, URBAN B, SCHELLANDER K, TESFAYE D. Selective degradation of maternal and embryonic transcripts in in vitro produced bovine oocytes and embryos using sequence specific double-stranded RNA. **Reproduction**, v. 131, 2006; p. 861–874.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in pre-implantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, 2000, p. 21–34.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J. SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**, v. 24, 2000, p. 372-376.

NOLLEN, E. A. A.; MORIMOTO, R. I. Chaperoning signaling pathways: Molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. **Journal of Cell Science**, v. 115, 2002, p. 2809–2816.

O'CALLAGAN, D.; BOLAND, M. P. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. **Animal Science**, v. 68, 1999, p. 299–314.

OKAMOTO, K.; OKAZAWA, H.; OKUDA, A.; SAKAI, M.; MURAMATSU, M.; HAMADA, H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. **Cell**, v. 60, 1990, p. 461–472.

ORISAKA, M.; ORISAKA, S.; JIANG, J. Y.; CRAIG, J.; WANG, Y.; KOTSUJI, F.; TSANG, B. K. Growth differentiation factor-9 is anti-apoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Molecular Endocrinology**, v. 20, 2006, p. 2456–2469.

ÖSTLING, P.; BJÖRK, J. K.; ROOS-MATTJUS, P.; MEZGER, V.; SISTONEN, L. Heat Shock Factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of *hsp* genes through interplay with HSF1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, 2007, p. 7077–7086.

OZAWA, M.; TABAYASHI, D.; LATIEF, T. A.; SHIMIZU, T.; OSHIMA, I.; KANAI, Y. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. **Reproduction**, v. 129, 2005, p. 621–630.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat-shock induced apoptosis in bovine preimplantation embryos is a developmentally-regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, 2002a, p. 1169–1177.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 295, 2002b, p. 37–42.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE, C. C. J.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSO, 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, 2003, p. 285–294.

PAVANI, K.; CARVALHAIS, I.; FAHEEM, M.; CHAVEIRO, A.; REIS, F. V.; MOREIRA DA SILVA, F. Reproductive performance of Holstein dairy cows grazing in dry-summer subtropical climatic conditions: effect of heat stress and heat shock on meiotic competence and in vitro fertilization. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v. 28, 2015, p. 334–342.

PAYTON, R. R.; ROMAR, R.; COY, P.; SAXTON, A. M.; LAWRENCE, J. L.; EDWARDS, J. L. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 71, 2004, p. 1303–1308.

PEARL, L. H.; PRODOMOU, C. Structure, function and mechanism of the HSP90 molecular chaperone. **Advances Protein Chemistry**, v. 59, 2002, p. 157-185.

PEARL, L. H.; PRODOMOUS, C. Structure and mechanisms of the hsp90 molecular chaperone machinery. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, 2006, p. 271-294.

PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C. et al. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 71, 2004, p. 1359-1366.

PENNETIER, S.; PERREAU, C.; UZBEKOVA, S.; THÉLIE, A.; DELALEU, B.; MERMILLOD, P.; DALBIÈS-TRAN, R. MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. **BMC Developmental Biology**, v. 6, 2006, p. 26.

PFAFFL, M.; HORGAN, G. W.; DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, 2002, e36

PICARD, D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, 2002, p. 1640–1648.

PICHUGIN, A.; LE BOURHIS, D.; ADENOT, P.; LEHMANN, P.; AUDOUARD, P.; RENARD, J. P.; VIGNON, X.; BEAUJEAN, N. Dynamics of constitutive heterochromatin: two contrasted kinetics of genome restructuring in early cloned bovine embryos. **Reproduction**, v. 139, 2010, p. 129–137.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, 1998, p. 27–37.

PIGLIUCCI, M. Developmental genetics: Buffer zone. **Nature**, v. 417, 2002, p. 598-599.

PISANI, L. F.; RAMELLI, P.; LAZZARI, B.; BRAGLIA, S.; CECILIANI, F.; MARIANI, P. Characterization of maternal antigen that embryos require (MATER/NLRP5) gene and protein in pig somatic tissues and germ cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, 2010, p. 41-48.

PORTER, J. R.; L, X.; CHALLINOR, A. J.; K, C.; HOWDEN, S. M.; IQBAL, M. M.; LOBELL, D. B.; TRAVASSO, M. I.; . Food security and food production systems. In: FIELD, C. B.; BARROS, V. R., et al (Ed.). **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press, v.4, 2014. cap. 7, p.485-533. ISBN 0521880106.

POSADA, J.; YEW, N.; AHN, N. G.; VANDE WOUDE, G. F.; COOPER, J. A. Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, 1993, p. 2546–2553.

PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenology**, v. 31, 1989, p. 765–778.

QIU, X. B.; SHAO, Y.M.; MIAO, S.; WANG, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, 2006, p. 2560–2570.

RABIEE, A. R.; LEAN, I. J.; GOODEN, J. M.; MILLER, B. J.; SCARAMUZZI, R. J. An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio venous difference methods in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, 1997, p. 9–25.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. MOORMAN, A. F. assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, 2003, p. 62–66.

RICHARDSON, P. G.; MITSIADES, C. S.; LAUBACH, J.P.; LONIAL, S.; CHANAN-KHAN, A. A.; ANDERSON, K. C. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers. **British Journal of Haematology**, v. 152, 2011, p. 367–379.

RICHTER, K. BUCHNER, J. Hsp90: chaperoning signal transduction. **Journal of Cellular Physiology**, v. 188, 2001, 281–290.

RISSMAN, E. F.; ADLI, M. Minireview: Transgenerational Epigenetic Inheritance: Focus on Endocrine Disrupting Compounds. **Endocrinology**, v. 155, 2014, p. 2770–2780.

RISPOLI, L. A.; LAWRENCE, J. L.; PAYTON, R. R.; SAXTON, A. M.; SCHROCK, G. E.; SCHRICK, F. N.; MIDDLEBROOKS, B. W. DUNLAP, J. R.; PARRISH, J. J.; EDWARDS, J. L. Disparate consequences of heat stress exposure during meiotic maturation: embryo development after chemical activation vs fertilization of bovine oocytes. **Reproduction**, v. 142, 2011, p. 831–843.

RITOSSA, F. Discovery of the heat shock response. **Cell Stress Chaperones**, v. 1, 1966, p. 97–98.

RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v. 121, 2001, p. 107–115.

RONCHI, B.; BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; VERINI SUPPLIZI, A.; NARDONE, A. Distinct and common effects of heat stress and restricted

feeding on metabolic status in Holstein heifers. **Zootecnica e Nutrizione Animale**, v. 25, 1999, p. 71–80.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, 2000, p. 83–90.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v. 122, 2001, p. 737–744.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, v. 71, 2004, p. 1898–1906.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v. 129, 2005, p. 235–44.

ROTH, Z. Heat Stress, the Follicle, and Its Enclosed Oocyte: Mechanisms and Potential Strategies to Improve Fertility in Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 43, 2008, p. 238–244

RUDEN, D. M.; XIAO, L.; GARFINKEL, M. D.; LU, X. Hsp90 and environmental impacts on epigenetic states: a model for the trans-generational effects of diethylstilbestrol on uterine development and cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 15, 2005, p. R149-R155.

RUTHERFORD, S. L. LINDQUIST, S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. **Nature**, v. 277, 1998, p. 336-342.

RUTHERFORD, S. L. Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability. **Nature Reviews Genetic**, v.4, 2003, p. 263–274.

RYAN, D. P.; BOLAND, M. P. Frequency of twin births among Holstein X Friesian cows in a warm dry climate. **Theriogenology**, v. 36, 1991, p. 1–10.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, 2004, p. 905–920.

SASKOVA, A.; SOLC, P.; BARAN, V.; KUBELKA, M.; SCHULTZ, R. M.; MOTLIK, J. Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes. **Cell Cycle**, v. 7, 2008, p. 2368-2376.

SCHINDLER, K.; SCHULTZ, R. M. The CDC14A phosphatase regulates oocyte maturation in mouse. **Cell Cycle**, v. 8, 2009, p. 1090-8.

SCHROCK, G. E.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F. N.; EDWARDS, J. L. Early in vitro fertilization improves development of bovine ova heat stressed during in vitro maturation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, 2007, p. 4297–4303.

SEGUI-SIMARRO, J. M.; TESTILLANO, P. S.; RISUENO, M. C. Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. **Journal of Structural Biology**, v. 142, 2003, p. 379–391.

SEPP-LORENZINO, L.; MA, Z.; LEBWOHL, D.E.; VINITSKY, A.; ROSEN, N. Herbimycin A induces the 20 S proteasome- and ubiquitin-dependent degradation of receptor tyrosine kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, 1995, p. 16580–16587.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, 2001, p.1241–54.

SKIBBA, J. L.; STADNICKA, A. Xanthine oxidase (XO) activity at hyperthermic temperatures as a source of free radicals. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, v. 27, 1986, p. 400.

SOLLARS, V.; LU, X.; XIAO, L.; WANG, X.; GARFINKEL, M. D.; RUDEN, D. M. Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution. **Nature genetics**, v. 33, 2003, p. 70-74.

SON, M. J.; PARK, J. M.; MIN, S. H.; HONG, J. H.; PARK, H.; KOO, D. B. hsp90 inhibitor induces cell cycle arrest and apoptosis of early embryos and primary cells in pigs. **Reproductive and Developmental Biology**, v. 35, 2011, p. 33-45.

SONNA, L. A.; FUJITA, J.; GAFFIN, S. L.; CRAIG, M. L. Molecular biology of thermoregulation invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, 2002, p. 1725–1742.

SPECCHIA, V.; PIACENTINI, L.; TRITTO, P.; FANTI, L.; D'ALESSANDRO, R.; PALUMBO, G.; PIMPINELLI, S.; BOZZETTI, M.P. Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons. **Nature**, v. 463, 2010, p. 662–665.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A. H.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. **Biology of Reproduction**, v. 78, 2008, p. 243–253.

SREEDHAR, A. S.; SOTI, C.; CSERMELY, P. Inhibition of Hsp90: a new strategy for inhibiting protein kinases. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1697, 2004a, p. 233-242.

SREEDHAR, A. S.; KALMAR, E.; CSERMELY, P.; SHEN, Y. F. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. **FEBS Letters**, v. 562, 2004b, p. 11–15.

STREET, T. O.; LAVERY, L. A.; AGARD, D. A. Substrate binding drives large-scale conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. **Molecular Cell**, v.42, 2011, p. 96–105

SUN, Q. Y.; LAI, L.; PARK, K. W.; KÜHHOLZER, B.; PRATHER, R. S.; SCHATTEN, H. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 64, 2001, p. 879–89.

TAIPALE, M.; JAROSZ, D. F.; LINDQUIST, S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, 2010, p. 515–528.

TAKAMI, M.; PRESTON, S. L.; TOYLOY, V. A.; BEHRMAN, H. R. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. **American Journal of Physiology**, v. 276, 1999, p. 684–688.

TATEMOTO, H.; SAKURI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, 2000, p. 805–810.

TONG, Z. B.; GOLD, L.; PFEIFER, K. E.; DORWARD, H.; LEE, E.; BONDY, C. A.; DEAN, J.; NELSON, L. M. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. **Nature Genetics**, v. 26, 2000, p. 267–268.

TRINKLEIN, N. D.; MURRAY, J. I.; HARTMAN, S. J.; BOTSTEIN, D.; MYERS, R. M. The Role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the Genome-wide Regulation of the Mammalian Heat Shock Response. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, 2004, p. 1254–1261.

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G.; Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, v. 121, 2001, p. 51–75.

TSENG, J. K.; CHEN, C. H.; CHOU, P. C.; YEH, S. P.; JU, J. C. Influences of follicular size on arthenogenetic activation and in vitro heat shock on the cytoskeleton in cattle oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, 2004, p. 146–53.

UZBEKOVA, S.; ROY-SABAU, M.; DALBIÈS-TRAN, R.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MOMPART, F.; THELIE, A.; PENNETIER, S.; COGNIE, J.; CADORET, V.; ROYERE, D.; MONGET, P.; MERMILLOD, P. Zygote arrest 1 gene in pig, cattle and human: evidence of different transcript variants in male and female germ cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, 2006, p. 12.

VABULAS, R. M.; RAYCHAUDHURI, S.; HAYER-HARTL, M.; HARTL, F. U. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, 2010, p. a004390.

VERLHAC, M. H.; KUBIAK, J. Z.; WEBER, M.; GERAUD, G.; COLLEDGE, W. H. EVANS, M. J.; MARO, B. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. **Development**, v. 122, 1996, p. 815-822.

WANG, W.; HOSOE, M.; LI, R.; SHIOYA, Y. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. **Development, Growth and Differentiation**, v. 39, 1997, p. 607-615.

WANG, Q.; YIN, S.; AI, J. S.; LIANG, C. G.; HOU, Y.; CHEN, D. Y.; SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. Histone deacetylation is required for orderly meiosis. **Cell Cycle**, v. 2006, p. 766-774.

WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v. 57, 2002, p. 2105-2117.

WATANABE, N.; HUNT, T.; IKAWA, Y.; SAGATA, N. Independent inactivation of MPF and cytosolic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs. **Nature**, v. 352, 1991, p. 247-248.

WHITAKER, D. A.; SMITH, E. J.; DA ROSA, G. O.; KELLY, J. M. Some effects on nutrition and management on the fertility of dairy cattle. **Veterinary Record**, v. 133, 1993, p. 61-64.

WHITESELL, L.; MIMNAUGH E. G.; DE COSTA B.; MYERS C. E.; NECKERS, L. M. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. **PNAS**, v. 91, 1994, p. 8324-8328.

WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. L. HSP90 and the chaperoning of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, 2005, p. 761-772.

WILSON, S. J.; MARION, R. S.; SPAIN, J. N.; SPIERS, D. E.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Effect of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, 1998, p. 2124-2131.

WOLFENSON, D.; LEW, B. J.; THATCHER, W. W.; GRABER, Y.; MEIDAN, R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 47, 1997, p. 9-19.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60, 2000, p. 535–547.

WU, X.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J.J., BAI, Y.; FITZPATRICK, S. L.; MATZUK, M. M. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. **Nature Genetics**, v. 33, 2003, p. 187-191.

YAN, L. J.; CHRISTIANS, E. S.; LIU, L.; XIAO, X.; SOHAL, R. S.; BENJAMIN, I. J. Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostases mitochondrial oxidative damage. **EMBO Journal**, v. 21, 2002, p. 5164–5172.

YEO, C. X.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G.; LANE M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. **Human Reproduction**, v. 23, 2008, p. 67-73.

YIN, S.; SUN, X. F.; SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. Molecular insights into mechanisms regulating faithful chromosome separation in female meiosis. **Cell Cycle**, v. 7, 2008, p. 2997-3005.

YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T. G. BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, 2001, p. 153-154.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, 2001, p. 447–454.

ZHAO, R.; HOURY, W. A. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, 2005, p. 703–710.

ZOU, Z.; GUO, Y.; GUETTOUCHE, T.; SMITH, D.; VOELLMY, R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by hsp90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. **Cell**, v. 94, 1998, p. 471–480.



Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to Reproduction, Fertility and Development

Manuscript ID RD16444

Title Inhibition of Hsp90 during maturation interferes in the relative abundance of bovine oocytes transcripts and embryo development

Authors Souza, Eliza
Rabelo, Natana
Dias, Rhaisa
Souza, Gustavo
Batista, Ribrio
Munk, Michele
Quintão, Carolina
Louro, Iuri
Camargo, Luiz Sérgio

Date Submitted 09-Nov-2016

[Author Dashboard](#)

Inhibition of Hsp90 during maturation interferes in the relative abundance of bovine oocytes transcripts and embryo development

Souza, E.D.^{*1,2}; Rabelo, N.C.^{2,3}; Dias, R.B. S.^{2,4}; Souza, G.T.^{2,3}; Batista, R.I.T.P.⁵; Munk, M.³; Quintão, C.C.R.²; Louro, I.D.¹; Camargo, L.S.A.²

¹Universidade Federal Espírito Santo/RENORBIO, Vitória, ES, Brasil

²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

³Universidade Federal Juiz de Fora, MG, Brasil

⁴Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG, Brasil

⁵Universidade Federal Fluminense, RJ, Brasil

*Correspondence should be addressed to Embrapa Gado de Leite - Rua Eugênio do

Nascimento, 610 - Dom Bosco CEP: 36038-330 - Juiz de Fora - MG - Brasil

e-mail addresses: elizadds@gmail.com (E.D. Souza), luiz.camargo@embrapa.com (L.S.A. Camargo)

Abstract: In the present study we examined the roles of an HSP90 inhibitor (17 AAG) on *in vitro* maturation (IVM), as well as on oocytes gene expression and blastocysts apoptosis.

Bovine oocytes randomly allocated in six groups: 0 (control), 1 and 2 μ M 17AAG for the first 12h of IVM (24h) and 24h. The first experiment evaluated the effects of 17AGG doses on nuclear maturation and expression of genes by real time PCR in *in vitro*-matured oocytes exposed for 12h or 24h of IVM. The second experiment evaluated the oocyte developmental competence after *in vitro* fertilization and embryo culture in a 3 x 2 factorial design (dose vs time of exposure). Relative amounts of *HSP70.1*, *HSF1*, *GDF9* and *ZAR1* transcripts were

altered ($p < 0.05$) in oocytes exposed to 17AGG than in oocytes of control group. The rate of oocytes at metaphase II was not different ($p > 0.05$) among the groups. In the second experiment, 17AGG did affect blastocyst rate, total cell number, and apoptotic index. In conclusion, inhibition of HSP90 by 17 AGG during IVM interferes with gene expression and compromises bovine embryo development, which indicates that HSP90 is important for oocyte maturation and developmental competence.

Key-words: 17AAG, gene expression, apoptosis, cattle

1. Introduction

Heat shock protein 90 (Hsp90) is a chaperone essential for cell viability in eukaryotes, playing a role on folding and maturation of a variety of cellular proteins. It mediates fundamental cellular processes including cell cycle control, signal transduction and cell survival under stress conditions (Bagatell et al., 2000; Young et al., 2001; Picard, 2002; Taipale et al., 2010). The levels of HSP90 in cells are regulated mainly by the heat shock factor 1 (HSF1), which in turn regulates the heat shock response (Prodromou et al., 2016). It has been suggested that cell stress can overload HSP90, impairing its function (Kaplan et al., 2012).

In mice, HSP90 inhibition interferes with oocyte maturation, inhibiting meiosis progression due to inadequate function of kinases involved in the control of germinal vesicle breakdown (GVBD) such as Mitogen Activated Protein Kinase (MPAK) (Metchat et al., 2009). The MAPK cascade mediates the activation of Maturation Promoting Factor (MPF), a complex formed by kinase p34cdc2/cyclin B (Gautier et al., 1990), triggering GVBD and chromatin condensation by phosphorylation of proteins involved in the nuclear membrane formation of the, and microtubular reorganization. In *Xenopus* oocytes the pro-oncogene, c-

MOS, responsible for triggering the MAPK cascade, also requires HSP90 action during maturation (Fisher et al, 1999; Fisher; Mandart; Doreé, 2000).

The role of HSP90 in bovine oocyte maturation is unknown. Immature oocytes have been used for *in vitro* embryo production and the success in generating *in vitro*-fertilized blastocysts is largely dependent on adequate oocyte maturation. As HSP90 may interfere on several cellular processes, the understanding of its influence on oocyte developmental competence is important to improve the *in vitro* embryo production. In order to study the HSP90 requirement for oocyte development we tested two concentrations of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17 AAG, Sigma A8476), an inhibitor of HSP90 derived from geldanamycin (GA), to demonstrate the importance of HSP90 for gene expression in oocytes and further embryo development.

2. Material and Methods

All chemicals and reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

2.1. Oocytes recovery and *in vitro* maturation (IVM)

Bovine ovaries were obtained from cows at the local slaughterhouse and transported to the laboratory in physiological saline solution (0.9% NaCl at 37°C with 0.1 g L⁻¹ streptomycin). In the laboratory, cumulus–oocyte complexes (COCs) were aspirated from 3-8mm follicles and viable oocytes with homogeneous cytoplasm were selected. Groups of 30-40 oocytes were *in vitro* matured in Nunc plate containing 400 µL of TCM199 medium (Invitrogen, Carlsberg, USA) supplemented with porcine FSH (Pluset, Serono, Italy) and 10% estrus cow serum under 5% CO₂ and 95% humidity. COCs were distributed in 6 groups depending of the HSP90 inhibitor concentration (0, 1 and 2µM) and time of exposition (12 or

24h) during *in vitro* maturation. Oocytes exposed for 12h to 17AAG were washed and allocated in maturation medium without inhibitor addition for another 12h. All treatments maintained in incubator at 5.0% CO₂ at 38.5°C.

2.2. Analysis of meiosis progression

After 24h of maturation, oocytes were washed in 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA) and cumulus cells were removed by vortex for 5 minutes in 1 mL of TALP. Oocytes denuded were fixed for 30 minutes in paraphormaldeide 4% and incubated for 10 minutes in Hoechst33342 (10 µg/mL) at room temperature in the dark. After this procedure, each treatment was washed three times in PBS + PVA and oocytes transferred to mounting solution (6.25 ml PBS/PVA + 6.25 ml of Glicerol + 6.25µL Hoechst stock). Afterwards, oocytes were placed on glass slide covered with cover slip. The extrusion of the first polar body was checked and oocytes with an extruded first polar body and a metaphase II plate were defined as matured. Maturation rate was assessed under 400x magnification epifluorescence microscopy (excitation of 330±50nm and emission of 460±50nm). Three replicates were performed per treatment.

2.3. *In vitro* fertilization (IVF) of oocytes

Semen from one bull with fertility previously tested was used. Thawed motile spermatozoa was processed with 400 µL of 90% and 45% Percoll gradients (Nutricell, Campinas, Brazil) and maintained at incubator for at least 15 min before use. Microtube type Eppendorff with the Percoll concentrations and semen was centrifuged in microcentrifuge at 5723g for 7 min and the pellet subsequently centrifuged again at 915g for 5 min in Fert-TALP medium. Oocytes were *in vitro* fertilized for 20h with 2x10⁶ spermatozoa mL⁻¹ in 100 µl drops of Fert-TALP supplemented with 20 µg mL⁻¹ of heparin and 6 mg mL⁻¹ of fatty acid-free BSA fraction V, covered with mineral oil under the same IVM atmospheric conditions.

2.4. *In vitro* culture (IVC) of embryos

Presumptive zygotes were completely denuded in a PBS solution with 0.1% hyaluronidase and then cultured in wells with 500 μ L of modified CR2aa medium supplemented with 2.5% fetal calf serum (Nutricell) overlaid with 300 μ L mineral oil and cultured for 8 days in incubator at 38.5°C under 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ and saturated humidity. Cleavage rate was evaluated 72h post-fertilization and blastocyst rate was evaluated at day seven (D7) and day eight (D8).

2.5. TUNEL Labeling

Blastocysts of 8 days of the groups were analyzed by TUNEL assay using a commercial kit (Dead End Fluorimetric TUNEL System, Promega, *Madison, WI*, USA). Embryos were removed from culture medium, washed three times in drops of PBS-PVA (0.1g mL⁻¹), fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 25 minutes and stored in PBS-PVA at 4°C. The TUNEL assay was initiated by permeabilizing embryos in 500 μ L drops of 0.2% Triton X-100. Samples were then incubated in 50 μ L drops of TUNEL reaction mixture for 1 h at 37°C in a dark incubator. Negative control embryos were incubated only in the staining solution without enzyme and the positive control slide using DNase I was also prepared. Embryos were stained with Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) plus DAPI and mounted on slides for evaluation by epifluorescence microscopy. Apoptotic index was calculated from the ratio of cell number containing apoptotic bodies and the total number of cells

2.6. Analysis of gene expression

Oocytes were denuded by vortexing in TALP-HEPES plus 3 mg/mL BSA and washed three times and then rapidly frozen in liquid nitrogen in PBS plus 0.1% polyvinyl alcohol and

127 stored until total RNA extraction, which was done from three pools of 10 oocytes per group
128 using the RNeasy Micro Kit (Quiagen, Valencia, CA, USA). RNA samples were reverse
129 transcribed using SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitogen, Chicago, IL,
130 USA, respectively) according to the manufacturer's recommendations. RNA and cDNA
131 quantitation was performed by NanoDrop 1000. Real Time PCR reactions were performed by
132 commercial kit with SYBR Green (Power Sybr Green, Applied Biosystem) according to the
133 manufacturer's recommendations. RNA from pools of 10 oocytes eluted in 12 μ L was
134 quantified by Nanodrop1000 resulting in a average of 2,844ng RNA/oocytes and purity
135 A260/280 of 1.95. Briefly, reaction containing a final volume of 25 μ L was incubated at 95°C
136 for 15 minutes, followed by 45 cycles of 94°C for 15 seconds, annealing at specific
137 temperature for each primer for 15 seconds and extension at 72°C for 30 seconds. Negative
138 controls were prepared without cDNA during the amplification reaction. The samples were
139 then incubated in a thermocycler Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied
140 Biosystems). Each treatment was performed in triplicate. The amount of cDNA used in the
141 reactions ranged according to the optimal concentration preliminary identified for each
142 transcript analyzed. For *YWHAZ* (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase
143 activation protein zeta), *ACTB* (actin beta), *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate
144 dehydrogenase), *c-MOS* (Murine sarcoma viral proto-oncogene homolog), *MAPK* (*Mitogen-*
145 *activated protein kinases*), *MATER* (Maternal Antigen that Embryos Require), *ZAR1* (Zygote
146 Arrest 1), *GDF9* (Growth Differentiation Factor 9), *HSF1* (Heat Shock Factor 1), *HSP90A1*
147 (Heat Shock Protein 90 KDa class A member 1) and *HSP70.1* (Heat shock 70kDa protein
148 1A) 200 ng, 200ng, 200ng, 400ng, 800ng, 400ng, 200ng, 200ng, 1200ng, 600ng and 600ng of
149 cDNA were used, respectively. *YWHAZ*, *ACTB* and *GAPDH* genes were used as endogenous
150 references and oocytes matured with 0 μ M of inhibitor as calibrator (set as 1). Primers for the
151 transcripts have been described in **Table 1**. After each PCR run, a melting curve analysis

was performed to confirm that a single specific product was generated. Relative abundance (RA) analyses were performed using REST software (Pfaffl et al. 2002) and were based on primer efficiency.

2.7. Experimental design

Bovine immature oocytes were randomly allocated in six groups: 0 (control), 1 and 2 μ M 17AAG for the firsts 12h or for 24h of IVM in TCM199 medium at 38.5°C under 5% CO₂ and saturated humidity. The first experiment evaluated the effect of 17AGG doses on nuclear maturation and expression of specific genes by real time PCR in *in vitro*-matured oocytes exposed for 12h or 24h of IVM in three replicates. The second experiment evaluated the oocyte developmental competence after *in vitro* fertilization and embryo culture in a 3 x 2 factorial design (dose vs. time of exposure) in nine replicates.

2.7. Statistical analysis

The rates of cleavage were evaluated on day three (D3) and blastocysts at the seven day (D7) and eight (D8) after fertilization, calculated from nine replicates. Cleavage and blastocysts rates were analyzed by general linear model (Proc GLM) and means compared by SNK test. Apoptosis index and nuclear maturation proportion were analyzed by logistic regression (Proc Logistic) and total cell and apoptotic cell number by the linear mixed model (Proc Mixed) using the SAS statistical software (version 9.1). Values are shown as means \pm standard error mean (S.E.M.) and the significance level was $p < 0.05$. Primer efficiency was calculated using the LinRegPCR program (Ramakers et al., 2003) and used for quantification. The results of the endogenous reference and control group were analyzed by Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation *TEST*® software (Pfaffl et al., 2002), considering $P < 0.05$ significance level. Values are shown as mean \pm S.E.M.

3. Results

3.1. Experiment 1: Effect of 17AAG on nuclear maturation and transcript Levels in oocytes

Nuclear maturation was analyzed under fluorescence microscopy (Figure 1) and did not show difference when oocytes were submitted to 0, 1 and 2 μ M doses of inhibitor 17AAG for 12 or 24h of exposition (Table 2). Similarly, when 1 μ M of 17 AAG for 12h and control groups were compared, there was no difference ($p>0.05$) in the relative amount of *c-MOS*, *MAPK1*, *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *HSF1* and *HSP90A1* transcripts. However, *HSP70.1* were down regulated ($P<0.01$). Comparisons between 2 μ M of 17AAG for 12h and control showed lower relative amount of *GDF9* and higher *HSF1* transcripts ($p<0.05$), but *c-MOS*, *MAPK1*, *MATER*, *ZAR1*, *HSP70.1* and *HSP90A1* did not differ ($p>0.05$) (Figure 2A). Comparisons between 1 μ M of 17 AAG for 24h and control group showed no difference ($P>0.05$) in the expression of *c-MOS*, *MAPK1*, *MATER*, *GDF9*, *HSF1* and *HSP90A1* while *ZAR1* and *HSP70.1* were down regulated ($P<0.05$). Oocytes submitted to 2 μ M of 17AAG for 24h displayed lower relative amount of *HSP70.1* and higher *HSF1* transcripts than the control group. Other transcripts (*c-MOS*, *MAPK1*, *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, and *HSP90A1*) did not differ ($P<0.05$) when compared to control group (Figure 2B).

3.2. Experiment 2: Effect of 17AAG on embryonic development.

Regardless of the concentration (1 and 2 μ M) and exposure time (12 and 24 h) supplementing the HSP90 inhibitor (17AAG) during maturation, did not affect ($p > 0.05$) the cleavage rate. However, the concentration of 2 μ M reduced blastocysts rate in D7 ($p<0.02$) and D8 ($p<0.01$) compared to Control, while the concentration of 1 μ M did not differ between both groups (Table 2). It was observed that in relation to the exposure time of oocytes to 17AAG inhibitor, there was no difference ($p> 0.05$) in cleavage (D3) and

blastocysts (D7 and D8) rates between 12h and 24h (Table 3). However, there was no interaction ($p > 0.05$) between exposure time and concentration of 17AAG.

3.4. Evaluation of apoptotic index from blastocysts 192h post fecundation

Representative images illustrating analysis of oocytes for TUNEL labeling, DAPI for total number cells and dUTP fluorescein for apoptotic cells are shown in Figure 3. There was no interaction ($p > 0.05$) between inhibitor concentration and exposition time in relation to total cell number and apoptosis. The concentration of 2 μM of inhibitor showed less apoptotic index (18.69 ± 1.15) compared to control (20.69 ± 1.64) and 1 μM (21.23 ± 1.67 ; Figure 4A). However, when exposition time was considered, embryos from oocytes exposed for 24h to 17AAG presented the highest apoptotic index ($p < 0.05$) in compared to 12h (21.10 ± 1.10 vs. 19.13 ± 1.56 , respectively; Figure 4B). Oocytes exposition to 17 AAG showed difference in total cells (131.31 ± 7.88 , 120.44 ± 5.39 and 113.82 ± 5.81 to control, 1 μM and 2 μM groups, respectively) and apoptotic cells (25.51 ± 3.03 ; 24.22 ± 1.73 and 21.60 ± 1.84 , respectively to 0, 1 and 2 μM groups) of embryos analyzed from treatments with different concentration of inhibitor of HSP90. When exposition time was considered, embryos from 24h group had lower cell number (113.36 ± 3.81) than 12h group (134.92 ± 6.93 ; Figure 5).

4. Discussion

Inhibition of HSP90 by 17AAG affected relative abundance of some key transcripts in oocytes, demonstrating the importance of HSP90 in the maturation. Alteration on expression of HSF1 was observed when oocytes were matured with 2 μM 17AAG for 12 or 24h. HSF1 plays a protecting role to against severe stress conditions and regulates the expression of heat shock chaperones as HSP90 and HSP70 (Akerfelt and Morimoto, 2010). The higher HSF1 expression found in our study suggests a cellular response to the stress

caused by inhibition of the HSP90 protein. However, this was not enough to regulate the expression of *HSP70.1* gene. *HSP70.1* transcript was reduced when exposed to 17AAG for 12h or 24h, indicating a low ability of those oocytes to deal with cellular stress. It means, for instance that oocytes with low HSP70 protein levels may be more sensitive to heat stress, which can compromise their developmental competence. Interestingly, the amount of *HSP90A1* transcripts were similar to control when oocytes were exposed for 12 or 24h to 17AAG, suggesting that the increased *HSF1* expression was sufficient to keep the of *HSP901A* gene expression, despite being insufficient for HSP70.1 expression. Those data suggest that the requirement for HSP90 protein during *in vitro* maturation for the correct expression of some genes.

We did not find an interaction between time of exposition and 17AAG concentration, but the concentration of 2 μ M impaired the development to blastocyst stage after *in vitro* fertilization. In addition, blastocyst derived from the 2 μ M 17AAG group displayed lower total cell number and lower apoptotic index. Exposition of oocytes to 17AGG for 24h resulted in blastocysts with lower total cell number and higher apoptotic index. These data show the importance of HSP90 during oocyte maturation for further embryo development, affecting not only the embryo progression towards blastocyst stage but also blastocyst quality. Interestingly, the higher apoptosis index found in blastocysts derived from oocytes exposed to 17AAG for 24h coincides with the lower expression of *HSP01A* found in those oocytes. *HSP70* also have role on cellular protection against apoptosis (Mosser et al., 2000) and lower amount of those transcripts in oocytes could reflect in higher sensitivity of embryos to environmental stress caused by the *in vitro* culture.

The mechanism that inhibition of HSP90 affects the oocyte developmental competence is not clear. It was suggest in *Xenopus* oocyte that inhibition of HSP90 could block activation of MAP kinase and GVBD (Fisher; Mandart; Dorée, 2000) impairing oocyte

maturation. Our study did not show alteration in *MAPK* gene expression or on nuclear maturation when bovine oocytes were exposed to 17AAG during *in vitro* maturation, suggesting that a mechanism other than the nuclear progression to metaphase II maturation can be involved on the low oocyte developmental competence. We suggest that alteration in expression of important genes, as HSF1 and HSP70.1, may compromise the oocyte competence to develop to blastocyst stage after *in vitro* fertilization. In addition, lower expression of *ZAR1* and *GDF9* was found in oocytes exposed to 17AGG. *ZAR1* is a maternal effect gene important for subsequent embryo development (Uzbekova et al., 2006) and *GDF9* is an oocyte secreted growth factor important to oocyte-follicular cells communication (Gilchrist et al., 2008) and both are associated to oocyte quality. The lower expression of these genes in *in vitro*-matured oocytes suggests a low developmental competence.

Indeed, some of HSP90's client proteins are involved in gene transcription processes, like histone modification or RNA polymerase processivity (Calderwood and Neckers 2016). Through its client proteins, HSP90 can then influence the gene expression. Thus, the HSP90 inhibition of during *in vitro* maturation may compromise the oocyte transcription ability, affecting oocyte quality and further embryo development.

5. Conclusion

HSP90 is a protein important for bovine oocyte competence of and its inhibition during maturation is responsible for changing important transcripts in oocyte, reduces the blastocysts rate of produced and increase the apoptosis in embryos.

6. References

Akerfelt, M., Morimoto, R. I., and Sistonem, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 545-55

278 Bagatell, R., Paine-Murrieta, G. D., Taylor, C. W., Pulcini, E. J., Akinaga, S., Benjamin, I. J.,
 279 and Whitesell, L. (2000). Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response
 280 alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents. *Clin. Cancer Res.* **6**, 3312-3318.
 281 Calderwood, S. K., and Neckers, L. (2016). Hsp90 in Cancer: Transcriptional Roles in the
 282 Nucleus. *Adv Cancer Res.*, **129**, 89-106.
 283 Dean, J. (2002). Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse
 284 development. *J. Reprod. Immunol.*, **53**, 171-180.
 285 Dong, J., Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, MatzukMM. (1996) Growth
 286 differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*; **383**,
 287 531–535.
 288 Eppig, J.J. (1996). Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian
 289 mammals. *Reprod. Fert. Dev.* **8**, 485–9.
 290 Fisher, D. L., Brassac, T., Galas, S. and Dorée, M. (1999) Dissociation of MAP kinase
 291 activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes.
 292 *Development.* **126**, 4537–4546.
 293 Fisher, D.L., Mandart, E., and Doreé, M. (2000). Hsp90 is required for c-Mos activation and
 294 biphasic MAP kinase activation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **19**, 1516–1524.
 295 Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., and Glotzer, M. (1990). Cyclin is a component of
 296 maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell*, **60**, 487–494.
 297 Gilchrist, R. B., Lane, M., and Thompson, J, G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of
 298 cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, **14**, 159-77.
 299 Kaplan, K. B., and Li, R. (2012). A prescription for 'stress'- the role of Hsp90 in genome
 300 stability and cellular adaptation. *Trends Cell Biol.*, **22**, 576-83.

301 Metchat, A., Åkerfelt, M., Bierkamp, C., Delsinne, V., Sistonen, L., Alexandre, H., and
302 Christians, E. S. (2009). Mammalian heat shock factor 1 is essential for oocyte
303 meiosis and directly regulates Hsp90 expression. *J. Biol. Chem.*, **284**, 9521–9528.

304 Mosser, D. D., Caron, A. W.; Bourget, L., Meriin, A. B., Sherman, M. Y., Morimoto, R. I.,
305 and Massie, B. (2000). The Chaperone function of hsp70 is required for protection
306 against stress-induced apoptosis. *Mol and Cell Biol.* **20**, 7146–7159.

307 Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool
308 (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression
309 results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.*, **30**, 26-36.

310 Picard, D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. (2002). *Cell.*
311 *Mol. Life Sci.*, **59**, 1640–1648.

312 Prodromou, C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J.*, **473**, 2439-52.

313 Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. and Moorman, A. F. (2003). Assumption-free
314 analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci.*
315 *Lett.*, **339**, 62-66.

316 Taipale, M., Jarosz, D. F., and Lindquist, S. (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis:
317 emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 515-528.

318 Uzbekova, S., Roy-sabau, M., Dalbiès-Tran, R., Perreau, C., Papillier, P., Mompert, F.,
319 Thelie, A., Pennnetier, S., Cognie, J., Cadoret, V., Royere, D., Monget, P., and
320 Mermillod, P. (2006). Zygote arrest 1 gene in pig, cattle and human: evidence of
321 different transcript variants in male and female germ cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.*,
322 **4**, 12.

Young, J. C.; Moarefi, I.; Hartl, F.U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.*, **154**, 267–273.

Figure Caption

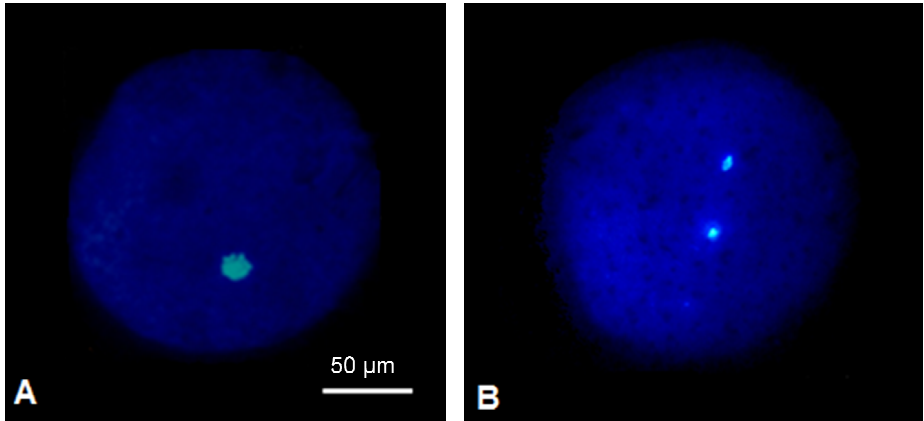


Figure 1: Stages of oocytes stained with Hoechst 33342 submitted to 17AAG inhibitor during maturation and evaluated under epifluorescence microscopy by DAPI and visualized blue in the filter 460nm. A) Oocyte at metaphase I; B) Oocyte at metaphase II.

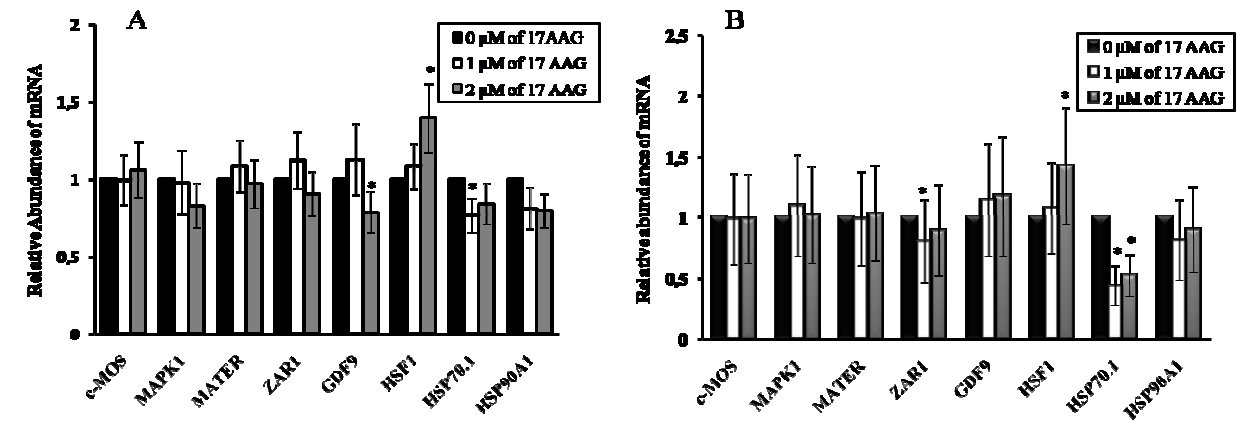


Figure 2: Relative abundance transcripts evaluation of *c-MOS*, *MAPK1*, *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *HSF1*, *HSP70.1* and *HSP90A1* in oocytes *in vitro* matured, submitted to 0, 1 e 2 μM of 17AAG1 for 12 (A) and 24h (B). Presence of asterisk (*) indicates significance difference (p<0.05). Data from three replicates.

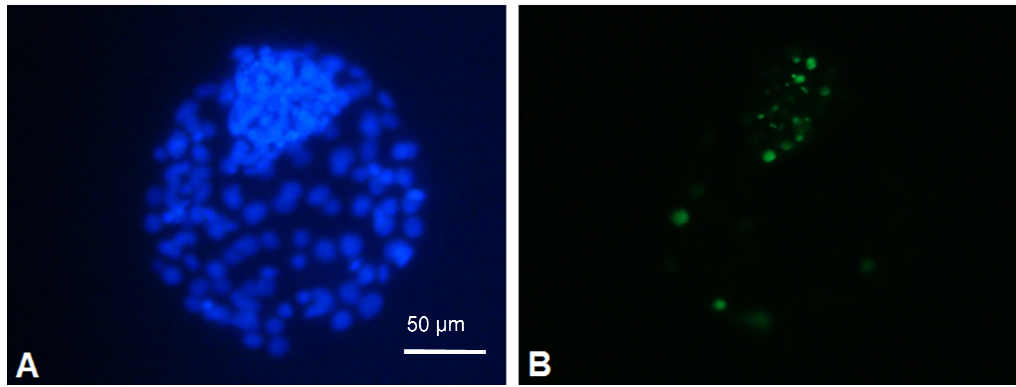


Figure 3. Representative images of bovine embryos derived from oocytes undergoing treatment during maturation with HSP90 inhibitor showing the detection of DNA fragmentation by TUNEL technique under increased 400X. A) Blastocysts marking blastomeres by DAPI and visualized blue in the filter 460nm. B) Blastocysts showing blastomeres being displayed in green stained with dUTP fluorescein in the filter 535 nm, indicating apoptosis.

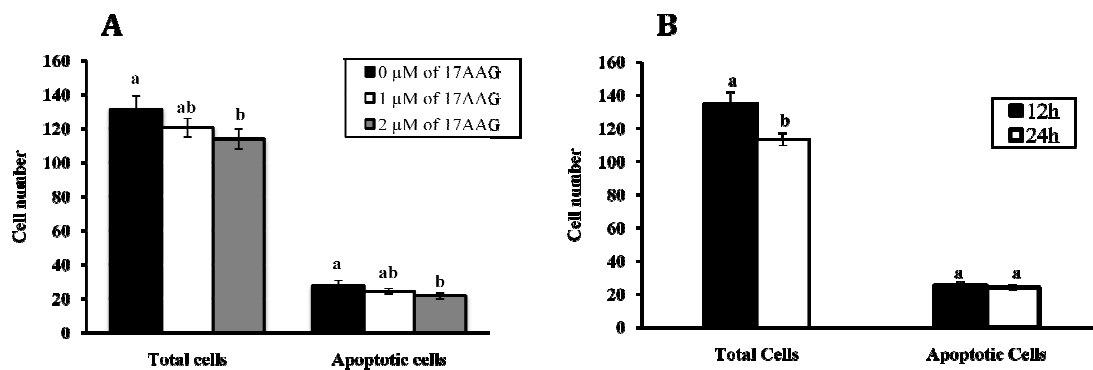


Figure 4. Effect of the different concentrations of 17AAG used during maturation of oocytes on total cells number and apoptotic cells of blastocysts on D8. Different letters differ ($P < 0.05$).

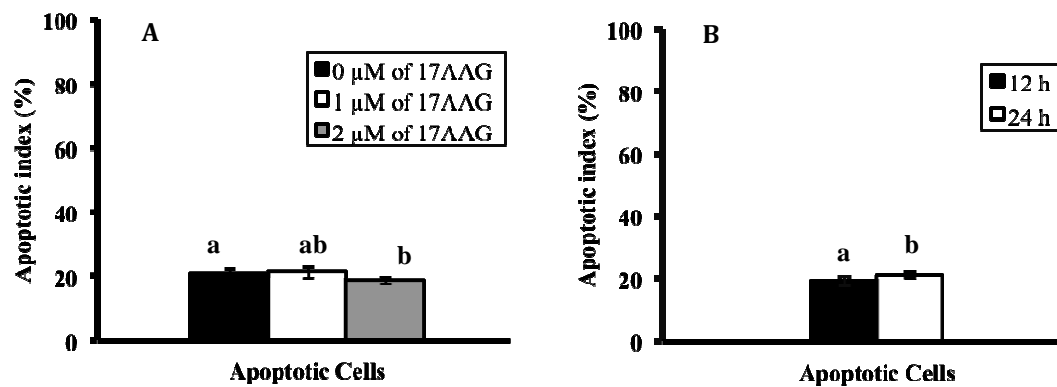


Figure 5. Effect of the different concentrations of 17AAG (A) and exposition time (B) during *in vitro* maturation of oocytes on apoptotic index of blastocysts on D8. Different letters differ (P<0.05)

Table Caption

Table1. Primers for real-time PCR

Product	Primer sequence 5'-3'	Linkage temperature	Product size	Acess number on GenBank/Reference
<i>YWHAZ</i>	F GCAAAAGACGGAAGGTGCTG R CCTCAGCCAAGTAGCGGTAG	59°C	197pb	NM_174814.2
<i>ACTB</i>	F GAGGCTCTCTTCCAGCCTTC R GGGCAGTGATCTCTTTCTGC	53°C	184bp	NM_173979.3
<i>GAPDH</i>	F GGC GTGAAC CACGAGAAGTATAA R CCCTCCACGATGCCAAAGT	53°C	120pb	Leutenegger et al (2000)
<i>c-MOS</i>	F CACCTTGACCCAGGTCATCT R GATGTCGGCCTTGGGTGTAA	59°C	325pb	XM_590874.5
<i>MAPK1</i>	F CCTGCTCTCTTCCACACA R TCATCGCTCGGGTCGTAGTA	59°C	177pb	NM_175793.2
<i>MATER</i>	F TAATGACGACGCTGTGTTCTG R GCGGTTCTCAGGTTCTTCAG	53°C	206pb	NM_001007814
<i>ZAR1</i>	F TGCCGAACATGCCAGAAG R TCACAGGATAGGCGTTTG	53°C	198pb	NM_001076203
<i>GDF9</i>	F GACCCCTAAATCCAACAGAA R AGCAGATCCACTGATGGA	53°C	120pb	NM-174681
<i>HSF1</i>	F ACTCCAACCTGGACAACCTG R TGAGTCTGGGCTGCTTTTCT	59°C	209pb	XM_010811828.2
<i>HSP90A1</i>	F GAGGATCCCCAGACACATGC R GACGTGTCGTCTCCTTC	62°C	143pb	NM_001012670.2
<i>HSP70.1</i>	F AACAAGATCACCATCACCAACG R TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG	59°C	275pb	NM_174550

Table 2: Evaluation of the oocytes maturation stained with Hoechst 33342 subjected to the doses 0, 1 or 2 uM 17AAG the inhibitor for 12 or 24 h exposure by fluorescence microscopy.

Oocytes	0 μ M of 17AAG	1 μ M of 17AAG	2 μ M of 17AAG	12h	24h
Immature	23.57 \pm 2.26	22.65 \pm 2.85	23.59 \pm 4.43	21.15 \pm 2.64	25.39 \pm 2.48
Matured	76.43 \pm 2.26	77.35 \pm 2.85	76.40 \pm 4.43	78.85 \pm 2.64	74.61 \pm 2.48

There was no significant difference among columns ($P>0.05$). Values are shown with as mean \pm SEM. Data from four replicates.

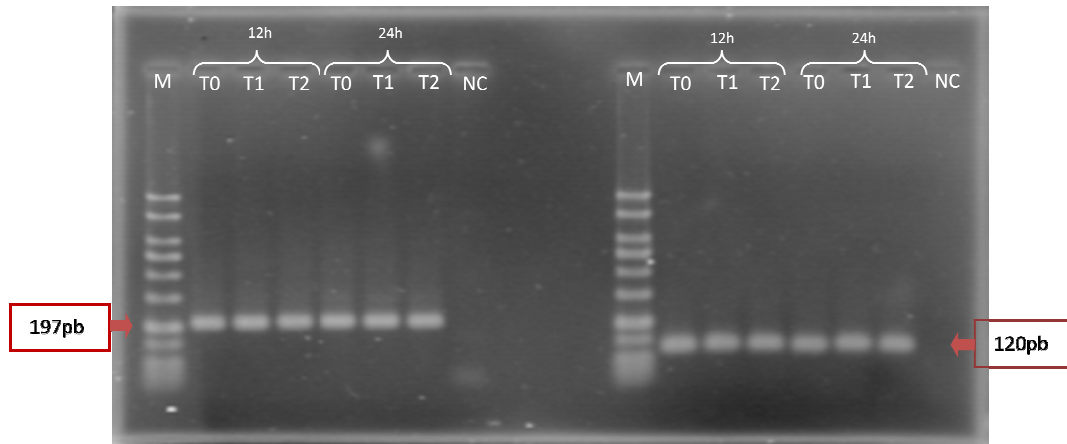
Table 3. Means evaluation of cleavage (Day 3) and embryos production (Days 7 and 8) rates to treatments with different exposure time of oocytes to 17AAG during *in vitro* maturation.

Exposition time to 17AAG	n	Cleavage	BLD7	BLD8
12h	842	66.06 \pm 1.9	26.6 \pm 2.2	29.4 \pm 2.9
24h	994	67.7 \pm 2.3	22.3 \pm 2.0	25.5 \pm 2.2

There was no significant difference ($P>0.05$). Values are shown with as mean \pm SEM. n= number of oocytes. Nine replicates.

376 **Supplementar Material**

377 **Gels resulting of fragments used for each primer**



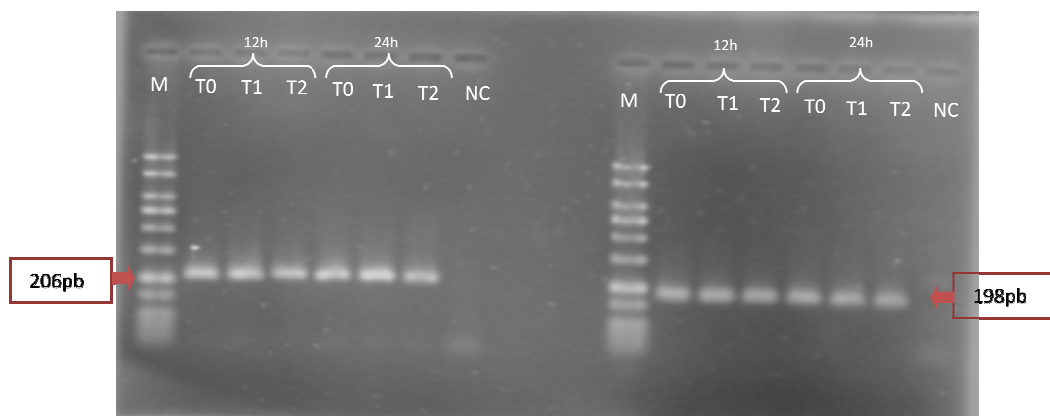
378

379 **Figure 6:** Agarose Gel (2%) of the samples resulting from Real Time PCR of GAPDH and YWHAZ
380 transcripts with 197 and 120pb fragments, respectively.

381 T0 = oocytes control without 17AAG added to the maturation medium; T1 = oocytes exposed to 1 μ M
382 17AAG during maturation; T2 = oocytes exposed to 2 μ M 17AAG during maturation; 12 and 24h =
383 exposure time to 17AAG during maturation; M = molecular weight marker of 50bp; NC = negative
384 control.

385

386



387

388 **Figure 7:** Agarose Gel (2%) of the samples resulting from Real Time PCR of MATER and ZAR1
389 transcripts with 206 and 198pb fragments, respectively.

T0 = oocytes control without 17AAG added to the maturation medium; T1 = oocytes exposed to 1μM 17AAG during maturation; T2 = oocytes exposed to 2μM 17AAG during maturation; 12 and 24h = exposure time to 17AAG during maturation; M = molecular weight marker of 50bp; NC = negative control.

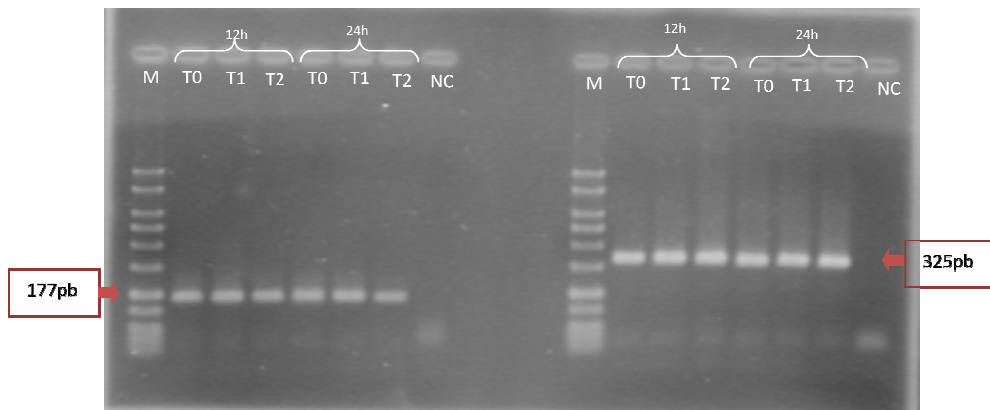


Figure 8: Agarose Gel (2%) of the samples resulting from Real Time PCR of *MAPK1* and *c-MOS* transcripts with 177 and 325pb fragments, respectively.

T0 = oocytes control without 17AAG added to the maturation medium; T1 = oocytes exposed to 1μM 17AAG during maturation; T2 = oocytes exposed to 2μM 17AAG during maturation; 12 and 24h = exposure time to 17AAG during maturation; M = molecular weight marker of 50bp; NC = negative control.

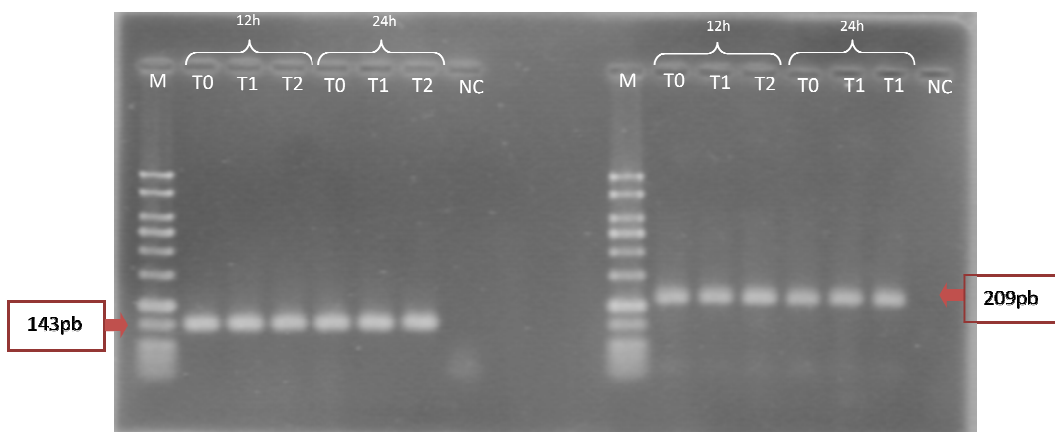


Figure 9: Agarose Gel (2%) of the samples resulting from Real Time PCR of HSP90A1 and HSF1 transcripts with 143 and 209pb fragments, respectively.

T0 = oocytes control without 17AAG added to the maturation medium; T1 = oocytes exposed to 1μM 17AAG during maturation; T2 = oocytes exposed to 2μM 17AAG during maturation; 12 and 24h = exposure time to 17AAG during maturation; M = molecular weight marker of 50bp; NC = negative control.

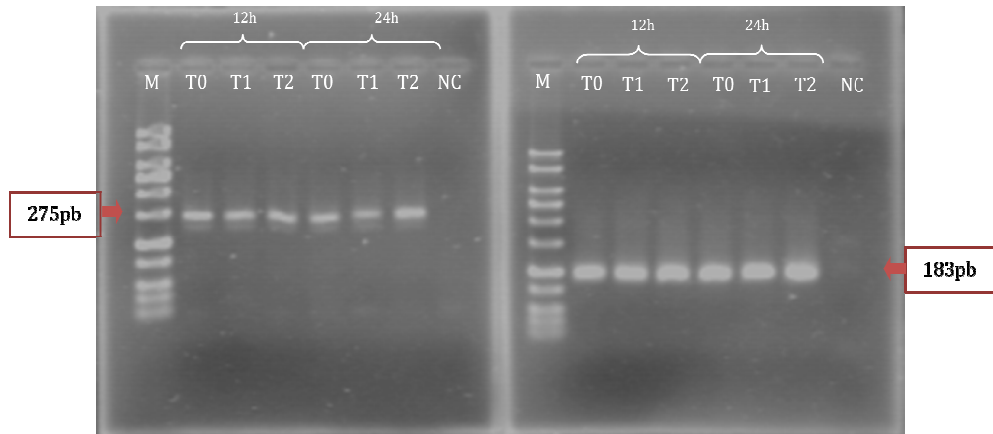


Figure 10: Agarose Gel (2%) of the samples resulting from Real Time PCR of *HSP70.1* and *ACTB* transcripts with 275 and 183pb fragments, respectively.

T0 = oocytes control without 17AAG added to the maturation medium; T1 = oocytes exposed to 1μM 17AAG during maturation; T2 = oocytes exposed to 2μM 17AAG during maturation; 12 and 24h = exposure time to 17AAG during maturation; M = molecular weight marker of 50bp; NC = negative control.

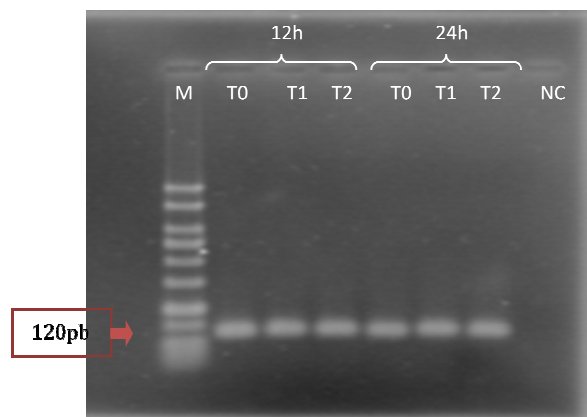


Figure 11: Agarose Gel (2%) of the samples resulting from Real Time PCR of *GAPDH* transcripts with 120 pb fragments.

422 T0 = oocytes control without 17AAG added to the maturation medium; T1 = oocytes exposed to 1μM
423 17AAG during maturation; T2 = oocytes exposed to 2μM 17AAG during maturation; 12 and 24h =
424 exposure time to 17AAG during maturation; M = molecular weight marker of 50bp; NC = negative
425 control.
426

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Reproduction in Domestic Animals

Manuscript ID

RDA-OA-May-2017-0187

Title

Inhibition of HSP90 aggravates the effects of Heat Shock on developmental competence of bovine oocytes

Authors

Souza, Eliza
Carvalho, Luciano
Batista, Ribrio
Quintao, Carolina
Louro, Iuri
Camargo, Luiz Sergio

Date Submitted

08-May-2017

Author Dashboard

Inhibition of HSP90 aggravates the effects of Heat Shock on developmental competence of bovine oocytes

Souza, E.D.^{*1,2}; Carnevalheira, L. R.^{2,3}; Batista, R.I.T.P.^{2,4}; Quintão, C.C.R.²; Louro, I.D.¹; Camargo, L.S.A.²

¹Universidade Federal Espírito Santo/RENORBIO, Vitória, ES, Brasil

²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

³Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil

⁴Universidade Federal Fluminense, RJ, Brasil

^{*}FAPES Doctorate Scholarship

Abstract: HSP90 is a protein involved in cellular homeostasis. *In vitro* studies demonstrate that their inhibition during maturation reduces the ability of oocyte development after fertilization. The present study investigated HSP90 inhibition by 17AAG during the heat shock (HS) on bovine oocyte developmental competence. COCs were allocated in four groups during *in vitro* maturation (IVM): i) Control (n=315) - culture at 38.5 per 24 h; ii) HS (n=281) - culture at 41.5°C for the first 12h of IVM; iii) 17AAG (n=298) - culture medium supplemented with 2μM of 17AAG for the first 12h of IVM and iv) 17AAG+HS (n=312) - culture medium supplemented with 2μM of 17AAG plus heat shock for the first 12h of IVM. IVM was performed in TCM199 medium supplemented with porcine FSH and 10% estrus cow serum. After maturation, oocytes were fertilized and cultured *in vitro* for 8 days. There was no difference (P>0.05) on cleavage rate among groups but HS group or 17AAG group decreased (P<0.05) the blastocyst rate at D7 (17.00±1.61% and 22.44±2.39%, respectively) and D8 (17.29±0.96% and 23.01±1.94%, respectively) when

compared to control group ($32.67 \pm 3.76\%$ and $33.54 \pm 4.08\%$ for D7 and D8, respectively) but no significant difference between HS and 17AGG groups was found. Lowest ($P < 0.05$) blastocyst rate at D7 ($6.04 \pm 2.18\%$) and D8 ($5.84 \pm 1.75\%$) was achieved when oocytes were *in vitro* matured with 17AGG under heat shock conditions (17AAG+HS group). Relative amount of *HSF1* transcripts was higher ($p < 0.052$) in 17AAG group than in Control and 17AAG+HS groups HS and 17AAG+HS. Higher ($p < 0.03$) amount of *HSP90* transcripts were found of 17AAG+HS group than Control and HS groups. In conclusion, the inhibition of HSP90 by 17AAG during IVM aggravates the deleterious effect of heat shock on oocyte developmental competence and suggests that HSP90 may also play a role on cellular protection during heat shock in bovine oocytes.

Key-words: heat shock protein 90, *in vitro* production, stress.

1. Introduction

Deleterious effects on the animal reproductive system caused by heat stress, result in losses of bovine industry worldwide (Silva et al., 2013). Reduced fertility when females are exposed to hyperthermia is caused by a multiplicity of effects including actions on hormone secretion (Wolfenson et al., 2000), damage to the oocyte and embryo survival (Edwards & Hansen, 1997; Rivera & Hansen, 2001). Exposure of oocytes to heat stress for long periods leads disturbs in follicular microenvironment and physiology of mammalian oocyte (Picton et al., 1998; McNatty et al., 1999) resulting in reduced competence to fertilization and subsequent development to blastocysts (Payton et al., 2004; Roth et al., 2004).

50 *In vitro* reports have demonstrated that high temperature reduce protein synthesis in
51 oocyte (Edwards et al., 1997), disturbs microfilaments, microtubule and architecture of the
52 meiotic spindle (Roth et al., 2005), besides cell death induced by apoptosis (Roth et al.,
53 2004). These deleterious effects of the heat shock reduce the percentage of oocytes that
54 become embryos after FIV (Roth et al., 2004, Edwards et al., 1997).

55 In order to regulate internal body temperature, animal has multiple cellular
56 mechanisms available to counter the stress conditions. One of them is cellular responses
57 that include altered expression of stress genes (Collier et al., 2008). Cumulus cells play a
58 critical role in protection of oocyte and they allow increased synthesis of Heat Shock
59 Proteins (HSPs) in oocytes after heat shock (Edwards & Hansen, 1997). HSPs are
60 chaperone proteins highly conserved among species and they are involved in
61 cytoprotective functions (Kregel, 2002).

62 Heat shock protein 90 (HSP90) is a protein involved in homeostasis and is
63 expressed under normal and stress conditions. When expressed in unstressed normal cells
64 it is one of the most proteins comprising 1-2% of cellular protein in eukaryotes (Craven et
65 al., 1996). It assists in the signal transduction, proteins folding, restore tridimensional
66 protein structure, intracellular protein transport, cellular regulation, cellular survival and
67 protein degradation (Morimoto et al., 1997; Csermely et al., 1998).

68 The 17AAG (17-allylamino-17- demethoxygeldanamycin) is a HSP90 inhibitor
69 derived of geldanamycin and binds to the N-terminal ATP binding site of HSP90 and
70 blocks its function (Neckers and Ivy, 2003). In growing oocytes, HSP90 is a major HSP
71 and reducing of HSP90 activity by 17AAG in mouse oocytes during maturation caused
72 changes in meiotic maturation as partial blockage of the germinal vesicle breakdown
73 (Metchat et al., 2009). In pig, treatment of oocytes during maturation with 17AAG reduced
74 meiotic progression and affected expression genes in preimplantation stage embryos (Son

et al., 2011). This study aimed to evaluate the effect of 17AAG during in vitro maturation under heat shock on bovine oocyte developmental competence and gene expression.

2. Material and Methods

2.1. Oocytes recovery and selection

Bovine ovaries were collected at local slaughterhouse and transported in physiological saline solution (0.9% w/v NaCl at 37°C with 0.1gL⁻¹ penicillin–streptomycin) to the laboratory. At the laboratory the ovaries were washed with saline solution and placed in water bath (37°C) and follicles between 2 to 8 mm diameters were aspirated. Cumulus-oocytes-complexes (COCs) with homogeneous cytoplasm and at least three layers of surrounding cumulus cells were selected. Immature bovine COCs were randomly allocated in four groups during IVM as follow: Control (n=315) - without heat shock and 17AGG; HS (n=281) - 41.5°C for the first 12h of IVM; 17AAG (n=298) - 2μM 17AGG for the first 12h of IVM and; 17AAG+HS (n=312) -2μM 17AGG plus heat shock for the first 12h of IVM.

2.2. In vitro maturation

The CCOs selected were washed twice in TALP-Hepes medium and once in TCM199 (Invitrogen, Carlsbarg, USA) supplemented with porcine FSH (Hertape Calier, Juatuba, Brazil) and 10% estrus cow serum. Maturation was performed in Nunc plates containing 400 μL of TCM199 medium with 30-40 COCs per well, in incubator under 5% CO₂ in air, 95% humidity and 38.5°C for 24h. For heat shock, the oocytes were matured

under 7% CO₂ in air, 95% humidity and temperature of 41.5 °C during first 12h and then transferred to incubator under 5% CO₂ in air, 95% humidity and 38.5°C for additional 12h to complete the IVM period. For 17AAG treatment, the oocytes were incubated with 17AAG during first 12h of IVM and then they were washed twice and transferred to *in vitro* maturation medium without 17AAG to complete the IVM period.

2.4. *In vitro* fertilization and embryo culture

COCs matured were washed twice in Fert-Talp medium and transferred to fecundation drops of 100 µL with diluted semen. Semen was processed by Percoll gradient (Nutricell, Campinas, Brazil) and oocytes were *in vitro* fertilized for 20h with 2×10^6 spermatozoa/mL. IVF was performed in incubator under the same IVM atmospheric conditions.

At the end of IVF, the presumptive zygotes were completely denuded in a PBS solution with 0.1% hyaluronidase and then cultured in drops with 500 µL of modified CR2aa medium supplemented with 2.5% fetal calf serum (Nutricell) in incubator at 38.5°C under 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ and saturated humidity. Cleavage rate was evaluated 72h post-fertilization and blastocyst rate was evaluated at day seven (D7) and day eight (D8).

2.5. *RNA extraction, reverse transcription and relative quantification by polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Embryos at 8-cell stage were washed three times in PBS plus 0.1% polyvinyl alcohol and then rapidly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Three pools of 10 8-cell stage embryos per group were used for total RNA extraction with RNeasy Micro

Kit (Quiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase to prevent DNA contamination. Elution was performed with 14 μ L of RNAase-free water. RNA samples (6 μ L/reverse transcription reaction, equivalent to 4.3 embryos) were reverse transcribed using the SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions using oligo(dT)₂₀ primers, dNTP mix, Superscript III RT, RNase OUT, MgCl₂, RT buffer in a final volume of 20 μ l (equivalent to 0.21 embryos/ μ L). Samples were first incubated at 65°C for 5 min and then for 50°C for 50 min. The reaction was terminated at 85°C for 5 min and then chilled on ice. After that, RNase H was added to the samples and incubated at 37°C for 20 min. Quantification of RNA and cDNA from each pool per group was performed using 1 μ L sample in a spectrophotometer (Nanodrop 2000, Wilmington, DE, USA).

Relative quantification was performed in triplicate using real-time polymerase chain reaction (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Foster City, CA, USA). Reactions were prepared using a mixture of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.1 μ M primers, nuclease-free water and reverse transcribed cDNA. The volume of reverse transcribed cDNA for every primer was previously calculated and it is shown in microliter and as embryo equivalent. For *YWHAZ* (Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta) and *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were added 0.32 μ L of reverse transcribed cDNA per PCR reaction (equivalent to 0.07 embryo/reaction); for *ACTB* (beta actin), *HSP40* (Heat shock 40kDa protein) and *OCT4* (Octamer-binding transcription factor 4) were added 0.64 μ L/PCR reaction (equivalent to 0.14 embryo/reaction); for *HSF1* (Heat Shock Factor 1) was added 1.92 μ L/PCR reaction (equivalent to 0.42 embryo/reaction) and for *HSP90A1* (Heat Shock Protein 90 KDa class A member 1) was added 0.96 μ L/PCR

reaction (equivalent to 0.21 embryo/reaction). *YWHAZ*, *ACTB* and *GAPDH* genes were used as endogenous references. The cDNA template was denatured at 95°C for 15 minutes, followed by 45 cycles of 94°C for 15 seconds, annealing at specific temperature for each primer for 15 seconds (Table 1) and extension at 60°C for 30 seconds. Negative controls, comprising the PCR reaction mixture without nucleic acids, were also run with each group of samples. After each PCR run, a melting curve analysis was performed to confirm that a single specific product was generated. Primer efficiency was calculated using LinRegPCR software (Ramakers et al., 2003) for each reaction. The primer efficiency average was 1.92; 1.89; 1.63; 1.80; 1.86; 1.92; 1.92 to *YWHAZ*, *GAPDH*, *ACTB*, *HSF1*, *HSP90*, *HSP40* and *OCT4*, respectively

2.7. Statistic Analysis

The cleavage rates evaluated on third day (D3) and blastocysts rates on the seventh day (D7) and eighth day (D8) after fertilization from nine replicates were analyzed by general linear model (Proc GLM) and means compared by SNK test. Values are shown as means \pm standard error mean (S.E.M.) and the significance level was $p < 0.05$. Relative quantification was performed by Comparative Ct quantification ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) method relative to the sample with the highest delta CT value in the control group (calibrator sample) and was based on primer efficiency. Analysis was performed by mixed model using the Proc Mixed command in the SAS 9.0 software. $P < 0.052$ was considered significant and the relative amount values are presented as mean \pm S.E.M.

3. Results

There was no difference ($P>0.05$) on cleavage rate among groups. Heat shock or treatment with 17AAG, both for 12h of IVM, decreased ($P<0.05$) the blastocyst rate at D7 and D8 when compared to Control group but no significant difference between HS and 17AAG treatments was found. The lowest ($P<0.05$) blastocyst rate at D7 and D8 was achieved when oocytes were submitted simultaneously to 17AAG and heat shock for 12h of IVM (17AAG + HS treatment, Table 2).

In order to evaluate the expression of specific transcripts related to heat stress and pluripotency during the embryonic genome activation (EGA), analysis of relative amount of *HSF1*, *HSP90A1*, *HSP40* and *OCT4* transcripts in 8-cell-stage embryos were performed. Embryos of 17AAG group displayed higher ($P<0.052$) amount of *HSF1* transcripts than those in Control and 17AAG+HS groups and no difference was found between embryos of Control, HS and 17AAG+HS groups (Figure 1). The amount of *HSP90A1* transcripts was higher ($p<0.03$) in embryos of 17AGG+HS group than those of Control and HS groups but similar ($p>0.05$) to embryos of 17AAG group. No difference ($p>0.05$) was found between Control, HS and 17AAG groups. Likewise, no difference ($p>0.05$) among groups was found for *HSP40* and *OCT4* genes (Figure 1).

4. Discussion

Heat stress has been a serious problem for bovine reproduction in the hot seasons or in tropical and subtropical regions. *In vitro* studies showed that heat shock during *in vitro* maturation affects the oocyte competence, reducing the blastocyst rate (Hoth and Hansen, 2005). On the other hand, HSP90 is an important chaperone protein involved in cell homeostasis under physiological and stress conditions (Rutherford, 2003; Mittelman and Wilson, 2010) and its inhibition by 17AAG in mouse oocyte impairs maturation (Metchat

et al., 2009). In the present study we confirm the negative effects of heat shock and HSP90 inhibition during the bovine oocyte maturation on further development after *in vitro* fertilization and, more important, we found that when oocytes are under both conditions simultaneously, their effects are exacerbated. Our findings suggest that the HSP90 is required not only to oocyte maturation but also to attenuate the deleterious effect of heat shock.

The effects of heat shock, HSP90 inhibition by 17AAG and their combination during *in vitro* maturation on cell division were not detected at early stages as there was no difference on early cleavage rate among groups; however, development rate until blastocysts stage is impaired, mainly when heat shock is performed in oocytes exposed to the HSP90 inhibitor. This finding shows that the deleterious effect of heat shock and inhibition of HSP90 during maturation on oocyte development can only be perceived after the first cell divisions.

The mechanism by which inhibition of HSP90 affects the oocyte competence is unclear. The HSP90 is a large multiprotein complexes involved infolding client proteins, being HSP70 and HSP40 are part of this complex (Kanelakis et al. 2000). HSP90 provides the maintenance of cellular homeostasis (Taipale et al., 2010) and maintenace of genome integrity (Mittelman and Wilson, 2010). Early study reported that HSP90 is required to activate the cMos protein in *Xenopus* oocytes (Fisher et al., 2000). Inhibition or reduction of this chaperone by 17AAG can disturb those events impairing the oocyte developmental competence.

The most interesting finding is the effect of heat shock on oocyte developmental competence when oocytes are exposed to Hsp90 inhibitor. The blastocysts rate of 17AGG+HS group was between 2.8 to 3.9 fold lower than those of 17AAG and HS groups. Under stress conditions both HSP90 and HSP70 are required to maintain a

functional proteome with properly folded proteins (Vabulas et al., 2010). It is likely the denatured protein can not be properly refolded due the inhibition of HSP90, impairing an adequate oocyte response to heat shock with negative impact on developmental competence. In this sense, our data suggests that HSP90 is required to attenuate the heat shock effects on oocyte during in vitro maturation. This hypothesis is corroborated by the higher amount of *HSP90A1* transcripts found in embryos of 17AAG+HS group when compared to Control and HS groups whereas no difference of *HSP90A1* amount among Control, HS and 17AAG was found. One possible interpretation for this higher abundance of *HSP90A1* transcripts is that embryos from heat-stressed oocytes exposed to 17AAG do not have enough active HSP90 protein (because of the HSP90 inhibitor) but still have demand on it due to the presence of misfolded proteins, which results in an increased transcription of *HSP90* mRNA for further translation. However, we expected to find also higher amount of *HSF1* transcripts in embryos of 17AAG+HS group, because HSF1 has been considered an important up-regulator of *HSP90* transcription (Prodromou, 2017), but there was no difference among Control, HS and 17AAG+HS groups. In contrast, higher amount of *HSF1* transcripts was found in embryos of 17AAG group, what was expected because of 17AAG can play a role as a HSF1 activator (Chen et al., 2014) but the same increase was not found in embryos of 17AAG+HS group. Besides, the amount of *HSP90* transcripts was not increased in embryos of 17AAG group, despite the higher amount of *HSF1* transcripts in those embryos, contradicting our expectation. The reason for those discrepancies is not clear but maybe other factors or mechanism can also be involved on modulation of *HSP90* transcription by HSF1 in early embryos derived from heat-shocked oocytes, which requires further investigation.

Heat shock can alters oocyte cytoskeletal (Roth et al., 2005), protein synthesis (Edwards et al., 1997) and amount of mRNA in ooplasm (Ticianelli et al., 2016). A correct

storage of maternal mRNA and proteins provides the oocyte its developmental competence to maturation, fertilization and embryo early development (Trounson et al., 2001; Roth 2008). Previous study found a seasonal effect on amount of specific mRNAs in oocyte and embryos, with lower amount of *OCT4* transcripts in 8-cell-stage embryos derived from oocytes collected in the hot season than those from oocytes collected in cold season (Gendelman et al., 2012). In our study we did not find significant differences on amount of *OCT4* transcripts in 8-cell-stages embryos among the groups, despite the values were numerically increased in embryos from heat-shocked oocytes, i.e., HS and 17AAG+HS groups. Because of that, it is not clear if the heat shock during *in vitro* maturation can have any influence on amount or expression of the *OCT4* gene in the embryos derived from heat-shocked oocyte. We also evaluated the relative amount of *HSP40* transcripts because it is a co-chaperone that interacts with chaperones to maintain the cell protein homeostasis (Alderson et al., 2016) and we found that the heat shock, 17AAG or their combinations during oocyte maturation has no effect on *HSP40* transcripts amount in 8-cell-stage embryos, suggesting that this gene may play a minor role on development of early embryos derived from heat shocked oocytes.

4. Conclusion

In conclusion, inhibition of HSP90 with 17AAG and the heat shock during oocyte maturation reduces embryo development toward blastocyst stage and the combination of heat shock with inhibition of HSP90 worsens the deleterious effect on oocyte developmental competence. We suggest that HSP90 may also play role on cellular protection during heat shock in bovine oocytes.

5. Acknowledgments

E.D.Souza was supported by scholarship from FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo). This study was supported by cNPq and FAPEMIG.

6. References

Alderson, T. R., Kim, J. H., Markley, J. L. (2016). Dynamical Structures of Hsp70 and Hsp70-Hsp40 Complexes. *Structure*, 7, 1014-1030.

Chen, Y., Wang, B., Liu, D., Li, J. J., Xue, Y., Sakata, K., Zhu, L. Q., Heldt, S. A., Xu, H., Liao, F. F. (2014). Hsp90 chaperone inhibitor 17-AAG attenuates A β - induced synaptic toxicity and memory impairment. *Journal of Neuroscience*, 7, 2464-70.

Collier, R. J., Collier, J. L., Rhoads, R. P., Baumgard, L. H. (2008). Genes involved in the bovine heat stress response. *Journal of Dairy Science*, 91, 445–454.

Craven, R. A., Egerton, M., Stirling, C. J. (1996). A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *The EMBO Journal*, 15, 2640–2650.

Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, 79, 129–168.

Edwards, J. L., Hansen, P. J. (1997). Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Molecular Reproduction and Development*, 46, 138–145.

Fisher, D. L., Mandart, E., Doreé, M. (2000). Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*, 19, 1516–1524.

Gendelman, M., Roth, Z. (2012). Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. *Biology of Reproduction*, 86, 1–9.

Kanelakis, K. C., Murphy, P. J., Galigniana, M. D., Morishima, Y., Takayama, S., Reed, J.C., Toft, O. D., Pratt, W. B. 2000. hsp70 interacting protein Hip does not affect glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery except to oppose the effect of BAG-1. *Biochemistry*, 39, 14314–14321.

Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, 92, 2177–2186.

McNatty, K. P., Heath, D. A., Lundy, T., Filder, A. E., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groom, N., Tisdall, D. J. (1999). Control of early ovarian follicular development. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54 (suppl), 3–16.

Metchat, A., Akerfelt, M., Bierkamp, C., Delsinne, V., Sistonen, L., Alexandre, H., Christians, E. S. (2009). Mammalian heat shock factor 1 is essential for oocyte meiosis and directly regulates Hsp90alpha expression. *Journal of Biology Chemical*, 284, 9521-9528.

Mittelman, D., Wilson, J. H. (2010). Stress, genomes, and evolution. *Cell Stress Chaperones*, 15, 463-466.

Morimoto, R. I., Kline, M. P., Bimston, D. N., Cotto, J. J. (1997). The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochemical*, 32, 17–29.

Neckers, L., Ivy, S. P. (2003). Heat shock protein 90. *Current Opinion in Oncology*, 15, 419-424.

Payton, R. R., Romar, R., Coy, P., Saxton, A. M., Lawrence, J. L., Edwards, J. L. (2004). Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biology of Reproduction*, 71, 1303–1308.

Picton, H., Briggs, D., Gosden, R., (1998). The molecular basis of oocyte development. *Molecular Cell Endocrinology*, 145, 27–37.

Prodromou, C. (2017) Regulatory Mechanisms of Hsp90. *Biochemical and Molecular Biology Journal*, 30, 3:1-8.

Ramakers, C.; Ruijter, J. M.; Deprez, R. H. Moorman, A. F.(2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339, 62-66.

Rivera, R. M., Hansen, P. J. (2001). Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction*, 121, 107–115.

Roth, Z., Hansen, P. J. (2004). Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*, 71, 1898–906.

Roth, Z., Hansen, P. J. (2005). Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, 129, 235–44.

Roth, Z. (2008) Heat Stress, the Follicle, and Its Enclosed Oocyte: Mechanisms and Potential Strategies to Improve Fertility in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 238–244.

Rutherford, S. L. (2003). Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability. *Nature Reviews Genetic*, 4, 263–274.

Silva, C. F., Sartorelli, E. S., Castilho, A. C. S., Satrapa, R. A., Puelker, R. Z., Razza, E. M., Ticianelli, J. S., Eduardo, H. P., Loureiro, B., Barros, C. M. (2013). Effects of heat

stress on development, quality and survival of *Bosindicus* and *Bostaurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 79, 351–357.

Son, M. J., Park, J. M., Min, S. H., Hong, J. H., Park, H., Koo, D. B. (2011) hsp90 inhibitor induces cell cycle arrest and apoptosis of early embryos and primary cells in pigs. *Reproductive and Developmental Biology*, 35, 33-45.

Taipale, M., Jarosz, D. F., Lindquist, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 515-528.

Ticianelli, J. S., Emanuelli, I. P., Satrapa, R. A., Catilho, A. C., Loureiro, B., Sudano, M. J, Fontes, P. K., Pinto, R. F, Razza, E. M., Surjus, R. S., Sartori, R., Assunção, M. E., Visintin, J. A., Barros, C. M., Paula-Lopes, F. F. (2016). Gene expression profile in heat-shocked Holstein and Nelore oocytes and cumulus cells. *Reproduction, Fertility and development*. <https://doi.org/10.1071/RD16154>

Trounson, A., Anderiesz, C., Jones, G. (2001). Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction*, 121, 51–75.

Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U. (2010). Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 1-18.

Wolfenson, D., Roth, Z., Meidan, R. (2000). Impaired reproduction in heat stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, 60, 535–547.

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

Table

Table1. Primers for real-time PCR

Product	Primer sequence 5’-3’	Linkage temperature	Product size	Acess number on GenBank/Reference
<i>YWHAZ</i>				

	F GCAAAAGACGGAAGGTGCTG	59°C	197pb	<u>NM_174814.2</u>
	R CCTCAGCCAAGTAGCGGTAG			
<i>GAPDH</i>	F GCGTGAACCACGAGAAGTATAA	53°C	120pb	Leutenegger et al. (2000)
	R CCCTCCACGATGCCAAAGT			
<i>β-ACTINA</i>	F CAGGCTCTCTTCCAGCCTTC	53°C	184pb	NM_173979.3
	R GGGCAGTGATCTCTTTCTGC			
<i>HSF1</i>	F ACTCCAACCTGGACAACCTG	59°C	209pb	<u>XM_010811828.2</u>
	R TGAGTCTGGGCTGCTTTTCT			
<i>HSF2</i>	F AGCAAAACATGCACAACAGC	55°C	233pb	NM_001083405
	R AAATCCGCTCCCTTGACTTT			
<i>HSP90A1</i>	F GAGGATCCCCAGACACATGC	62°C	143pb	NM_001012670.2
	R GACGTGTCGTCGTCTCCTTC			
<i>HSP40</i>	F AGGACTGACCAGGGACCTTT	55°C	220pb	NM_001033763.1
	R AGACTGCATTGCCTTTGCTT			
<i>OCT4</i>	F GCTTGATCGTTTGCCCTTCT	55°C	105pb	XM_019985832.1
	R CCCACCCTGCAGCAAATTA			

418

419

420 **Table 2.** Cleavage and blastocyst (Bl) rates at D7 and D8 for Control, 17AAG, Heat Shock
421 (HS) and 17AAG plus HS treatments.

422

Treatments	n	Cleavage (%)	Bl D7 (%)	Bl D8 (%)
------------	---	--------------	-----------	-----------

Control	315	73.35±4.59	32.67±3.76 ^a	33.54±4.08 ^a
17AAG	298	60.39±7.85	22.44±2.39 ^b	23.01±1.94 ^b
HS	281	62.49±5.97	17.00±1.61 ^b	17.29±0.96 ^b
17AAG + HS	312	52.46±6.16	6.04±2.18 ^c	5.84±1.75 ^c

Values with different superscript letters in the same column differ (P<0.05). Values are shown as mean±s.e.m

Figure

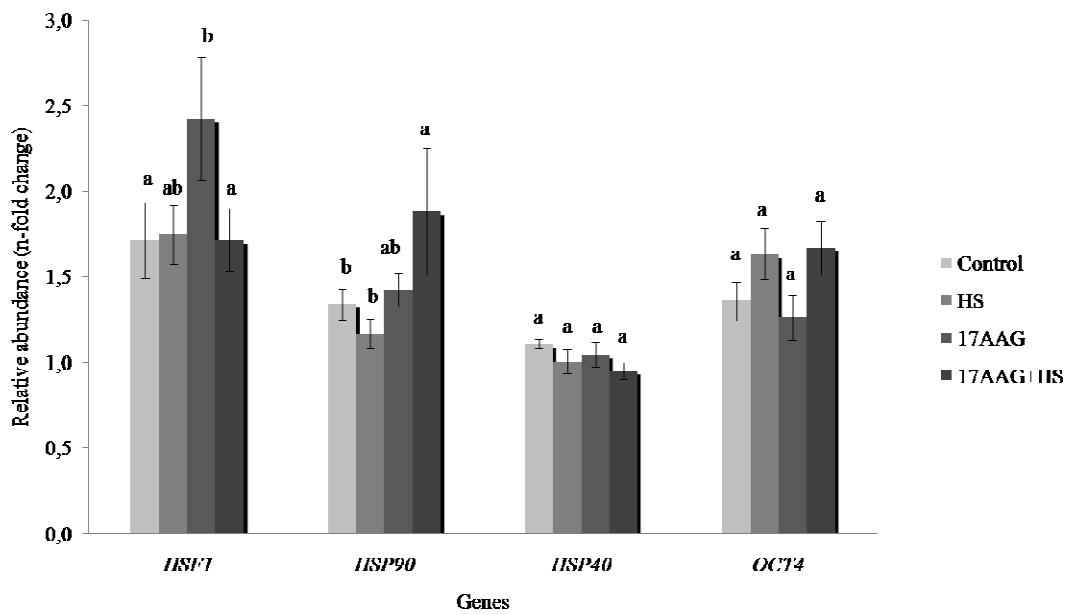


Figure 1: Relative abundance transcripts evaluation of *HSF1*, *HSP90A1*, *HSP40* and *OCT4* in embryos, submitted to Heat Shock (HS), 17AAG and 17AAG during Heat Shock (17AAG+HS). Data of HS, 17AAG and 17AAG+HS were compared to Control sample (calibrator). Presence of asterisk (*) indicates significance difference ($p < 0.05$). Data from three replicates.