

Influência da raça do touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*) na tolerância ao estresse térmico calórico de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Influence of sire breed (Bos indicus vs Bos taurus) on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos

Thais NABHAN¹; Rafael Augusto SATRAPA¹; Renato Arantes Lima SIMÕES¹;
Cíntia Fernandes da SILVA¹; Eduardo Montanari RAZZA¹; Raquel PUELKER¹;
Luzia Aparecida TRINCA²; Ciro Moraes BARROS¹

¹Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil

²Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil

Resumo

Para melhor compreender as diferenças entre zebuínos e taurinos em relação à resistência ao ETC, objetivou-se verificar se a resistência ao ETC é resultado da contribuição genética do oócito, do espermatozoide ou de ambos. Oócitos de vacas das raças Nelore e mestiças com fenótipo predominante da raça Holandesa preto e branco (mHPB) foram coletados, maturados e fertilizados com espermatozoide de touros das raças Nelore (N), Angus (An), Brahman (Bra) e Gir (Gir). Noventa e seis horas pós-inseminação (hpi), embriões ≥ 16 células foram separados ao acaso em dois grupos: controle e ETC. Embriões do grupo controle foram cultivados a 39 °C continuamente e do grupo ETC expostos a 41 °C por 12 horas, retornando a seguir para 39 °C. Não foi observado efeito do ETC nas raças estudadas, sem redução nas taxas de blastocisto e blastocisto eclodido. As taxas de clivagem e mórula dos embriões mHPB x Gir foram inferiores ($p < 0,05$) às das demais raças. As raças mHPB x N apresentaram taxas de blastocisto superiores as raças mHPB x An e mHPB x Gir ($p < 0,05$). Concluiu-se que a contribuição genética do oócito é mais importante do que a do espermatozoide, uma vez que a raça do touro não influenciou a resistência embrionária ao ETC.

Palavras-chave: Blastocisto. Bovino. Produção *in vitro*. Estresse térmico.

Abstract

To better understand the differences related to HS resistance between *Bos indicus* and *Bos taurus*, we aim to verify if the HS tolerance is due mostly to the genetic contribution from the oocyte, spermatozoa or both. Oocytes from Nelore and crossbred Holstein cows (cHST) were collected, matured and fertilized with semen from Nelore (N), Angus (An), Brahman (Bra) and Gir (Gir) bulls. Nine six hours post insemination (hpi), ≥ 16 cells embryos were separated in two groups: control and HS. In control group, embryos were cultured at 39 °C, whereas in the HS group, embryos were subjected to 41 °C for 12 h, and then returned to 39 °C. There was no effect of HS on blastocyst and hatched blastocyst rates in all breeds analyzed. The percentage of oocytes that cleaved and reached morula stage was significantly lower ($p < 0.05$) in cHST x Gir as compared to the other breeds. Additionally, blastocyst rates was higher in cHST x N than in cHST x An and cHST x Gir ($p < 0.05$). It was concluded that the oocyte is more important than the spermatozoa for the development of thermotolerance, since the breed of the bull did not influence embryo development after HS.

Keywords: Blastocyst. Bovine. *In vitro* production. Heat stress.

Introdução

Acima de 50% do rebanho bovino mundial se encontra nos trópicos e são submetidos a temperaturas mais altas do que animais que habitam climas temperados. No Brasil, dentre as raças de corte, a raça Nelore (*Bos indicus*) é a que possui maior contingente numérico (acima de 150 milhões de cabeças¹), devido

Correspondência para:

Ciro Moraes Barros
Depto de Farmacologia do Instituto de Biociências
UNESP - Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, São Paulo
CEP: 18618-970
Fax: +55 14 38153744
e-mail: cbarros@ibb.unesp.br

Recebido: 10/06/2010

Aprovado: 10/08/2011

a sua maior resistência a altas temperaturas, umidade e parasitas, quando comparada às raças derivadas do gado europeu (*Bos taurus*)^{2,3}.

Nos mamíferos, os processos reprodutivos são sensíveis às alterações por hipertermia, resultando em redução da qualidade e quantidade de espermatozoide nos machos e queda da fertilidade nas fêmeas⁴.

A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do genoma embrionário é ainda inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é um aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre⁵. Utilizando sistema de cultivo *in vitro*, Rocha et al.⁶ e Al-Katanani e Hansen⁷, mostraram que a temperatura elevada reduziu a sobrevivência dos embriões em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário.

Existem diferenças genéticas na resistência ao estresse térmico calórico (ETC), com as raças adaptadas apresentando menor temperatura corporal durante o ETC quando comparada as raças não adaptadas^{8,9,10}. Devido sua maior termotolerância, as consequências da exposição ao ETC, tanto na produção de leite quanto de carne, são menores para o gado *Bos indicus* do que para o gado *Bos taurus*³. Assim, em resposta ao ETC, o gado zebuino sofre redução menos severa na ingestão alimentar^{11,12}, taxa de crescimento¹³, produção de leite e carne¹⁴ e funções reprodutivas^{8,15}, comparado com o gado europeu.

A exposição de fêmeas de mamíferos ao ETC aumenta a mortalidade embrionária¹⁶. A maior causa da redução na sobrevivência embrionária induzida pelo ETC pode ser decorrente dos efeitos adversos das temperaturas elevadas no desenvolvimento dos zigotos e dos embriões¹⁷.

Paula Lopes et al.¹⁸ observaram que embriões (≥ 9 células) de raça resistente ao calor (Brahman) se desenvolveram melhor até o estágio de blastocisto após ETC (41 °C por seis horas) do que embriões de raças sensíveis ao calor (HPB e Angus). De forma similar, embriões da raça Nelore são mais resistentes ao ETC do que embriões mestiços (oócito taurino x sêmen zebuino)¹⁹ e taurinos (HPB)² desenvolvidos *in vitro*. Além disso, embriões Brahman e Romosinuano (*Bos indicus*) são mais resistentes ao ETC do que embriões da raça Angus (*Bos taurus*)²⁰.

Embriões produzidos através da fertilização de oócitos provenientes de vacas da raça Brahman com sêmen de touro da raça Angus são mais resistentes ao ETC que embriões produzidos pela fertilização de oócitos provenientes de vacas da raça Holandesa com sêmen de touros Angus²¹. Entretanto, não houve diferença com relação à resistência ao ETC para embriões Holandês x Brahman e Holandês x Angus²¹. Estes resultados indicam que a contribuição do oócito é mais importante do que a do espermatozoide na capacidade dos embriões Brahman resistirem aos efeitos do estresse calórico.

De forma similar, Saito et al.²² verificaram que o ETC (41 °C por 12h, 96 horas após a inseminação - hpi) diminuiu significativamente as taxas de blastocisto e de blastocisto eclodido, tanto para oócitos HPB fertilizados com sêmen Gir quanto sêmen HPB. Por outro lado, Eberhardt et al.²³ além de observarem que embriões Nelore são mais resistentes ao ETC do que embriões da raça HPB ou mestiços durante a fase inicial de desenvolvimento *in vitro*, constataram que a resistência ao ETC resulta da contribuição genética do oócito e do espermatozoide, uma vez que oócitos de vacas HPB fertilizados com sêmen Nelore foram significativamente mais resistentes ao estresse calórico (12 h, 96 hpi) do que aqueles fertilizados com sêmen Angus. Esta possibilidade é reforçada pelos dados obtidos por Pegorer et al.²⁴, os quais verificaram que o uso de touros Gir aumentou a taxa de prenhez

de vacas lactantes HPB durante os meses de verão, quando comparados a touros HPB.

Considerando-se a predominância do gado Nelore no Brasil devido, entre outros fatores, a elevada resistência ao estresse calórico, objetivou-se com o presente trabalho testar as seguintes hipóteses: a) embriões de raças zebuínas e zebuínas mestiças são mais resistentes ao ETC do que embriões de raças taurinas mestiças; b) a resistência ao ETC é resultado da contribuição genética do oócito e do espermatozoide.

Material e Método

Todos os reagentes e meios foram adquiridos dos Laboratórios Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Gibco (Langley, OK, USA; soro fetal bovino), Vivimed (Ribeirão Preto, SP, Brasil; Choriomon[®]) e Hertape Calier (Juatuba, MG, Brasil; Pluset[®]).

Influência do espermatozoide e do oócito na produção in vitro (PIV) de embriões submetidos ao ETC

Foram utilizados ovários de vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) com fenótipo predominante HPB (mHPB) coletados no frigorífico “Vale do Prata”, na cidade de São João da Boa Vista (SP), localizado a 300 km do laboratório. Já os ovários de vacas Nelore utilizados neste experimento foram coletados no frigorífico “Frigol”, na cidade de Lençóis Paulista (SP), localizado a 47 km do laboratório. As aspirações foliculares bem como a maturação dos oócitos obtidos foram realizadas de forma simultânea entre as raças mHPB e Nelore.

Os oócitos foram divididos em dois grupos experimentais. No grupo controle (grupo 1) a maturação, fertilização e cultivo foram realizadas em temperatura constante de 39 °C. No grupo ETC (grupo 2), 96 horas após a inseminação (hpi), os embriões foram submetidos ao estresse térmico calórico de 41 °C, durante 12 horas consecutivas e, em seguida, retornaram à temperatura de 39 °C. Os oócitos das vacas mestiças com fenótipo predominante HPB (mHPB), dos

grupos 1 e 2, foram distribuídos ao acaso em quatro sub-grupos de acordo com a raça do sêmen utilizado para a fertilização: Angus (An), Nelore (N), Gir (Gir) e Brahman (Bra). Já os oócitos das vacas Nelore, dos grupos 1 e 2, foram apenas fertilizados com sêmen de touro Nelore.

Foram utilizados seis touros diferentes para cada uma das quatro raças, a fim de minimizar o efeito do touro. Para cada ensaio foram utilizadas duas palhetas de sêmen para cada raça de touro, totalizando três ensaios. Foram determinadas as taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido, 48, 96, 168 e 240 horas pós-inseminação (hpi), respectivamente.

Produção in vitro de embriões

Recuperação, classificação dos oócitos e maturação in vitro

Os ovários coletados nos frigoríficos foram transportados em recipientes térmicos contendo solução salina (NaCl 0,9%) mantida em uma temperatura entre 30 e 37 °C. Os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) imaturos foram aspirados de folículos (3-8 mm) com agulha 19G. Após a sedimentação, os oócitos foram classificados em quatro categorias de acordo com as suas características celulares (Khurana e Niemann²⁵).

Os COCs classificados como categoria I, II e III foram lavados três vezes em meio TCM 199 com HEPES contendo 10% de soro fetal bovino, 2 µg/mL de piruvato e 75 µg/mL de amicacina (meio LAV). Posteriormente, os oócitos (n = 25 por gota) foram transferidos para gotas de 90 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral. O meio de maturação utilizado foi o TCM 199 com bicarbonato contendo 10% de soro fetal bovino, 2 µg/mL de piruvato, 75 µg/mL de amicacina, 20 µg/mL de FSH (Pluset[®]) e 10 UI/mL de LH (Choriomon[®]). A maturação do COCs foi realizada em incubadora a 39 °C (5 % de CO₂ em ar), durante 22 - 24 horas.

Preparo do sêmen e fertilização *in vitro*

O sêmen foi depositado sobre a superfície do gradiente de Percoll com densidade descontínua (2 mL a 45% sobre 2 mL a 90%) em tubo cônico de 15 mL e centrifugado a 900 X g por 30 minutos. Posteriormente, foi feita diluição do sêmen em meio de fertilização (TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL BSA livre de ácidos graxos, 2 µL/mL de piruvato, 75 µg/mL de amicacina, 11µg/mL de heparina e 44 µL/mL de solução de Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina) para obter a concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Os oócitos já maturados foram lavados três vezes no meio LAV e uma vez no meio de fertilização, antes de serem transferidos para gotas do meio de fertilização cobertas com óleo mineral. Os CCOs maturados foram incubados com os espermatozoides por 10-12 horas.

Desnudamento e cultivo dos embriões

Após a fertilização, os prováveis zigotos foram submetidos à agitação no vórtex (Phoenix[®], AP-56) a 3000 rpm durante três a cinco minutos para remover as células do *cumulus* circundante e também os espermatozoides associados e posteriormente transferidos para gotas de cultivo de 90 µL (20 a 25 prováveis zigotos por gota), cobertas com óleo mineral. Utilizou-se o meio de cultivo SOFaaci (“synthetic oviduct fluid”) acrescido de soro fetal bovino (25%), BSA (5%) e piruvato de sódio (0,2%).

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

As trocas parciais do meio de cultivo foram realizadas 48, 96, 144 e 192 horas após a fertilização. Nestas trocas parciais, foram retirados de cada gota 50 µL de meio já presente juntamente com estruturas degeneradas e acrescentados 50 µL de meio de cultivo fresco (“feeding”). Antes de cada “feeding” foram avaliadas as taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido.

Análise estatística

As taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA), utilizando o Proc MIXED de SAS²⁶. Os dados de proporção foram transformados em arco-seno (\sqrt{P}) para o estudo dos efeitos das raças, tratamentos e interações, considerando efeito de rodada como aleatório.

Resultados

O ETC não alterou significativamente ($p > 0,05$) as taxas de blastocisto e blastocisto eclodido dos respectivos cruzamentos quando comparados ao grupo controle (39 °C; Tabela 1).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$; Tabela 1) quando comparadas as taxas de clivagem dos embriões N x N vs mHPB x N ou quando comparadas as taxas de clivagem dos embriões mHPB x N vs mHPB x An vs mHPB x Bra. Entretanto, as taxas de clivagem dos embriões N x N foram superiores ($p < 0,05$, Tabela 1) às dos mHPB x An, mHPB x Bra e mHPB x Gir. Além disso, as taxas de clivagem dos embriões mHPB x Gir foram inferiores, quando comparadas às taxas das demais raças ($p < 0,05$; Tabela 1). As taxas de mórula não diferiram ($p > 0,05$) entre os embriões N X N, mHPB x N, mHPB x An e mHPB x Bra. Porém, estas taxas foram superiores as dos embriões mHPB x Gir ($p < 0,05$; Tabela 1). Não houve diferenças significativas entre as taxas de blastocisto de embriões N x N vs mHPB x N e mHPB x N vs mHPB x Bra, tanto para o grupo controle quanto para o grupo ETC ($p > 0,05$; Tabela 1). As taxas de blastocisto dos embriões mHPB x N foram superiores as dos embriões mHPB x An e mHPB x Gir (Tabela 1). Além disso, não houve diferenças entre as taxas de blastocisto dos embriões mHPB x Bra vs mHPB x An vs mHPB x Gir em ambos os grupos ($p > 0,05$; Tabela 1). Os embriões N x N (grupo controle e ETC) apresentaram taxa de blastocisto eclodido

superior a dos demais cruzamentos ($p < 0,05$), não havendo diferença significativa entre as taxas dos embriões cruzados ($p > 0,05$; Tabela 1).

Discussão

Os resultados obtidos neste experimento indicaram que não houve influência do ETC no desenvolvimento embrionário dentre todos os cruzamentos testados. Além disso, a influência da raça do touro na resistência embrionária ao ETC não foi evidenciada.

Estes dados diferem daqueles encontrados na literatura sobre os efeitos deletérios do ETC em raças zebuínas, taurinas e mestiças. Paula Lopes et al.²⁷ comparando a resistência ao ETC (41 °C, 6 h, 96 hpi) entre *Bos indicus* (Brahman) e *Bos taurus* (HPB e Angus) observaram que a porcentagem de blastocisto de embriões Brahman submetidos ao ETC foi significativamente maior do que embriões HPB e Angus. De forma similar, Barros, et al.² e Eberhardt et al.²³ demonstraram que embriões *Bos taurus* (HPB x An) e mestiços (HPB x N) apresentaram maior sensibilidade ao ETC (41 °C, 12 h, 96 hpi) quando comparados aos embriões *Bos indicus*

(N x N) e mestiços (N x An), resultando na redução das taxas de blastocisto após o ETC. Além disso, Sartorelli et al.²⁸ verificaram que a taxa de prenhez em receptoras inovuladas com embriões da raça Nelore submetidos ao ETC (41 °C, 12 h, 96 hpi) foi maior do que em receptoras inovuladas com embriões da raça Angus submetidos ao ETC. Estes resultados indicam que embriões da raça Nelore (*Bos indicus*) tem maior capacidade de sobreviver ao ETC nos estágios iniciais de desenvolvimento e estabelecerem prenhez do que embriões da raça Angus (*Bos taurus*).

Uma das explicações para os resultados conflitantes é o fato dos oócitos terem sido obtidos de vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) com fenótipo predominante HPB. Nas raças taurinas, a maior sensibilidade ao ETC está relacionada à menor adaptação destas raças as condições climáticas onde a temperatura é mais elevada³. Prayaga et al.²⁹ demonstraram que o cruzamento entre raças zebuínas e taurinas apresenta melhor adaptabilidade às condições ambientais do que o cruzamento entre raças taurinas apenas. Além disso, animais cruza-

Tabela 1 - Taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido (Média ± EPM) de oócitos de vacas Nelore (N) e mestiças com fenótipo predominante de HPB (mHPB), fertilizados com sêmen de Nelore (N), Angus (An), Brahman (Bra) e Gir (Gir) e mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse térmico calórico (ETC) de 41°C por 12h, 96 hpi - Botucatu - São Paulo, Brasil - 2009

	Temperatura (°C)									
	39	41 +	39	41 +	39	41 +	39	41+	39	41+
Raça do touro	N	N	N	N	Na	An	Bra	Bra	Gir	Gir
Raça da vaca	N	N	mHPB	mHPB	mHPB	mHPB	mHPB	mHPB	mHPB	mHPB
Oócito (n)	191	186	140	157	152	144	155	151	166	167
Clivagem (%)	79,0 ± 2,9 ^b	82,8 ± 2,6 ^y	74,3±4,6 ^{ab}	72,0±3,9 ^{xy}	71,7 ± 5,5 ^a	71,5 ± 5,4 ^x	74,8 ± 3,4 ^a	68,9 ± 2,9 ^x	57,8 ± 6,4 ^e	54,5±5,7 ^w
Mórula (%) (≥ 16 Células)	66,0 ± 4,0 ^a	67,2 ± 4,3 ^x	57,1 ± 3,4 ^a	54,8 ± 4,9 ^x	54,6 ± 6,6 ^a	59,7 ± 5,9 ^x	60,6 ± 6,3 ^a	55,6 ± 2,1 ^x	39,1 ± 7,5 ^b	40,1±7,1 ^y
BL (%)	35,6 ± 1,8 ^b	34,4 ± 3,1 ^y	25,0±4,2 ^{bc}	23,6±4,3 ^{yw}	15,8 ± 2,0 ^a	17,4 ± 3,5 ^x	22,6±3,1 ^{ac}	15,9±2,5 ^{xw}	9,6 ± 2,3 ^a	12,0±3,7 ^x
BE (%)	27,2 ± 4,0 ^b	19,3 ± 3,3 ^y	9,3 ± 3,6 ^a	7,6 ± 3,4 ^x	7,9 ± 3,1 ^a	8,3 ± 3,2 ^x	9,7 ± 3,1 ^a	7,9 ± 2,2 ^x	2,41 ± 1,5 ^a	6,0 ± 3,3 ^x

+ O ETC (41 °C vs 39 °C) não alterou significativamente ($p > 0,05$) as taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido.

^{a,b,c} Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre raças (39 °C)

^{x,y,w} Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre raças (41 °C)

dos que possuam pelo menos 25% de genótipo zebu apresentam menor temperatura retal. Desta forma, é provável que animais cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*) apresentem melhor capacidade de termorregulação do que animais *Bos taurus*, resultando em uma menor influência do ETC no desenvolvimento embrionário.

Em muitos mamíferos, os efeitos do ETC são mais pronunciados na fase de estro até a inseminação^{7,30}, e durante os primeiros estágios de clivagem do desenvolvimento embrionário¹⁷. Os efeitos do ETC na mortalidade embrionária diminuem com o avanço da prenhez, se tornando mínimos a partir do terceiro dia do estro em vacas¹⁷. Vários estudos *in vitro* demonstram que embriões bovinos tornam-se mais resistentes ao ETC com o avanço no seu desenvolvimento^{17,19,23,31}. Embriões bovinos, nos primeiros estágios de desenvolvimento (duas a quatro células) são mais sensíveis ao ETC quando comparados a embriões em fases avançadas de desenvolvimento (> 16 células)^{17,19}. De acordo com Edwards e Hansen³¹, existem pelo menos duas possibilidades para explicar o porquê dos embriões se tornam mais termotolerantes à medida que se desenvolvem. A primeira é que embriões mais desenvolvidos (com maior número de células) possuem maior capacidade de sobreviver à perda de uma fração de suas células. Se assumirmos hipoteticamente que o efeito do ETC altera a função de 50% dos blastômeros, um embrião no estágio de duas células ficaria apenas com um blastômero para formar um embrião viável, enquanto no estágio de mórula ou blastocisto restariam 30-50 blastômeros para continuar o seu desenvolvimento. A segunda possibilidade é que o embrião adquire mecanismos de termoproteção durante seu desenvolvimento, como por exemplo, as HSPs e Glutathiona.

Além disso, como já foi dito anteriormente a capacidade de termotolerância é uma característi-

ca influenciada pela raça do animal, sendo que a aquisição de termotolerância embrionária pode ser conferida pelo oócito, pelo espermatozoide ou por ambos como demonstram alguns estudos^{2,21-24,27}.

No presente experimento foram utilizados seis touros diferentes para cada raça com o objetivo de minimizar o efeito touro e caracterizar a influência da raça no desenvolvimento de termotolerância ao ETC. O efeito da raça do touro não foi evidenciado, pois as taxas de blastocisto e blastocisto eclodido não diferiram entre os grupos controle (39 °C) e ETC (41 °C, 96 hpi, 12 h); além disso, os oócitos utilizados eram de vacas mestiças com fenótipo predominante HPB, o que prejudicou a determinação do efeito da raça do touro na sensibilidade embrionária ao ETC. O efeito da raça do touro na sensibilidade embrionária ao ETC também não foi evidenciado por Block et al.²¹ que utilizaram sete touros das raças Angus e Brahman na fertilização de oócito HPB submetendo-os ao ETC (96 hpi, 41 °C, seis horas).

Por outro lado, Eberhardt et al.²³ observaram maior resistência ao ETC em oócitos de vacas HPB fertilizados com sêmen de touro Nelore quando comparados com sêmen de touro Angus. O fato de Eberhardt et al.²³ ter utilizado apenas dois touros para cada raça, pode ter influenciado os resultados, ou seja, o efeito do touro em si pode ter sido preponderante em relação a influência da raça (*indicus* vs *taurus*) na resistência ao ETC. De fato, vários estudos mostram que a produção *in vitro* de embriões pode variar de 0 a 36% de acordo com o touro utilizado^{32,33}. Palma e Sinowitz³⁴ testaram 63 touros na produção de embriões *in vitro* e observaram que houve variações de touro para touro nas taxas de clivagem (36,3 a 93,4%) e de blastocisto (6,9 a 51,2%). Estes dados são indicativos de que há diferenças entre touros quanto a sua capacidade de fertilização^{35,36}.

Conclusão

Conclui-se que o ETC (41 °C, 12 h, 96 hpi) não influenciou o desenvolvimento de embriões provenientes de oócitos de vacas HPB mestiças. A resistência ao ETC dos embriões produzidos *in vitro*, não foi influenciada pela raça do touro (Nel, Ang, Gir ou Bra), indicando que o oócito tem maior importância na termotolerância embrionária do que o espermatozoide.

Referências

1. FAO. Food and Agriculture Organization of united Nation. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 12 out. 2009.
2. BARROS, C. M.; PEGORER, M. F.; VASCONCELOS, J. L.; EBERHARDT, B. G.; MONTEIRO, F. M. Importance of sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 210-218, 2006.
3. HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 349-360, 2004.
4. HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M.; PAULA LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; CHASE JR., C. C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 91-103, 2001.
5. PAULA LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1169-1177, 2002.
6. ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEL, J. D.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 657-665, 1998.
7. AL-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 Development**, v. 62, n. 2, p. 174-180, 2002.
8. CARTWRIGHT, T. C. Responses of beef cattle to high ambient temperatures. **Journal Animal Science**, v. 14, p. 350-362, 1955.
9. GAUGHAN, J. B.; MADER, T. L.; HOLT, S. M.; JOSEY, M. J.; ROWAN, K. J. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **Journal Animal Science**, v. 77, p. 2398-2405, 1999.
10. HAMMOND, A. C.; CHASE JR., C. C.; BOWERS, E. J.; OLSON, T. A.; RANDEL, R. D. Heat tolerance in Tuli-, Senepol-, and Brahman-sired F1 Angus heifers in Florida. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 1568-1577, 1998.
11. JOHNSTON, J. E.; HAMBLIN, F. B.; SCHRADER, G. T. Factors concerned in the comparative heat tolerance of Jersey, Holstein, and Red Sindhi-Holstein (F1) cattle. **Journal Animal Science**, v. 17, p. 473-479 1958.
12. SEIF, S. M.; JOHNSON, H. D.; LIPPINCOTT, A. C. The effects of heat exposure (31 °C) on Zebu and Scottish Highland cattle. **International Journal Biometeorology**, v. 23, n. 1, p. 9-14, 1979.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP (São Paulo, Brasil) pelo auxílio financeiro e pelas bolsas concedidas a Rafael A. Satrapa, Renato A. L. Simões, Cíntia F. da Silva e Eduardo M. Razza. Agradecemos também a CAPES (Brasília, Brasil) pela bolsa concedida a Thaís Nabhan.

13. O'BANNON, E. B.; CORNELISON, P. R.; RAGSDALE, A. C.; BRODY, S. Relative growth rates at 80 and 50 ° F of Santa Gertrudis, Brahman and Shorthorn heifers. **Journal Animal Science**, v. 14, p. 1187, 1955. (Abstract).
14. JOHNSON, H. D. J. Environmental temperature and lactation (with special reference to cattle). **International Journal Biometeorology**, v. 9, n. 2, p. 103-116, 1965.
15. SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal Applied Physiology**, v. 21, n. 6, p. 1784-1790, 1966.
16. THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J. Environment and reproduction. **Reproduction Domesticated Animals**, v. 6, p. 433-457, 1993.
17. EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal Dairy Science**, v. 76, p. 2899-2905, 1993.
18. PAULA LOPES, F. F.; CHASE JR., C. C.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSON, T. A.; HANSEN, P. J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 125, n. 2, p. 285-294, 2003.
19. BARROS, C. M.; MONTEIRO, F. M.; MELLO, D. S.; CARVALHO, L. M.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A.; FREITAS, E. C. Resistance of *Bos indicus* to heat shock, compared to crossbred or *Bos Taurus*, at early stages of in vitro embryo development. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTION IN DOMESTIC RUMINANTS, 6th., 2002, Scotland. 2002. p. A4.
20. HERNÁNDEZ CERÓN, J.; CHASE JR., C. C.; HANSEN, P. J. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 53-58, 2004.
21. BLOCK, J.; CHASE JR., C. C.; HANSEN, P. J. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal versus paternal contribution. **Molecular Reproduction Development**, v. 63, n. 1, p. 32-37, 2002.
22. SAITO, D. Y. Estudo da influência da raça do touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*) na resistência de embriões bovinos ao estresse térmico calórico *in vitro*, no estágio inicial de desenvolvimento, Instituto de Biociências. Botucatu: UNESP, 2006. p. 42.
23. EBERHARDT, B. G.; SATRAPA, R. A.; CAPINZAIKI, C. R.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Influence of the breed of bull

- (*Bos taurus indicus* vs *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Animal Reproduction Science**, v. 114, n. 1/3, p. 54-61, 2009.
24. PEGORER, M. F.; VASCONCELOS, J. L.; TRINCA, L. A.; HANSEN, P. J.; BARROS, C. M. Influence of sire and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactating Holstein cows during summer heat stress. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 692-697, 2007.
25. KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine derived in vitro or in vivo. **Biology Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 847-856, 2000.
26. SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **A user's guide**. Version 9.1.3. Cary: SAS Institute C, 2002/2003.
27. PAULA LOPES, F. F.; CHASE JR., C. C.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSON, T. A.; HANSEN, P. J. Breed differences in resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 436, 2001. (Abstract) .
28. SARTORELLI, E. S. **Influência do estresse térmico calórico na taxa de apoptose de embriões bovinos (zebúinos vs taurinos) produzidos in vitro e na capacidade dos mesmos originarem gestações**. 2007. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, 2007.
29. PRAYAGA, K. C. Evaluation of beef cattle genotypes and estimation of direct and maternal genetic effects in a tropical environment. 2. Adaptive and temperament traits. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 54, p. 1027-1038, 2003.
30. 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, n. 4, p. 765-78, 1989.
31. EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction Development**, v. 46, n. 2, p. 138-145, 1997.
32. LACANDRA, G. M.; DELLAGUILA, M. E.; FUSCO, S.; SCIORCI, R. L.; PERRONE, P.; MINOIA, P. *In vitro* fertility test of bull semen. In: The INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 13, 1993, Sydney. 1993. p. 656-658.
33. PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 591-600, 1986.
34. PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. **Anat Histol Embryol**, v. 33, p. 257-262, 2004.
35. HILLERY, F. L.; FIRST, N. L. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 249, 1990. (Abstract).
36. SHI, D. S.; GORDON, I. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 324, 1990. (Abstract).