

Thaís Nabhan

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

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação do Instituto de Biociências de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista –
UNESP, para obtenção do título de mestre em
Ciências Biológicas, Área de Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

**Botucatu- SP
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Nabhan, Thaís.

Influência da raça do touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*) na tolerância ao estresse térmico calórico de embriões bovinos produzidos *in vitro* / Thaís Nabhan. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Ciro Moraes Barros

Assunto CAPES: 20400000

1. Bovino – Reprodução – Aspectos genéticos 2. Inseminação artificial - Estudos experimentais

CDD 636.20824

Palavras-chave: Blastocisto; Bovino; Embrião; Estresse térmico; Fertilização *in vitro*

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	iv
Lista de Abreviaturas	v
Lista de Tabela	vi
Lista de Figuras	vii
CAPÍTULO 1	
Resumo	1
Abstract	3
Introdução e Objetivo	5
Revisão de Literatura	8
Referencias Bibliográficas	16
CAPÍTULO 2	
Resumo	27
1. Introdução	28
2. Material e Métodos	31
2.1. Testes preliminares – Seleção de touros	32
2.2. Experimentos 1 e 2	32
2.2.1. Experimento 1	33
2.2.2. Experimento 2	34
2.3. Produção in vitro de embriões	34
2.3.1. Recuperação e classificação dos oócitos	35
2.3.2. Maturação in vitro	36
2.3.3. Preparo do sêmen e Fertilização in vitro	36
2.3.4. Desnudamento e Cultivo dos embriões	37
2.4. Análise estatística	38
3. Resultados	39
3.1. Teste Preliminar	39
3.2. Experimento 1	40
3.3. Experimento 2	43
4. Discussão	50
5. Referências	55
Anexo 1	63

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente ao meu pai, **José Jahjah Nabhan** que nunca mediu esforços para fazer dos meus sonhos os seus sonhos e a minha realidade. Pai, muito obrigada por me apoiar, tranquilizar meu espírito nos momentos difíceis e me inspirar através de ti à garra e determinação.

Dedico também ao meu anjo de guarda “**Tata**” que sempre iluminou o meu caminho, contribuindo para todas as minhas conquistas. A minha irmã **Cynthia** pelo apoio. Ao meu namorado **Renato** por me compreender, estar comigo em todos os momentos desta jornada, enriquecendo meus dias com seus conselhos e fazendo minha vida mais feliz.

Em especial, dedico a minha mãe **Diva Nabhan** (*in memoriam*), que permanece presente no meu coração, não me deixando esquecer o quão importante é seguirmos os nossos sonhos, pois é nele que encontramos a verdadeira felicidade de viver.

Amo Muito vocês!

Agradecimientos

Agradeço à **Deus** por permitir minha evolução e fazer pulsar em meu coração a felicidade e fé nas minhas conquistas;

À minha família, **Jahjah, Cynthia, Tata, Nancy e Mário Sergio** por nutrir meus sonhos, me inspirar nesta conquista e me incluir em suas orações. Sem vocês seria impossível concluir esta etapa;

Ao meu namorado **Renato A. L. Simões** por reabastecer meu coração de esperanças e felicidade a cada dia. Amo muito você;

Ao **Prof. Dr. Ciro Moraes Barros** pela oportunidade de aprender através do seu conhecimento, contribuindo para o meu amadurecimento pessoal e profissional;

À **Profa. Dra. Fabíola F. F. Paula Lopes e Profa Dra. Gisele Zoccal Mingoti** por fazerem parte da banca examinadora, contribuindo com suas experiências no aperfeiçoamento deste trabalho;

Aos suplentes **Prof. Dr. Guilherme P. Nogueira e Prof. Dr. Marcelo F. G. Nogueira**, pela disponibilidade e análise deste trabalho;

Aos meus **colegas de Pós-graduação** por contribuírem para a realização deste trabalho e proporcionarem momentos inesquecíveis na minha vida: Renato A. L. Simões, Raquel Puelquer, Rafael A. Satrapa, Debora Penatti, Eduardo M. Razza, Cíntia S. Fernandes, Fernanda Rosa, Juliano, Ana Carolina Oliveira, Débora Saito, Bruno G. Eberhardt, Evandro Sartorelli, Ronaldo Ereno, Marcelo Pergorer, Vinícius Pinheiro, Paulo Fernandes, Ana Claudia Z. Barcellos, Mariana Machado, Anthony Castilho, Diego Guerra, Rúbia Bueno, Paula Ripamonte, Ester S. Caixeta, Andrey Teixeira, Walter Cavalcante, Celso Costa, Fernanda Nojimoto, Juliana Akinaga, Felipe G. Ferreira, e aos demais pós-graduandos não citados aqui, mas que estiveram por algum momento presentes em minha vida. Obrigada!;

Agradeço também aos amigos: **Ana Claudia S. Dell’Aqua, Luciara, Maria Rosa e Maria Inês** pelo papel relevante que tiveram neste período da minha vida;

Ao **Dr. Simões, Dra. Margaret e Marcelo Simões**, pelo apoio e carinho.
Muito obrigada;

Aos Professores do Departamento de Farmacologia, por terem me acolhido com muito carinho;

À **Profa. Dra. Luzia A. Trinca** pelo auxílio nas análises estatísticas e pela enorme simpatia com que sempre me atendeu;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia **Cris, Janete, Luís e Paulão** pela contribuição e agradável convivência;

Aos funcionários da Pós-graduação **Luciene Tobias, Erivaldo Santos, Sérgio Primo Vicentini e Maria Helena Godói**, pela atenção e dedicação durante a realização deste trabalho;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro;

Aos **frigoríficos** “Frigol”, “Mondelli” e “Vale do Prata” por concederem a coleta de material para que este trabalho pudesse ser realizado.

Muito Obrigada!

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um não. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.”

Augusto Cury

Lista de abreviaturas

Mg - micro grama;

μL - micro litro;

BSA - albumina sérica bovina;

COCs - (*cumulus oocytes complexes*): complexo cúmulos – oócito;

CO₂ - gás carbônico;

E₂ - Estradiol;

ETC - estresse térmico calórico;

FSH - hormônio folículo estimulante;

G - Gauge (unidade de medida de calibre);

HPB - Holandês (a) Preto e Branco;

Hpi - horas pós-inseminação;

LH - hormônio luteinizante;

Mm - milímetros;

mL - mililitro;

mM - milimolar;

NaCl - cloreto de sódio;

N₂ - nitrogênio;

O₂ - oxigênio;

P₄ - progesterona;

PHE - Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina;

PIV - produção de embriões *in vitro*;

rpm - rotações por minuto;

SOF - (synthetic oviduct fluid): fluído sintético de oviduto;

TCM - (tissue culture médium): meio para cultivo tecidual;

UI - unidades internacionais.

Lista de Tabelas

1. **Tabela 1:** Taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido (Média \pm 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, 96hpi.....42
2. **Tabela 2:** Taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido (Média \pm EPM) de oócitos de vacas das raças Nelore (N) ou Holandesa Preto e Branco (HPB) aspirados 4 e 6:30 horas após o abate, fertilizados com sêmen de touro N, HPB e Gir (Gir), mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse térmico calórico (ETC) de 41 °C por 12h, 96 horas após a inseminação..... 45
3. **Tabela 3:** Taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido (Média \pm EPM) de oócitos de vacas das raças Nelore (N) ou Holandesa Preto e Branco (HPB) aspirados 4 horas após o abate, fertilizados com sêmen de touro N, HPB e Gir (Gir), mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse térmico calórico (ETC) de 41 °C por 12h, 96 horas após a inseminação.....46
4. **Tabela 4:** Taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido (Média \pm EPM) de oócitos de vacas das raças Nelore (N) ou Holandesa Preto e Branco (HPB) aspirados 6:30 horas após o abate, fertilizados com sêmen de touro N, HPB e Gir (Gir), mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse térmico calórico (ETC) de 41 °C por 12h, 96 horas após a inseminação.....47

Listas de Figuras

1. **Figura 1.** Média (\pm EPM) das taxas de clivagem (Cl), mórula (Mo), blastocisto (Bl) e blastocisto eclodido (Be) de oócitos de vacas Nelore (N) fertilizados com sêmen de 6 touros selecionados para cada uma das seguintes raças: Nelore, Angus, Brahman, Holandês Preto e Branco (HPB) e Gir. Foi utilizado um mínimo de 292 oócitos por raça de touro. Letras diferentes (^{ab}) representam diferenças significativas ($p < 0,05$).....40

2. **Figura 2.** Média (\pm EPM) das taxas de blastocisto dos oócitos de vacas das raças Nelore (N) e Holandesa Preto e Branco (HPB) obtidos 4 horas (A) e 6:30 horas (B) após a coleta dos ovários em abatedouro e fertilizados com sêmen de touros N, Gir (Gir) e HPB, mantidos à 39 °C (em branco) ou submetidos ao ETC (12h, 96hpi, 41 °C) (em preto).....48

3. **Figura 3.** Média (\pm EPM) das taxas de blastocisto dos oócitos de vacas das raças Nelore (N) e Holandesa Preto e Branco (HPB) obtidos 4 (em branco) e 6:30 (em preto) horas após a coleta dos ovários em abatedouro e fertilizados com sêmen de touros N, Gir (Gir) e HPB, mantidos à 39 °C (A) ou submetidos ao ETC (B; 12h, 96hpi, 41 °C).....49

Capítulo 1

Resumo

Abstract

Introdução e objetivos

Revisão de Literatura

Referencias Bibliográficas

Existem evidências de que os efeitos deletérios do estresse térmico calórico (ETC) sobre a fertilidade são menos pronunciados em raças tolerantes ao calor devido primariamente às diferenças na capacidade de termorregulação. Experimentos *in vitro* têm demonstrado que embriões zebuínos (*Bos indicus*) são mais resistentes ao ETC quando comparados a taurinos (*Bos taurus*). A fim de melhor compreender as diferenças entre zebuínos e taurinos em relação à resistência ao choque térmico, objetivou-se com o presente trabalho verificar se a resistência ao ETC é resultado da contribuição genética do oócito, do espermatozóide ou de ambos e se o intervalo de tempo entre o abate dos animais e a aspiração do oócito influencia o desenvolvimento do embrião. No experimento 1 oócitos de vacas das raças Nelore e mestiças com fenótipo predominante da raça Holandesa preto e branco (mHPB) foram coletados em frigorífico, maturados e fertilizados com espermatozóide de touros das raças Nelore (N), Angus (An), Brahman (Bra) e Gir (Gir). No experimento 2 oócitos de vacas das raças Nelore e HPB puras foram coletados em frigorífico, aspirados 4 e 6:30 horas após o abate dos animais, maturados e fertilizados com espermatozóide de touros das raças N, Gir e HPB. Em ambos os experimentos, noventa e seis horas pós-inseminação (hpi), os embriões com mais de 16 células foram separados ao acaso em dois grupos: controle e ETC. Os 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. No experimento 1 não foi observado efeito do ETC nas várias raças estudadas, não havendo portanto, redução nas taxas de blastocisto e blastocisto eclodido. As taxas de clivagem e mórula dos embriões mHPB x Gir foram inferiores ($p < 0,05$) as das demais raças. As raças mHPB x N apresentaram taxas de blastocisto superiores as raças mHPB x An e mHPB x Gir ($p < 0,05$). No experimento 2 as taxas de clivagem, mórula e blastocisto do grupo 4 horas foram superiores ($p < 0,05$) as do grupo 6:30 horas. O ETC reduziu as taxas de blastocisto em todas as raças (N x N, HPB x HPB e HPB x Gir) e em ambos os intervalos de tempo (4 e 6:30 horas). A raça N x N apresentou taxa de clivagem superior ($p < 0,05$) as raças HPB x HPB e HPB x Gir, em ambos os intervalos de tempo. Além disso, a taxa de blastocisto na raça N x N foi superior ($p < 0,05$) as demais raças, tanto para o grupo controle (39 °C) quanto para o grupo ETC. Concluiu-se que: a) embriões provenientes de oócitos de vacas HPB puras são mais sensíveis ao ETC do que aqueles provenientes de oócitos de vacas HPB

mestiças; b) a contribuição genética do oócito é mais importante do que a do espermatozóide, uma vez que a raça do touro não influenciou a resistência embrionária ao ETC; c) o aumento do intervalo de tempo (de 4 para 6:30 horas) entre o abate e a aspiração dos oócitos influenciou negativamente o desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: blastocisto, bovino, embrião, estresse térmico, fertilização *in vitro*.

There are evidences that deleterious effects of heat stress (HS) on fertility are less pronounced in breeds tolerant to high temperatures, due mainly to differences on their thermoregulatory capacity. In vitro experiments have shown that *Bos indicus* embryos are more resistant to HS when compared to *Bos taurus*. In order to better understand the differences related to heat shock resistance between *Bos indicus* and *Bos taurus*, the main objective of this study was to determine if tolerance to HS is caused by genetic contribution from the oocyte, spermatozoa or both. Additionally, the influence of the time, between collection of ovaries in the abattoir and oocyte aspiration in the laboratory, on early embryo development was ascertained. In experiment 1, oocytes from Nellore and crossbreed Holstein cows (cHST), were collected in a local abattoir, matured and fertilized using semen from Nellore (N), Angus (An), Brahman (Bra) and Gir (Gir) bulls. In experiment 2, oocytes from Nellore and Holstein (HST) cows were collected in an abattoir and the oocytes were aspirated in the laboratory 4 or 6:30 h afterwards, matured and fertilized using semen from N, Gir and HST. In both experiments, 96 h post insemination (hpi), embryos with ≥ 16 cells were separated in two groups: control and HS. In the control group the embryos were cultured at 39 °C, whereas in the HS group the embryos were submitted to 41 °C during for 12 h, and then returned to 39 °C. In experiment 1, there was no effect of HS on blastocyst and hatched blastocyst rates in all breeds studied.. The percentage of oocytes that cleaved and reached the morula stage was significantly lower ($p < 0.05$) in cHST x Gir as compared to the other breeds. Additionally, blastocyst rate was higher in cHST x N than in cHST x An and cHST x Gir ($P < 0.05$). In experiment 2, cleavage, morula and blastocyst rates of Group 4 h were higher ($P < 0.05$) as compared to Group 6:30 h. Heat shock decreased blastocyst rates in all breeds (NxN; HSTxHST; and HSTxGir), and in both time intervals (4 and 6:30 h). The breed N x N had higher cleavage rate ($P < 0.05$) in both time intervals when compared to HST x HST and HST x Gir. In addition, Nellore oocytes fertilized with Nellore semen (NxN) originated higher blastocyst rates ($P < 0.05$), in the control and HS Group, than the other breeds. It is concluded that: a) embryos from Holstein oocytes are more susceptible to HS than embryos from crossbred Holstein oocytes; b) 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; c) in

vitro early embryonic development was impaired by increasing (from 4 to 6:30 h) the time interval between ovaries collection and oocyte aspiration

Keywords: Blastocyst , Bovine, Embryo, Heat Stress, IVF.

Introdução e Objetivo

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. Dentro as raças de corte, a raça Nelore (*Bos indicus*) é a que possui maior contingente numérico (acima de 90 milhões de cabeças; ACNB, 2006) devido a sua maior resistência a altas temperaturas, umidade e parasitas, quando comparada às raças derivadas do gado europeu (*Bos taurus*, Hansen, 2004; Barros et al., 2006).

Nos mamíferos, os processos reprodutivos são sensíveis às alterações por hipertermia, resultando em redução da qualidade e quantidade de espermatozóide nos machos e queda da fertilidade nas fêmeas (Hansen et al., 2001).

Existem diferenças genéticas na resistência ao estresse térmico calórico (ETC), com as raças adaptadas apresentando menores temperaturas durante o ETC do que raças não adaptadas (McDowell et al., 1953; Cartwright, 1955; Allen et al., 1963; Finch, 1986; Carvalho et al., 1995; Hammond et al., 1996; Hammond et al., 1998; Gaughan et al., 1999). 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* (Hansen, 2004). Assim, comparado com o gado europeu, o gado zebuino sofre redução menos severa na ingestão alimentar (Kibler & Brody, 1951; Johnston et al., 1958; Allen et al., 1963; Seif et al., 1979), taxa de crescimento (O'Bannon et al., 1955, Cartwright, 1955), produção de leite e carne (Johnson, 1965) e funções reprodutivas (Skinner & Louw, 1966; Rocha et al., 1998) em resposta ao ETC.

A exposição de fêmeas de mamíferos ao ETC aumenta a mortalidade embrionária (Thatcher & Hansen, 1993). 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 embriões (Ealy et al., 1993).

Paula Lopes et al. (2003) observaram que embriões (≥ 9 células) de raça resistente ao calor (Brahman) se desenvolveram melhor até o estágio de blastocisto após ETC (41 °C por 6 horas) do que embriões de raças sensíveis ao calor (HPB e Angus). De forma similar, embriões da raça Nelore são mais resistentes ao ETC do que embriões mestiços (oócito taurino x sêmen zebuino; Barros et al., 2002) e taurinos (HPB, Barros et al. 2006) desenvolvidos *in vitro*.

Além disso, embriões Brahman e Romosinuano (*Bos indicus*) são mais resistentes ao ETC do que embriões da raça Angus (*Bos taurus*, Hernández Cerón et al., 2004).

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 Angus (Block et al., 2002). Entretanto, não houve diferença com relação à resistência ao ETC para embriões Holandês x Brahman e Holandês x Angus (Block et al., 2002). Estes resultados indicam que a contribuição do oócito é mais importante do que a do espermatozóide na capacidade dos embriões Brahman resistirem aos efeitos do estresse calórico.

De forma similar, Saito et al. (2006) 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. (2009) 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 espermatozóide, 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. (2007), 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.

A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do genoma embrionário é ainda inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é um aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre (Paula Lopes & Hansen, 2002). Utilizando sistema de cultivo *in vitro*, Rocha et al. (1998) e Al-Katanani & Hansen

(2002), mostraram que a temperatura elevada reduziu a sobrevivência dos embriões em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário.

Os efeitos do ETC sobre a viabilidade do embrião diminuem de acordo com o avanço da prenhez (Biggers et al., 1987; Ealy & Hansen, 1994; Edwards & Hansen, 1997; Hansen, 1999; Edwards et al, 2001). Uma possível explicação para esse fenômeno é que os embriões se tornam mais resistentes aos efeitos negativos do ETC à medida que avançam no seu desenvolvimento (Edwards & Hansen, 1997).

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 mestiças são mais resistentes ao ETC do que embriões de raças taurinas; b) a resistência ao ETC é resultado da contribuição genética do oócito e do espermatozóide; c) o intervalo de tempo entre o abate dos animais e a aspiração dos oócitos influencia o desenvolvimento embrionário.

Os bovinos, mamíferos pertencentes à família *Bovidae*, são divididos em dois gêneros: *Bos taurus*, que abrange o gado europeu e *Bos indicus*, gado originalmente encontrado na Índia, Ásia e África, também conhecido como gado zebu ou indiano. Esses gêneros são constituídos por várias raças com características para produção de carne (gado de corte), leite (gado leiteiro) ou para dupla aptidão (Albright & Arave, 1997; Getty, 1986; Santiago, 1985).

Acima de 50% do rebanho bovino mundial se encontra nos trópicos (Wolfenson et al., 2000), onde fatores estressantes como as altas temperaturas e umidades em certos períodos do ano, a sub-alimentação crônica, os riscos de doenças e de parasitas, notavelmente são maiores do que em regiões de clima temperado (Hansen, 2004; Barros et al., 2006). Nestas condições ambientais, às raças zebuínas são as que predominam, devido a sua maior adaptação em relação às raças européias.

Nos mamíferos, os processos reprodutivos são sensíveis às alterações por hipertermia, resultando em redução da qualidade e quantidade de espermatozóide nos machos e queda da fertilidade nas fêmeas (Hansen et al., 2001). A infertilidade dos machos ocasionada pelo ETC pode ser eliminada por meio da inseminação artificial. Nas fêmeas esta situação é mais complicada (Hansen et al., 2001).

Está bem documentado que a exposição de fêmeas de mamíferos ao ETC aumenta a mortalidade embrionária (Thatcher & Hansen, 1993). A maior causa da redução da sobrevivência embrionária induzida pelo ETC pode ser originada pelos efeitos adversos das temperaturas elevadas no desenvolvimento dos zigotos e dos embriões (Ealy et al., 1993). Putney et al. (1989) observaram que a exposição de novilhas HPB ao ETC entre o primeiro estro e a inseminação aumentou a proporção de embriões anormais e com desenvolvimento retardado quando comparados a novilhas mantidas em termo-neutralidade.

Estudos *in vitro* demonstram que a exposição do oócito ou do embrião ao ETC influencia no seu subsequente desenvolvimento. Oócitos de vacas HPB aspirados durante o verão apresentaram menor capacidade de desenvolvimento a blastocisto após a fertilização *in vitro* do que oócitos obtidos durante o inverno (Rocha et al., 1998; Al-Katanani et al., 2002). Além disso, a exposição do complexo *cumulus* – oócito (COCs) de bovinos a elevadas temperaturas nas primeiras 12 horas de maturação *in vitro*, comprometem a arquitetura do

citoesqueleto, reduzem a maturação nuclear do oócito (Roth & Hansen, 2007), alteram a síntese de novas proteínas (Edwards & Hansen, 1996, 1997), promove o aumento de radicais livres (Lawrence et al., 2004) e induzem o oócito a apoptose (Roth & Hansen, 2004). Estes efeitos deletérios diminuem a capacidade do oócito se desenvolver a blastocisto após a fertilização *in vitro* (Edwards et al., 1997).

Edwards & Hansen (1996) observaram que a exposição de oócitos ao ETC de 41 °C por 12 horas reduziu seu desenvolvimento até a fase de blastocisto (30% vs 10% para oócitos cultivados a 39 e 41 °C, respectivamente). Resultados semelhantes foram relatados em outro experimento realizado por Edwards & Hansen (1997, 35% vs 18% para oócitos cultivados a 39 e 41 °C, respectivamente). Além disso, Rivera & Hansen (2001) verificaram que o ETC a 41 °C, aplicado durante a fertilização e nos estágios de uma ou duas células prejudica o desenvolvimento embrionário.

Experimentos realizados *in vitro*, nos quais embriões bovinos foram expostos a um padrão de temperatura ambiente semelhante àquele experimentado por vacas leiteiras em fase de lactação na Flórida, submetidas ao ETC (EUA; temperatura variando de 38,5 a 40,5 °C, durante 8 dias de cultivo *in vitro*; Rivera & Hansen, 2001) ou na região sudeste de Queensland (Austrália, temperatura variando de 39,5 a 41,0 °C, durante as primeiras 48h de cultivo *in vitro*; Sugiyama et al. 2003), mostraram desenvolvimento reduzido até a fase de blastocisto. Desta forma, estes estudos demonstram que as altas temperaturas em determinadas épocas do ano podem influenciar negativamente na produção embrionária.

A fase de pré-implantação embrionária corresponde a um período extremamente dinâmico da embriogênese onde o embrião se desenvolve de uma única célula quiescente sobre o controle genético de transcrição materna, para um grupo de células altamente ativo tanto na função metabólica como na síntese protéica, sobre o seu próprio controle genético. Durante esse período o embrião deve passar por várias divisões celulares, ativar o genoma embrionário, sofrer compactação celular, formar um epitélio de transporte, diferenciar-se em dois tipos celulares e desenvolver a cavidade chamada de blastocelo. Essas funções requerem a regulação precisa de várias funções celulares como a homeostasia, o metabolismo e a expressão gênica (Lane, 2001).

Na fase de pré-implantação a interrupção do desenvolvimento embrionário pelo ETC se torna muito suscetível. (Putney et al., 1989; Badinga et al., 1993; Edwards & Hansen, 1997; Rocha et al., 1998; Riviera et al., 2000; Paula Lopes et al., 2001; Zeron et al., 2001). Em rebanhos criados nos Estados Unidos da América, o aumento na temperatura de 29,7 °C durante abril para 33,9 °C em julho foi associado com um declínio nas taxas de concepção no primeiro serviço de 25% para 7% (Cavestany et al., 1985).

Durante os períodos sazonais de ETC, a fertilidade declina resultando em menores taxas de concepção (Thatcher & Collier, 1996; Her et al., 1988; Wilson et al., 1998a). Na Flórida, as taxas de concepção de vacas em lactação caem de 48% em março para 18% em julho e não se recuperam até novembro (Badinga et al., 1985). Ingraham et al. (1976) observaram que as taxas de concepção de vacas leiteiras estão inversamente relacionadas à temperatura ambiente durante a fase folicular. Durante o outono, as taxas de concepção de vacas leiteiras em regiões subtropicais e países de clima quente são menores que no inverno, embora a temperatura ambiente tenha diminuído e as vacas não estejam mais expostas ao ETC de verão, indicando a existência de um efeito retardado do ETC na fertilidade (Roth et al., 1999, Roth et al., 2001). Além disso, a redução nas taxas de prenhez durante o verão pode atingir valores de 20 a 30% quando comparado ao inverno (Cavestany et al., 1985; Badinga et al., 1985; De Rensis et al., 2002).

A falha de vacas, sob ETC, em estabelecer prenhez pode ser decorrente de alterações nos processos fisiológicos em vários níveis. As funções dos oócitos (Lenz et al., 1983) e embrião inicial (Ealy et al., 1993, 1995) são alteradas por temperaturas elevadas. Para Zeron et al., (2001) uma possível explicação para os efeitos da temperatura ambiente no desenvolvimento embrionário está na modificação das propriedades físicas e bioquímicas das membranas celulares. Esses autores ao avaliarem o efeito da estação do ano na dinâmica folicular, viabilidade do oócito e possíveis interações com as propriedades físicas e bioquímicas das suas membranas, encontraram diferenças na morfologia de oócitos no inverno e verão, e uma maior porcentagem de ácidos graxos saturados presente nos oócitos durante o verão, enquanto que a porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados era maior em oócitos e células da granulosa durante o inverno. Essas alterações podem levar a mudanças nas propriedades bioquímicas

das membranas e, conseqüentemente, influenciar na funcionalidade e fertilidade dos oócitos. Contudo, Edwards & Hansen (1996) sugerem que as células do *cumulus* podem fornecer termoprotetores extracelulares ou produzir moléculas regulatórias que causem a ativação de mecanismos de proteção térmica do oócito.

Além disso, o ETC pode comprometer o desenvolvimento embrionário por reduzir o fluxo de sangue uterino e aumentar a temperatura uterina (Gwazdauskas et al., 1975; Roman-Ponce et al., 1978), reduzir as concentrações plasmáticas de estradiol (E_2 ; Gwazdauskas et al., 1981; Wilson et al., 1998a; Wilson et al., 1998b), e por alterar a secreção de proteínas uterinas (Malayer et al., 1988; Malayer & Hansen, 1990). Estas alterações inibem o desenvolvimento embrionário (Rivera & Hansen, 2001), aumentam a perda do embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento, reduzem o sucesso da inseminação e produção de embriões por superovulação (Gordon et al., 1987; Alfujairi et al., 1993). O ETC pode promover o aumento da secreção de prostaglandina pelo endométrio e promover luteólise prematura em decorrência da dificuldade do embrião gerar sinais bioquímicos que sinalizam a gestação (Putney et al., 1988; Putney et al., 1989).

Adicionalmente, o ETC altera o padrão de desenvolvimento folicular em bovinos (Roth et al 2000), diminui o tamanho do folículo dominante da primeira e segunda ondas foliculares do ciclo estral (Badinga et al., 1993; Wilson et al., 1998a; Wilson et al., 1998b) e deprime a dominância folicular (Badinga et al., 1993; Wilson et al., 1998b; Guzeloglu et al., 2001). Conseqüentemente mais de um folículo dominante poderia se desenvolver no período pré-ovulatório, resultando em dupla ovulação (Kornmatitsuk et al., 2008; Ryan & Boland 1991). Em estudo realizado por Torres Júnior et al. (2008), vacas da raça Gir (*Bos indicus*) foram submetidas ao ETC, e apresentaram efeito retardado sobre a função reprodutiva, manifestando maior incidência de folículos grandes e codominância folicular, entretanto, reduzindo a duração do ciclo estral, concentração de progesterona (P_4) e capacidade de desenvolvimento do oócito.

Durante o verão ocorre menor detecção do estro em vacas (Kornmatitsuk et al., 2008) e maior ocorrência de anestros e de ovulação silenciosa. Estas alterações podem estar relacionadas com a redução na síntese de E_2 pelo folículo dominante (Badinga et al., 1993).

As alterações no desenvolvimento folicular durante o ETC provavelmente afetam outros eventos reprodutivos como a secreção de gonadotrofinas (Gilad et al., 1993), desenvolvimento do corpo lúteo (Wolfenson et al., 1993) e consequentemente secreção de P_4 (Breuel et al., 1993).

As concentrações circulantes de P_4 podem ser afetadas pelo ETC, embora existam relatos de que os valores de P_4 aumentem (Roman Ponce et al., 1981), diminuam (Younas et al., 1993; Howell et al., 1994) ou permanecem inalterados (Gwazdauskas et al., 1981) como consequência do ETC. Por outro lado, os níveis plasmáticos de P_4 são determinados pela diferença entre a taxa de produção luteal e a taxa de metabolismo hepático, sendo que ambos são afetados pelas mudanças na ingestão de matéria seca (IMS; De Rensis & Scaramuzzi, 2003). Consequentemente, animais com maior produção leiteira tem intenso fluxo sanguíneo hepático e maiores taxas de metabolização de P_4 (Vasconcelos et al., 2003; Lucy, 2001). Menores níveis de P_4 podem conduzir a formação de grandes folículos persistentes, devido provavelmente a uma maior frequência na pulsatilidade de LH, resultando oócitos de baixa capacidade de fecundação (Vasconcelos et al., 2001).

Os efeitos da alta temperatura ambiente nas funções reprodutivas são exacerbados pelo aumento na produção de calor metabólico associado à lactação (Sartori et al., 2002) e pelo aumento da umidade relativa (Bianca, 1965; West, 2003). Vacas em lactação são mais suscetíveis ao ETC do que novilhas (Cavestany et al., 1985; Wilson et al., 1998b; Pires et al., 2001) e uma explicação seria o fato de que o calor metabólico produzido pelas vacas em lactação promove hipertermia durante o verão, enquanto que em novilhas a produção de calor metabólico é menor e, provavelmente, não apresentam hipertermia nas mesmas temperaturas ambientais que as vacas (Wilson et al., 1998b).

Pires et al. (2001), trabalhando com animais puros de origem (PO) da raça HPB no estado de Minas Gerais, relataram influência positiva do verão (época das chuvas) nas taxas de prenhez de novilhas (85,4% no verão e 78,3% no inverno). Por outro lado, as taxas de prenhez de vacas em lactação foram 45,7 e 71,2% no verão e no inverno, respectivamente, demonstrando um efeito negativo do aumento da temperatura (verão) na fertilidade das vacas.

A resistência ao ETC está possivelmente relacionada com características genéticas e raciais do animal. Desta forma, raças adaptadas apresentam menores

temperaturas corpóreas durante o ETC do que raças não adaptadas (Hammond et al., 1996, 1998; Gaughan et al., 1999). A habilidade de raças adaptadas em regular a temperatura corpórea durante o ETC é o resultado de menores taxas metabólicas, bem como maior capacidade de perda de calor (Hansen, 2004), contribuindo assim para a maior fertilidade desses animais (Hansen, 1999). Entre as raças zebuínas e européias há diferenças quanto à resistência ao ETC. O gado zebuino possui maior capacidade de regular a temperatura corporal em resposta ao ETC do que o gado de origem européia (Hansen, 2004).

Evidências comprovam que raças adaptadas a climas quentes adquirem genes que protegem suas células contra os efeitos deletérios do ETC (Hansen, 2004). A influência do ETC sobre as células pode ser observada nas raças HPB e Brahman, onde ocorre uma maior redução na síntese de DNA das células endometriais de vacas HPB do que em vacas Brahman (Malayer & Hansen, 1990). Adicionalmente, a exposição a elevadas temperaturas exerce um efeito menos deletério sobre os linfócitos de raças adaptadas ao calor (Brahman e Senepol) do que sobre os linfócitos de raças não adaptadas (Angus; Kamwanja et al, 1994; Paula Lopes et al., 2003).

Vários estudos demonstram que embriões *Bos indicus* e *Bos taurus* adaptados (Romosinuano) são menos afetados por elevadas temperaturas do que embriões *Bos taurus* não adaptados (HPB e Angus, Block et al., 2002; Barros et al., 2006). Paula Lopes et al. (2001) observaram que embriões de raça resistente ao calor (Brahman) se desenvolveram melhor após o ETC do que embriões de raças sensíveis ao calor (HPB e Angus). De forma similar, Barros et al. (2002) e Freitas (2002) observaram que embriões da raça Nelore foram mais resistentes ao ETC que embriões mestiços (oócito taurino x sêmen zebuino) desenvolvidos *in vitro*. Hernández Céron et al. (2004) mostraram que embriões Brahman e Romosinuano são mais resistentes ao ETC que embriões da raça Angus, onde os embriões Angus, Brahman e Romosinuano cultivados a 38,5 e 41 °C tiveram taxa de formação de blastocistos de 30,3±4,6%, 25,1±4,6% e 28,3±4,1% contra 4,9±4,6%, 13,6±4,6% e 17,5±4,1%, respectivamente.

Não está claro se existem diferenças entre as raças na aquisição de termotolerância antes da ativação do genoma embrionário (8 a 16 células). Krininger et al. (2003) determinaram que embriões das raças Brahman e HPB, quando submetidos ao ETC de 41 °C no estágio de 2 a 8 células, não

apresentaram diferenças nas taxas de blastocisto. Entretanto, observaram que houve uma tendência dos embriões da raça Brahman se desenvolverem mais rapidamente do que os embriões da raça HPB.

A aquisição de termotolerância embrionária pode ser conferida pelo oócito, pelo espermatozóide ou por ambos, como demonstram alguns estudos. Block et al. (2002) observaram que embriões oriundos de oócitos de vacas da raça Brahman e espermatozóide de touros da raça Angus são mais termotolerantes dos que embriões oriundos de oócitos de vacas da raça HPB e espermatozóide de touro Angus. Porém, também foi observado que não há diferenças na termotolerância entre embriões oriundos de oócitos de vacas HPB e espermatozóides de touros Brahman ou Angus. De forma similar, Saito et al. (2006) verificaram que não houve diferença na termotolerância entre embriões oriundos de oócitos de vacas da raça HPB, fertilizados com sêmen de touros das raças HPB e Gir, submetidos ao ETC (41 °C, 12h, 96 hpi), demonstrando não haver influência da raça do touro na aquisição de termotolerância. Tais experimentos sugerem que o oócito tem um papel crucial na termotolerância embrionária.

Por outro lado, Eberhardt et al. (2009) observaram que oócitos de vacas HPB, fertilizados com sêmen Nelore, são mais resistentes ao ETC do que oócitos HPB fertilizados com sêmen Angus, indicando que a raça do touro também pode influenciar a resistência do embrião ao ETC. Além disso, Pegorer et al. (2007) observaram que durante o verão a inseminação artificial de vacas HPB com touros da raça Gir resultou em taxas de prenhez mais elevadas do que a IA com touros HPB. Estes dados indicam que além do oócito o espermatozóide também pode contribuir para o desenvolvimento de tolerância ao ETC em embriões bovinos.

Dikmen et al. (2009) demonstraram que a regulação da temperatura corpórea em vacas em lactação pode ser influenciada pela heterose. Neste estudo foi avaliado o efeito do genótipo na capacidade de termorregulação em vacas das raças HPB, Jersey, mestiças (Sueca Vermelha x HPB) e mestiças (Jersey x HPB). Os resultados apontaram que vacas mestiças (Jersey x HPB) apresentaram maior capacidade de termorregulação em relação às outras raças, evidenciando assim, o efeito da heterose sobre a termorregulação. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Prayaga et al. (2003), os quais

demonstraram que o cruzamento entre raças zebuínas e taurinas apresenta melhor adaptabilidade as condições ambientais do que o cruzamento apenas entre raças taurinas. Desta forma, é provável que a capacidade de termorregulação possa ser melhorada através de cruzamentos adequados e pela exploração da heterose.

Referências Bibliográficas

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. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 62(2), p. 174-180. 2002.

AL-KATANANI, Y.M., PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **J.Dairy Sci.**, v.85, p.390-6, 2002.

ALBRIGHT, J.L., ARAVE, C.W. **The behavior of cattle**. Wallingford: Cab International, p. 1-18, 1997.

ALFUJAIRI MM, ALIBRAHIM RM, ELNOUTY FD. Seasonal variations in superovulatory responses of Holstein cows treated with pregnant mare serum gonadotrophin in Saudi Arabia. **J Reprod Fertil.**, v.11, p.75, 1993 (abstract).

ALLEN, T.E., PAN, Y.S., HAYMAN, R. The effect of feeding on the evaporative heat loss and body temperature in Zebu and Jersey heifers. **J. Agric. Res.**, v. 14, p.580-93, 1963.

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL – **ACNB**, <http://www.nelore.org.br>.

BADINGA, L., COLLIER, R.J., THATCHER, W.W., WILCOX, C.J. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. **J. Dairy Sci.**, v.68, p.78-85, 1985.

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

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, Scotland, **Anais**, 2002, p.A4.

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, p. 210 – 218, 2006.

BIANCA, W. Reviews of the progress of dairy science. Section A: physiology. Cattle in a hot environment, **J. Dairy Res.**, v. 32, p. 291–345, 1965.

BIGGERS, B.G., GEISERT, R.D., WETTEMAN, R.P., BUCHANAN, D.S. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. **J. Anim. Sci.**, v.64, p.1512-8, 1987.

BLOCK, J., CHASE Jr., C.C., HANSEN, P.J. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal vs paternal contribution. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 63, p. 32-37, 2002.

BREUEL, K.K., LEWIS, P.E., SCHRICK, F.N., LISHMAN, A.W., INSKEEP, E.K., BUTCHER., R.L. Factors Affecting Fertility in the Postpartum Cow: Role of the Oocyte and Follicle in Conception Rate. **Biol. Reprod.**, v.48, p. 655 – 61, 1993.

CARTWRIGHT, T.C. Responses of beef cattle to high ambient temperatures. **J. Anim. Sci.**, v.14, p.350-62, 1955.

CARVALHO, F.A., LAMMOGLIA, M.A., SIMOES, M.J., RANDEL, R.D. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. **J. Anim. Sci.**, v.73, p.3570-3, 1995.

CAVESTANY, D., EL-WISHY, A.B., FOOTE, R.H. Effect of season and high environmental temperature on fertility of holstein cattle. **J. Dairy Sci.**, v 68, p.1471-8, 1985.

DE RENSIS, F., MARCONI, P., CAPELLI, T., GATTI, F., FACCIOLONGO, F., FRANZINI, S. 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, p.1675 – 87, 2002.

DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R.J.; Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow – a review. **Theriogenology**, v.60, p.1139-1151, 2003.

DIKMEN, S., MARTINS, L., PONTES, E., HANSEN, P.J. Genotype effects on body temperature in dairy cows under grazing conditions in a hot climate including evidence for heterosis. **Int. J. Biometeorol.**, 2009 (in press).

EALY, A.D., DROST, M., HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **J. Dairy Sci.**, v.76, p.2899-905, 1993.

EALY, A.D., HANSEN, P.J. Induced thermotolerance during early development of murine and bovine embryos. **J. Cell. Physiol.**, v.160, p.463-8, 1994.

EALY AD, HOWELL JL, MONTERROSO VH, ARÉCHIGA CF, HANSEN PJ. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. **J. Dairy Sci.**, v.73, p.1401-7, 1995.

EBERHARDT, B.C., SATRAPA, R.A., CAPINZAIKI, C.R.L., TRINCA, L.A., BARROS, C.M. Influence of breed of Bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Anim. Reprod. Sci.** 2009 (in press).

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. **Mol Reprod Dev.**, v.48, p.25–33, 1997.

EDWARDS, J.L., HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.138-45, 1997.

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. **Biol. of Reprod.**, v.55, p.340-6, 1996.

EDWARDS, J.L., KING, W.A., KAWARSKY, S.J., EALY, A.D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP 70 and glutathione. **Theriogenology**, v.55, p.209-23, 2001.

FINCH, V.A. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the tropics. **J. Anim. Sci.**, v.62, p.531-42, 1986.

FREITAS, E.C. **Efeitos do estresse térmico calórico no desenvolvimento de embriões bovinos maturados, fecundados e desenvolvidos in vitro.** Botucatu, 2002. 82 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

GAUGHAN, J.B., MADER, T.L., HOLT, S.M., JOSEY, M.J., ROWAN, K.J. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **J. Anim. Sci.**, v.77, p.2398-405, 1999.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v.1, 1134p.

GILAD, E., MEIDAN, R., BERMAN, A., GRABER, Y., WOLFENSON, D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p.315-21, 1993.

GORDON, I., BOLAND, M.P., MCGOVERN, H., LYNN, G. Effect of season on superovulatory responses and embryo quality in Holstein cattle in Saudi Arabia. **Theriogenology**, v.27, p.231, 1987 (abstract).

GUZELOGLU, A., AMBROSE, J.D., KASSA, T., DIAZ, T., THATCHER, M.J., THATCHER, W.W. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v.66, p.15-34, 2001.

GWAZDAUSKAS, F.C., THATCHER, W.W., KIDDY, C.A., PAAPE, M.J., WILCOX, C.J. Hormonal pattern during heat stress following the salt induced luteal regression in heifers. **Theriogenology**, v.16, p.271-85, 1981.

GWAZDAUSKAS, F.C., WILCOX, C.J., THATCHER, W.W. Environmental and management factors affecting conception rate in a subtropical climate. **J. Dairy Sci.**; v.58, p.88–92, 1975.

HAMMOND, A.C., CHASE JR, C.C., BOWERS, E.J., OLSON, T.A., RANDEL, R.D., MURPHY C.N., VOGT. D.W., TEWOLDE. A. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus and Hereford cattle in Florida. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.295-303, 1996.

HAMMOND, A.C., OLSON, T.A., CHASE JR. C.C., BOWERS, E.J., RANDEL, R.D. Heat tolerance in Tuli-, Senepol-, and Brahman-Sired F1 Angus heifers in Florida. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.1568-77, 1998.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v.83-84, p.349-60, 2004.

HANSEN, P.J. Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the mammalian preimplantation embryo from heat shock. **Ann. Rev. Biomed. Sci.**, v.1, p.5-29, 1999.

HANSEN, P.J., DROST, M., RIVERA, R.M., PAULA-LOPES, F.F., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER III, C.E., CHASE JR, C.C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v.55, p.91-103, 2001.

HER, E., WOLFENSON, D., FLAMENBAUN, I., FOLMAN, Y., KAIM, M., BERMAN, A. Thermal productive, and reproductive responses of high yielding cows exposed to short-term cooling in Summer. **J. Dairy Sci.**, v.71, p.1085-92, 1988.

HERNÁNDEZ-CERÓN, J., CHASE, C.C. Jr, and HANSEN, P.J. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.53-8, 2004.

HOWELL, J.L., FUQUAY, J.W., SMITH, A.E. Corpus luteum growth and function in lactating holstein cows during spring and Summer. **J. Dairy Sci.**, v.77, p.735-9, 1994.

INGRAHAM, R.H., STANLEY, R.W., WAGNER, W. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in Hawaii. **J. Dairy. Sci.**, v.59, p.2086-90, 1976.

JOHNSON, H.D. Environmental temperature and lactation (with special reference to cattle). **Int. J. Biom.**, v. 9, p.103–16, 1965.

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. **J. Anim. Sci.**, v.17, p. 473-9, 1958.

KAMWANJA, L.A., CHASE JR., C.C., GUTIERREZ, J.A., GUERRIERO JR., V., OLSON, T.A., HAMMOND, A.C., HANSEN, P.J. Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.438–44, 1994.

KIBLER, H.H., BRODY, S. Environmental physiology with special reference to domestic animals. XIII. Influence of increasing temperature, 40 to 105 °F, on heat production, and cardiorespiratory activities in Brown Swiss and Brahman cows and heifers. **Mo. Res. Bull.** p. 473, 1951.

KORNMATITSUK, B., CHANTARAPRATEEP, P., KORNMATITSUK, S., KINDAHL, H. Different Types of Postpartum Luteal Activity Affected by the Exposure of Heat Stress and Subsequent Reproductive Performance in Holstein Lactating Cows. **Reprod. Dom. Anim.**, v.43, p.515-19, 2008.

KRININGER, III C.E., BLOCK, J., AL-KATANANI, Y.M., RIVERA, R.M., CHASE, JR C.C., HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, p. 13-24, 2003.

LANE, M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. **Theriogenology**, v. 55, p.225-36, 2001.

LAWRENCE, J.L., PAYTON, R.R., GODKIN, J.D., SAXTON, A.M., SCHRICK, F.N., EDWARDS, J.L. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.2449–54, 2004.

LENZ R.W., BALL, G.D., LEIBFRIED, R. L. AX., FIRST, N.L. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. **Biol. Reprod.**, v.29, p. 173-9, 1983.

LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **J. Dairy Sci.**, v.84, p.1277-93, 2001.

MALAYER, J.R., HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in heat-shock induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.266-80, 1990.

MALAYER, J.R., HANSEN, P.J., BUHL, W.C. Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. **J. Exp. Zool.**, v.248, p.345-53, 1988.

MCDOWELL, R.E., LEE, D.H.K., FOHRMAN, M.H. The relationship of surface area to heat tolerance in Jersey and Sindhi – Jersey (F1) crossbred cows. **J. Anim. Sci.**, v.12, p. 747-56, 1953.

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. **J. Anim. Sci.**, v.14, p. 1187, 1955 (abstract).

PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J. Heat-shock induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally-regulated phenomenon. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 1169-77, 2002.

PAULA-LOPES, E.F., CHASE, C.C., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER III, C.E., RIVERA, R.M., TEKIN, S., MAJEWSKI, A.C., OCON, O.M., OLSON, T.A., HANSEN, P.J. Breed differences in resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock. **Theriogenology**, v.55, p.436, 2001.

PAULA-LOPES, F.F., CHASE, C.C., AL-KATANANI III 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, p. 285–94, 2003.

PEGORER, M.F., VASCONCELOS, J.L.M., TRINCA, L.A; HANSEN, P.J., BARROS, C.M. Influence of sire and sire breed (Gyr x Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactation Holstein cows during Summer heat stress. **Theriogenology**, 2006 (submitted).

PIRES, M.F.A., SARTUNINO, H.M., CAMPOS, A.T., TEODORO, R.L. Taxa de gestação em fêmeas da raça holandesa confinadas em *Free Stall*, no verão e inverno. **Reunião anual SBZ**, 38, 2001, Piracicaba. Anais. Piracicaba 2001.
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.1027-38, 2003.

PUTNEY, D.J., MULLINS, S., THATCHER, W.W., DROST, T.S. Embryonic development in superovulate dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v.19, p.37-51, 1989.

PUTNEY, D.J., MALAYER, J.R., GROSS, T.S., THATCHER, W.W., HANSEN, P.J., DROST, M. Heat Stress-Induced Alterations in the Synthesis and Secretion of Proteins and Prostaglandins by Cultured Bovine Conceptuses and Uterine Endometrium. **Biol. Reprod.**, v.39, p.717-28, 1988.

RIVERA, R.M., AL-KATANANI, Y.M., PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J. Short Communication: seasonal effects on development of bovine embryos produced by in vitro fertilization in a hot environment. **J. Dairy Sci.**, v.83, p. 305-7, 2000.

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

ROCHA, A., RANDEL, R.D., BROUSSARD, J.R., LIM, J.M., BLAIR, R.M., ROUSSEL, J.D., GODKE, R.A., HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.49, p.657-65, 1998.

ROMAN-PONCE, H., THATCHER, W.W., CATON, D., BARRON, D.H., WILCOX, C.J. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **J. Anim Sci.** v.46, p.175-80, 1978.

ROMAN-PONCE, H., THATCHER, W.W., WILCOX, C.J. Hormonal interrelationships and physiological responses of lactating dairy cows to shade management system in a subtropical environment. **Theriogenology**, v.16, p.139- 54, 1981.

ROTH, Z., ARAV, A., BOR, A., ZERON, Y., OCHERETNY, A., WOLFENSON, D. Enhanced removal of impaired follicles improves the quality of oocytes collected in the autumn from summer heat-stressed cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.23, p.32 (abstract), 1999.

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, p. 235-44, 2005.

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

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 **J. Reprod. Fertil.**, v.120, p.83–90, 2000.

ROTH, Z., MEIDAN, R., SHAHAM-ALBALANCY, A., BRAW-TAL, R., WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **J. Reprod. Fertil.**, v.121, p. 745-51, 2001.

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

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. Botucatu, 2006. p. 42. **Monografia** – Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu.

SANTIAGO, A.A. **O Zebu na Índia, Brasil e no mundo**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, p. 706, 1985.

SARTORI, R., SARTOR – BERGFELT, R., MERTENS, A.S., GUENTHER, J.N., PARRISH, J.J., WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J. Dairy Sci.**, v.85, p.2803-12, 2002.

SEIF, S.M., JOHNSON, H.D., LIPPINCOTT, A.C. The effects of heat exposure (31 °C) on Zebu and Scottish Highland cattle, **Int. J. Biome.**, v 23, p. 9–14, 1979.

SKINNER, J.D., LOUW, G.N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle, **J. Appl. Physiol.**, v.21, p.1784–90, 1966.;

SUGIYAMA, S., MCGOWAN, M., PHILLIPS, N., KAFI, M., YOUNG, M. Effects of Increased Ambient Temperature During IVM and/or IVF on the In Vitro Development of Bovine Zygotes. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 42, p.271-274, 2007.

THATCHER, W.W., COLLIER, R.J. Effects of climate on bovine reproduction In: Morrow, D.A (Ed) Current therapy in Theriogenology, 2 ed. Philadelphia W.B Saunders CO., p.301-9, 1986.

THATCHER, W.W., HANSEN, P.J., Environment and reproduction. In: **Reprod. Domest. Anim.** Amesterdan: Elsevier World Animals Science Series, v.9, p 433- 57, 1993.

TORRES-JÚNIOR, JR., PIRES, M.F.A., SÁ, W.F., FERREIRA, A.M., VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A., RAMOS, A.A., FOLHADELLA, I.M., POLISSENI, J., FREITAS, C., CLEMENTE, C.A.A., SÁ FILHO, M.F., PAULA-LOPES, F.F., BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in Bos indicus cattle **Theriogenology**, v.69, p.155-66, 2008.

VASCONCELOS, J.L.M., SANGSRITAVONG, S., TSAI, S.J., WILTBANK, M.C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Theriogenology**, v.60, p.795-807, 2003.

VASCONCELOS , J.L.M., SARTORI, R., OLIVEIRA, H.N., GUENTHER, J.G., WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, p.307-14, 2001.

WEST, J.W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v.86, p.2131–44, 2003.

WILSON, S.J., KIRBY, C.J., KOENIGSFELD, A.T., KEISLER, D.H., LUCY, M.C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.2132-8, 1998 a.

WILSON, S.J., MARION, R.S., SPAIN, J.N., SPIERS, D.E., KEISLER, D.H., LUCY, M.C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating Cows. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.2124-31, 1998 b.

WOLFENSON, D., LUFT, O., BERMAN, A., MEIDAN, R. Effects of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin F2_α production in bovine luteal cells. **Anim. Reprod. Sci.**, v.32, p.27-40, 1993.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.535-47, 2000.

YOUNAS, M., FUQUAY, J.W., SMITH, A.E., MOORE, A.B. Estrous and endocrine responses of lactating holsteins to forced ventilation during Summer. **J. Dairy Sci.**, v.76, p.430-6, 1993.

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. **J. Reprod. Fertil.**, v.121, p.447-54,2001.

CAPÍTULO 2

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

Este artigo esta de acordo com as normas para publicação na Theriogenology,
exceto a apresentação das figuras, tabelas e o idioma.

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

Running title:

Influência da raça do touro na termotolerância de embriões bovinos

Thaís Nabhan¹, Rafael A. Satrapa¹, Renato A. L. Simões¹, Cíntia F. Silva¹,
Eduardo M. Razza¹, Raquel Z. Puelker¹, Luzia A. Trinca², Ciro M. Barros^{1a}

*Departamento de Farmacologia¹, Departamento de Bioestatística² – IB,
Universidade do estado de São Paulo (UNESP), 18618-000, Botucatu, São Paulo,
Brasil.*

^a Autor para correspondência: Ciro M. Barros; fax: +55 14 38153744; e-mail:
cmbarros@ibb.unesp.br

Resumo

Existem evidências de que os efeitos deletérios do estresse térmico calórico (ETC) sobre a fertilidade são menos pronunciados em raças tolerantes ao calor devido primariamente às diferenças na capacidade de termorregulação. Experimentos *in vitro* têm demonstrado que embriões zebuínos (*Bos indicus*) são mais resistentes ao ETC quando comparados a taurinos (*Bos taurus*). A fim de melhor compreender as diferenças entre zebuínos e taurinos em relação à resistência ao choque térmico, objetivou-se com o presente trabalho verificar se a resistência ao ETC é resultado da contribuição genética do oócito, do espermatozóide ou de ambos e se o intervalo de tempo entre o abate dos animais e a aspiração do oócito influencia o desenvolvimento do embrião. No experimento 1 oócitos de vacas das raças Nelore e mestiças com fenótipo predominante da raça Holandesa preto e branco (mHPB) foram coletados em frigorífico, maturados e fertilizados com espermatozóide de touros das raças Nelore (N), Angus (An), Brahman (Bra) e Gir (Gir). No experimento 2 oócitos de vacas das raças Nelore e HPB puras foram coletados em frigorífico, aspirados 4 e 6:30 horas após o abate dos animais, maturados e fertilizados com espermatozóide de touros das raças N, Gir e HPB. Em ambos os experimentos, noventa e seis horas pós-inseminação (hpi), os embriões com mais de 16 células foram separados ao acaso em dois grupos: controle e ETC. Os 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. No experimento 1 não foi observado efeito do ETC nas várias raças estudadas, não havendo portanto, redução nas taxas de blastocisto e blastocisto eclodido. As taxas de clivagem e mórula dos embriões mHPB x Gir foram inferiores ($p < 0,05$) as das demais raças. As raças mHPB x N apresentaram

taxas de blastocisto superiores as raças mHPB x An e mHPB x Gir ($p<0,05$). No experimento 2 as taxas de clivagem, mórula e blastocisto do grupo 4 horas foram superiores ($p<0,05$) as do grupo 6:30 horas. O ETC reduziu as taxas de blastocisto em todas as raças (N x N, HPB x HPB e HPB x Gir) e em ambos os intervalos de tempo (4 e 6:30 horas). A raça N x N apresentou taxa de clivagem superior ($p<0,05$) as raças HPB x HPB e HPB x Gir, em ambos os intervalos de tempo. Além disso, a taxa de blastocisto na raça N x N foi superior ($p<0,05$) as demais raças, tanto para o grupo controle (39 °C) quanto para o grupo ETC. Concluiu-se que: a) embriões provenientes de oócitos de vacas HPB puras são mais sensíveis ao ETC do que aqueles provenientes de oócitos de vacas HPB mestiças; b) a contribuição genética do oócito é mais importante do que a do espermatozóide, uma vez que a raça do touro não influenciou a resistência embrionária ao ETC; c) o aumento do intervalo de tempo (de 4 para 6:30 horas) entre o abate e a aspiração dos oócitos influenciou negativamente o desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: blastocisto, bovino, embrião, estresse térmico, fertilização *in vitro*.

1.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. Dentro as raças de corte, a raça Nelore (*Bos indicus*) é a que possui maior contingente numérico (acima de 90 milhões de cabeças, [1]) devido 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 espermatozóide nos machos e queda da fertilidade nas fêmeas [4].

Existem diferenças genéticas na resistência ao estresse térmico calórico (ETC), com as raças adaptadas apresentando menores temperaturas durante o ETC do que raças não adaptadas [5-12]. 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, comparado com o gado europeu, o gado zebuino sofre redução menos severa na ingestão alimentar [5,13-15], taxa de crescimento [6,16], produção de leite e carne [17] e funções reprodutivas [18,19] em resposta ao ETC.

A exposição de fêmeas de mamíferos ao ETC aumenta a mortalidade embrionária [20]. 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 embriões [21].

Paula Lopes et al. [22] observaram que embriões (≥ 9 células) de raça resistente ao calor (Brahman) se desenvolveram melhor até o estágio de blastocisto após ETC (41 °C por 6 horas) do que embriões de raças sensíveis ao calor (HPB e Angus). De forma similar, embriões da raça Nelore são mais resistentes ao ETC do que embriões mestiços (oócito taurino x sêmen zebuino) [23] 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*) [24].

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 Angus [25]. Entretanto, não houve diferença com relação à resistência ao ETC para embriões Holandês x Brahman e Holandês x Angus [25]. Estes resultados indicam que a contribuição do oócito é mais importante do que a do espermatozóide na capacidade dos embriões Brahman resistirem aos efeitos do estresse calórico.

De forma similar, Saito et al. [26] 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. [27] 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 espermatozóide, 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. [28], 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.

A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do genoma embrionário é ainda inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a

certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é um aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre [29]. Utilizando sistema de cultivo *in vitro*, Rocha et al. [18] e Al-Katanani & Hansen [30], mostraram que a temperatura elevada reduziu a sobrevivência dos embriões em estágios iniciais de desenvolvimento embrionário.

Os efeitos do ETC sobre a viabilidade do embrião diminuem de acordo com o avanço da prenhez [31-35]. Uma possível explicação para esse fenômeno é que os embriões se tornam mais resistentes aos efeitos negativos do ETC à medida que avançam no seu desenvolvimento [33].

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 mestiças são mais resistentes ao ETC do que embriões de raças taurinas; b) a resistência ao ETC é resultado da contribuição genética do oócito e do espermatozóide; c) o intervalo de tempo entre o abate dos animais e a aspiração dos oócitos influencia o desenvolvimento embrionário.

2. Materiais e Métodos

Os reagentes e meios foram adquiridos do Laboratório Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA; TCM199; Percoll; ácido láctico, gentamicina, albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA), estradiol, penicilamina, epinefrina, óleo mineral, hepes, fosfato de sódio, heparina, vermelho fenol, hipotaurina e bissulfeto de sódio), Merck (Darmstadt, Alemanha; bicarbonato de sódio, cloreto de

potássio, sulfato de magnésio, cloreto de magnésio), Gibco (Langley, OK, USA; soro fetal bovino), Vivimed (Ribeirão Preto, SP, Brasil; Choriomon[®]) e Hertape Calier (Juatuba, MG, Brasil; Pluset[®]).

2.1 Testes preliminares – Seleção de touros

Para a realização dos experimentos 1 e 2, testes preliminares foram realizados com o objetivo de selecionar seis touros de cada uma das cinco raças (Nelore, Angus, Gir, Holandês e Brahman) com resultados satisfatórios na produção *in vitro* (taxa superior a 25% de blastocisto), tendo o propósito de minimizar o efeito individual dos touros a serem utilizados nos experimentos.

Em cada ensaio foram testadas as cinco raças de touros e como controle foi utilizado o sêmen de um touro Nelore com produção de blastocisto previamente conhecida. Ao todo foram testados oito touros da raça Nelore, nove Angus, oito Gir, sete Brahman e sete touros Holandês Preto e Branco (HPB).

Para a realização destes testes preliminares foram coletados ovários de vacas da raça Nelore no frigorífico “Frigol”, a 47 Km do laboratório. O tempo decorrido entre a coleta dos ovários no frigorífico “Frigol” e a chegada ao laboratório foi de 1 hora.

2.2 Experimentos 1 e 2

Após a seleção dos touros (testes preliminares) foram realizados os experimentos 1 e 2. No experimento 1 foram utilizados ovários de vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) com fenótipo predominante de HPB (mHPB) coletados

no frigorífico “Vale do prata”, na cidade de São João da Boa Vista (SP), localizado a 300 km do laboratório, sendo estas vacas provenientes de vários criadores. 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. No experimento 2 foram utilizados ovários de vacas HPB puras e Nelore coletados no frigorífico “Mondelli”, na cidade de Bauru (SP), localizado a 90 km do laboratório. As vacas HPB utilizadas neste experimento eram provenientes de um único criador (fazenda Bela Vista, Tapiratiba, SP). O tempo decorrido entre a coleta dos ovários nos frigoríficos “Frigol”, “Vale do prata” e “Mondelli” e sua chegada ao laboratório foi de 1, 4 e 2 horas respectivamente.

2.2.1. Experimento 1 - Influência do espermatozóide e do oócito na produção in vitro (PIV) de embriões submetidos ao ETC

Os oócitos de vacas mestiças com fenótipo predominante de HPB (mHPB) 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, a seguir, retornaram a temperatura de 39 °C. Os oócitos dos grupos 1 e 2 foram distribuídos ao acaso em 4 sub-grupos de acordo com o tipo sêmen utilizado para a fertilização: Angus (An), Nelore (N), Gir (Gir) e Brahman (Bra). Foram utilizados 6 touros diferentes para cada uma das 4 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.

2.2.2. Experimento 2 - Comparação entre as taxas de produção in vitro de embriões oriundos de oócitos aspirados 4 horas e 6:30 horas após a coleta dos ovários

Os oócitos de vacas Nelore e HPB foram divididos em dois grupos experimentais. No grupo 1 os oócitos de ambas as raças foram aspirados após 4 horas da coleta dos ovários no frigorífico. No grupo 2 os oócitos de ambas as raças foram aspirados 6:30 horas após a coleta dos ovários no frigorífico. Os oócitos de vacas Nelore foram fertilizados com sêmen de touros Nelore e os de vacas HPB com sêmen de touros da raça Gir e HPB. Para cada uma das 3 raças de touro foram utilizados 6 touros diferentes, a fim de minimizar o efeito do touro. Cada grupo foi subdividido em grupo controle, onde a maturação, fertilização e cultivo foram realizados em temperatura constante de 39 °C e em grupo ETC, onde 96 horas após a inseminação os embriões foram submetidos a estresse térmico calórico de 41 °C, durante 12 horas consecutivas e, a seguir, retornaram a temperatura de 39 °C. Foram determinadas as taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido, 48, 96, 168 e 240 hpi, respectivamente.

2.3. Produção in vitro de embriões

A PIV foi realizada de acordo com técnica descrita por Eberhardt et al. [27], ligeiramente modificada:

2.3.1. Recuperação e classificação dos oócitos

O processo de produção *in vitro* de embriões foi realizado no Laboratório de Fertilização *in vitro* do Departamento de Farmacologia, no Instituto de Biociências da Unesp, Campus de Botucatu.

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. A solução salina contida no recipiente térmico dos ovários coletados em São João da Boa Vista (SP) foi substituída por outra aquecida (37 °C) após 2 horas da coleta, com o objetivo de manter a temperatura, já que o tempo de transporte destes ovários até o laboratório foi de 4 horas. Entretanto, para os ovários coletados em Lençóis Paulista (SP) e Bauru (SP) a solução salina não foi substituída, pois o tempo de transporte até o laboratório foi 1 e 2 horas, respectivamente.

As aspirações foliculares foram realizadas em dias aleatórios do ciclo estral, utilizando-se uma seringa de 10 mL e agulha 19 G. Os folículos de tamanho entre 3-8 mm foram puncionados e os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) imaturos depositados em tubos cônicos (Corning®) estéreis imersos em Banho Maria à 37 °C. Após a sedimentação, os oócitos foram classificados de acordo com as suas características celulares em quatro categorias: I) oócitos com citoplasma homogêneo, circundados por três ou mais camadas compactas de células do *cumulus*; II) oócitos com menos de três camadas de células do *cumulus* ou parcialmente desnudos, porém com granulação homogênea no citoplasma; III) oócitos circundados apenas por células da corona radiata; IV) oócitos desnudos [36].

2.3.2. *Maturação in vitro*

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 gentamicina. Posteriormente, os oócitos foram lavados duas a três vezes no meio de maturação e distribuídos em 4 gotas contendo 90 µL de meio de maturação, com uma média de 25 oócitos por gota, cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri (Corning®) de 35 x 10 mm. 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 gentamicina, 20 µg/mL de FSH (Pluset®) e 10 UI/mL de LH (Choriomon®). Os meios, preparados com 2 horas de antecedência, foram mantidos à 39 °C em incubadora. A maturação do COCs foi realizada em incubadora à 39 °C (5 % de CO₂ em ar), durante 22 - 24 horas.

2.3.3. *Preparo do sêmen e fertilização in vitro*

O descongelamento do sêmen foi realizado em água à 37 °C por 30 segundos. Em seguida, 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.

Durante a centrifugação do sêmen, os oócitos já maturados foram lavados três vezes no meio TCM 199 com HEPES e uma vez no meio de fertilização, antes de serem transferidos para gotas do mesmo meio (fertilização) cobertas com 3,5 mL de óleo mineral em placas de Petri de 35 mm x 10 mm.

Após a centrifugação, os espermatozóides viáveis obtidos do sedimento foram submetidos à avaliação de motilidade (lâmina e lamínula) e concentração (câmara de Neubauer) e diluídos em volume apropriado do meio de fertilização para se obter uma concentração de 1×10^6 espermatozóides/mL.

Após a diluição do sêmen, foi realizada a fertilização dos oócitos utilizando 9 μ L de sêmen diluído por gota. O processo de fertilização foi realizado por um período de 10 a 12 horas a 39 °C em 5% de CO₂ em ar. O meio de fertilização era composto por TALP-FIV suplementados com 6 mg/mL BSA livre de ácidos graxos, 2 μ L/mL de piruvato, 75 μ g/mL de gentamicina, 11 μ g/mL de heparina e 44 μ L/mL de solução de Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina (PHE).

2.3.4 Desnudamento e cultivo dos embriões

De 10 a 12 horas após a fertilização, os prováveis zigotos foram transferidos do meio de fertilização para o meio TCM 199 com HEPES já descrito anteriormente em tubos cônicos, os quais foram submetidos à agitação no vórtex (Phoenix[®], AP-56) a 3040 rpm durante 3 a 5 minutos para remover as células do *cumulus* circundante e também os espermatozóides associados. Em seguida, os prováveis zigotos foram lavados duas vezes em meio TCM 199 com HEPES e por último, uma vez em meio de cultivo, sendo então transferidos para gotas de cultivo de 90 μ L (20 a 25 oócitos por gota), cobertas com óleo mineral, em placas de Petri de 35 mm. Utilizou-se o meio de cultivo SOFaaci ("synthetic oviduct fluid"; Holm, 1999) acrescido de soro fetal bovino (5%) e piruvato de sódio (0,2%).

Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas em sacos plásticos 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 50 µL de meio já presente juntamente com estruturas degeneradas, e acrescentados 50 µL de meio de cultivo fresco em cada gota (“feeding”). Antes de cada “feeding” foram avaliadas as taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido.

Durante todo o processo de PIV as temperaturas e a concentração de CO₂ das incubadoras foram aferidos rotineiramente com o uso de termômetros de mercúrio e medidor de CO₂.

2.4. Análise estatística

No teste preliminar dos touros, as taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido de cada uma das cinco raças foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e o teste *a posteriori* de Tukey-Kramer utilizando o programa inStat® (1998). Nos experimentos 1 e 2 as taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA), utilizando o Proc MIXED de SAS [37]. Os dados de proporção foram transformados em arcoseno (\sqrt{P}) para o estudo dos efeitos das raças, tratamentos e interações, considerando efeito de rodada como aleatório.

3. Resultados

3.1. Teste preliminar dos touros

As taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido de cada touro testado estão sumariados no anexo 1. A média das taxas de blastocistos dos touros selecionados para o experimento (taxa $\geq 25\%$) encontram-se na figura 1.

Não houve diferenças significativas nas taxas de clivagem entre os touros Nelore, Angus, Brahman e Gir selecionados (taxa $\geq 25\%$; figura 1). As taxas de clivagem dos touros HPB foram inferiores a dos touros Nelore ($p < 0,05$; figura 1).

Os touros Nelore apresentaram taxas de mórula superiores a dos touros Angus, HPB e Gir ($p < 0,05$), não havendo diferenças entre as taxas de mórula dos touros Nelore e Brahman ($p > 0,05$; figura 1).

Não houve diferenças significativas nas taxas de blastocisto entre as raças de touros testadas ($p > 0,05$; figura 1). Contudo as taxas de blastocisto eclodido dos touros Nelore foram superiores a dos touros Angus e HPB ($p < 0,05$; figura 1), não apresentando diferenças entre os touros Brahman e Gir ($p > 0,05$; figura 1).

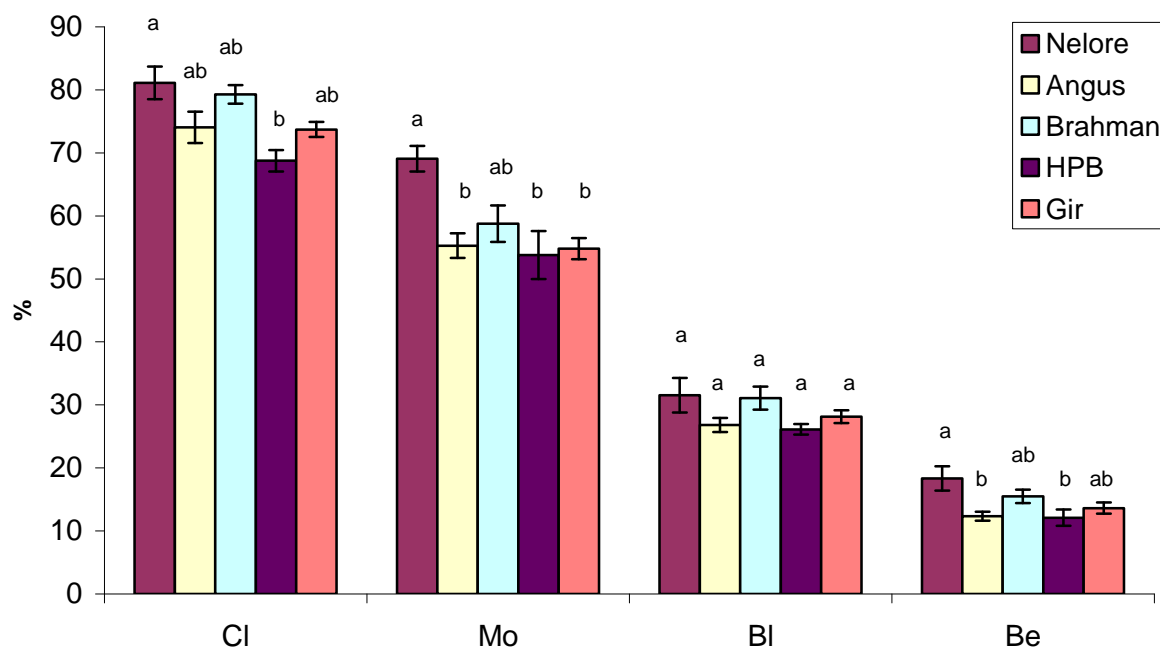


Figura 1. Média (\pm EPM) das taxas de clivagem (CI), mórula (Mo), blastocisto (BI) e blastocisto eclodido (Be) de oócitos de vacas Nelore (N) fertilizados com sêmen de 6 touros selecionados para cada uma das seguintes raças: Nelore, Angus, Brahman, Holandês Preto e Branco (HPB) e Gir. Foi utilizado um mínimo de 292 oócitos por raça de touro. Letras diferentes (^{a,b}) representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

3.2. Experimento 1 - Estresse térmico calórico (ETC) 96 horas pós-inseminação

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 Na 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 ($p > 0,05$; tabela1). 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).

Tabela 1. Taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido (Média \pm 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, 96hpi.

Temperatura (°C)										
	39	41 +	39	N	41 +	39	N	41 +	39	41+
Raça do touro	N	N	N	N	N	An	An	An	Bra	Gir
Raça da vaca	N	N	mHPB	HPB	HPB	mHPB	mHPB	mHPB	mHPB	mHPB
Oócito (n)	191	186	140	157	152	144	155	166	167	167
Clivagem (%)	79,0 \pm 2,89 ^b	82,8 \pm 2,6 ^y	74,3 \pm 4,6 ^{ab}	72,0 \pm 3,9 ^{xy}	71,7 \pm 5,5 ^a	71,5 \pm 5,4 ^x	74,8 \pm 3,4 ^a	57,8 \pm 6,4 ^c	68,9 \pm 2,9 ^x	54,5 \pm 5,7 ^w
≥ 16 Células (%)	66,0 \pm 4,0 ^a	67,2 \pm 4,3 ^x	57,1 \pm 3,4 ^a	54,8 \pm 4,9 ^x	54,6 \pm 6,6 ^a	59,7 \pm 5,9 ^x	60,6 \pm 6,3 ^a	39,1 \pm 7,45 ^b	55,6 \pm 2,1 ^x	40,1 \pm 7,1 ^y
BL (%)	35,6 \pm 1,8 ^b	34,4 \pm 3,1 ^y	25,0 \pm 4,22 ^{bc}	23,6 \pm 4,3 ^{yw}	15,8 \pm 2,0 ^a	17,4 \pm 3,5 ^x	22,6 \pm 3,1 ^{ac}	9,6 \pm 2,25 ^a	15,9 \pm 2,5 ^{xw}	12,0 \pm 3,7 ^x
BE (%)	27,2 \pm 4,0 ^b	19,3 \pm 3,3 ^y	9,3 \pm 3,62 ^a	7,6 \pm 3,4 ^x	7,9 \pm 3,1 ^a	8,3 \pm 3,2 ^x	9,7 \pm 3,1 ^a	2,41 \pm 1,5 ^a	7,9 \pm 2,2 ^x	6,0 \pm 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)

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

3.3. *Experimento 2 - Comparação entre as taxas de PIV oriundas de oócitos aspirados 4 e 6:30 horas após a coleta dos ovários*

As taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido foram avaliadas nos grupos controle (39 °C) e ETC (12h, 96hpi, 41 °C) de ambos os intervalos de tempo (4 e 6:30 horas) e estão sumariadas na tabelas 2 a 4 e nas figuras 2 e 3.

Dentro de cada raça, o grupo 4 horas apresentou taxas de clivagem e mórula superiores ao grupo 6:30 horas ($p < 0,05$; tabela 2). Os embriões N x N apresentaram taxa de clivagem superior ($p < 0,05$) aos embriões HPB x HPB e HPB x Gir, tanto no grupo 4 horas quanto no grupo 6:30h (tabelas 3 e 4). A taxa de mórula dos embriões HPB x Gir foi inferior a dos embriões N x N em ambos os intervalos de tempo ($p < 0,05$). Contudo, entre embriões N x N e HPB x HPB, houve diferenças nas taxas de mórula apenas no grupo 6:30 horas ($p < 0,05$; tabelas 3 e 4). Entre os embriões HPB x HPB e HPB x Gir não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas taxas de clivagem e mórula, tanto para o grupo 4 horas quanto para o grupo 6:30 horas (tabelas 3 e 4).

O ETC reduziu ($p < 0,05$) as taxas de blastocisto em todas as raças (N x N, HPB x HPB e HPB x Gir) e em ambos os intervalos de tempo (4 e 6:30 horas; tabela 2; figura 2). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os intervalos de tempo, onde o grupo 4 horas apresentou taxa de blastocisto superior ao grupo 6:30 horas em todas as raças (tabela 2; figura 3). A raça N x N apresentou taxa de blastocisto superior às demais raças ($p < 0,05$), tanto no grupo controle quanto no grupo ETC e em ambos os intervalos de tempo (tabelas 2, 3 e 4; figura 2). Independentemente do intervalo de tempo, as taxas de blastocisto entre as raças

HPB x HPB e HPB x Gir não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$; tabelas 3 e 4; figura 3).

Somente na raça N x N do grupo 4 horas foi evidenciado o efeito do ETC nas taxas de blastocisto eclodido ($p<0,05$; tabela 2). No grupo 6:30 horas, nenhuma das raças apresentaram efeito do ETC nas taxas de blastocisto eclodido ($p>0,05$; tabela 2).

No grupo controle, 4 horas, a raça N x N apresentou taxa de blastocisto eclodido superior ($p<0,05$) a das raças HPB x HPB e HPB x Gir (tabela 3). Quando comparados os grupos 4 e 6:30 horas, não houve diferença significativa ($p>0,05$) nas taxas de blastocisto eclodido entre as raças HPB x HPB e HPB x Gir (tabela 2).

Tabela 2. Taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido (Média ± EPM) de oócitos de vacas das raças Nelore (N) ou Holandesa Preto e Branco (HPB) aspirados 4 e 6:30 horas após o abate, fertilizados com sêmen de touro N, HPB e Gir (Gir), mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse térmico calórico (ETC) de 41°C por 12h, 96 horas após a inseminação.

Temperatura (°C)											
39			41+			39			41+		
Horas após abate	4*	6:30	4*	6:30	4*	6:30	4*	6:30	4*	6:30	41+
Touro	N	N	N	N	GIR	GIR	GIR	GIR	HPB	HPB	HPB
Vaca	N	N	N	N	HPB	HPB	HPB	HPB	HPB	HPB	HPB
Oócito (n)	144	163	144	161	125	123	134	113	134	126	109
Clivagem (%)	93,75 ±1,5	70,55 ±5,3	90,97 ±1,1	70,19 ±5,3	75,2 ±9,7	43,9 ±7,8	67,16 ±7,2	39,82 ±8,3	76,12 ±2,3	49,21 ±4,9	42,2 ±9,3
≥ 16 células (%)	86,11 ±0,8	53,99 ±5,5	81,25 ±1,5	50,93 ±5,9	56,8 ±16,8	21,95 ±5,1	51,49 ±12,7	15,93 ±2,8	64,93 ±8,1	18,25 ±4,3	21,1 ±6,0
Blastocisto (%)	34,72 ±3,6	19,02 ±1,2	29,86 ±4,0	13,04 ±1,1	10,4 ±0,2	6,5 ±0,2	6,72 ±1,5	0 ±0,0	9,7 ±1,3	4,76 ±2,0	1,83 ±1,8
Blastocisto eclodido (%)	17,36 ±3,5	3,68 ±1,6	6,94 ±3,4	0 ±0,0	4,8 ±1,8	0,81 ±0,6	0 ±0,0	0 ±0,0	2,24 ±0,9	0 ±0,0	0 ±0,0

* Taxas de clivagem, mórula e blastocisto foram superiores para os oócitos aspirados 4 horas após o abate quando comparado com 6:30 horas (p<0,05), em todas as raças estudadas.

+ Taxas de blastocisto significativamente diferentes (p<0,05) entre os grupos controle (39 °C) e ETC (41 °C)

Tabela 3. Taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido (Média ± EPM) de oócitos de vacas das raças Nelore (N) ou Holandesa Preto e Branco (HPB) aspirados 4 horas após o abate, fertilizados com sêmen de touro N, HPB e Gir (Gir), mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse térmico calórico (ETC) de 41°C por 12h, 96 horas após a inseminação.

Temperatura (°C)						
	39	41	39	41	39	41
Horas após abate	4	4	4	4	4	4
Touro	N	N	GIR	GIR	HPB	HPB
Vaca	N	N	HPB	HPB	HPB	HPB
Oócito (n)	144	144	125	134	134	131
Clivagem (%)	93,75±1,5 ^a	90,97±1,1 ^y	75,20 ±9,7 ^b	67,16±7,2 ^z	76,12 ±2,3 ^b	80,92±2,7 ^z
≥ 16 células (%)	86,11±0,8 ^a	81,25±1,5 ^y	56,80±16,8 ^b	51,49±12,7 ^z	64,93 ±8,1 ^{ab}	66,41±7,0 ^{yz}
Blastocisto (%)	34,72±3,6 ^a	29,86±4,0 ^y	10,40±0,2 ^b	6,72±1,5 ^z	9,7±1,3 ^b	6,11±0,7 ^z
Blastocisto eclodido (%)	17,36±3,5 ^a	6,94±3,4 ^y	4,80±1,8 ^b	0±0,0 ^z	2,24±0,9 ^b	0 ±0,0 ^z

^{a,b} Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas (p<0,05) entre raças (39 °C)
^{y,z} Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas (p<0,05) entre raças (41 °C)

Tabela 4. Taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido (Média ± EPM) de oócitos de vacas das raças Nelore (N) ou Holandesa Preto e Branco (HPB) aspirados 6:30 horas após o abate, fertilizados com sêmen de touro N, HPB e Gir (Gir), mantidos a 39 °C ou submetidos ao estresse térmico calórico (ETC) de 41°C por 12h, 96 horas após a inseminação.

Temperatura (°C)						
	39	41	39	41	39	41
Horas após abate	6:30	6:30	6:30	6:30	6:30	6:30
Touro	N	N	GIR	GIR	HPB	HPB
Vaca	N	N	HPB	HPB	HPB	HPB
Oócito (n)	163	161	123	113	126	109
Clivagem (%)	70,55±5,3 ^a	70,19±5,3 ^y	43,90±7,8 ^b	39,82±8,3 ^z	49,21±4,9 ^b	42,20±9,3 ^z
≥ 16 células (%)	53,99±5,5 ^a	50,93±5,9 ^y	21,95±5,1 ^b	15,93±2,8 ^z	18,25±4,3 ^b	21,10±6,0 ^z
Blastocisto (%)	19,02 ±1,2 ^a	13,04±1,1 ^y	6,50 ±0,2 ^b	0±0,0 ^z	4,76±2,0 ^b	1,83±1,8 ^z
Blastocisto eclodido (%)	3,68±1,6 ^a	0±0,0 ^y	0,81±0,6 ^a	0±0,0 ^y	0±0,0 ^a	0±0,0 ^y

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

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

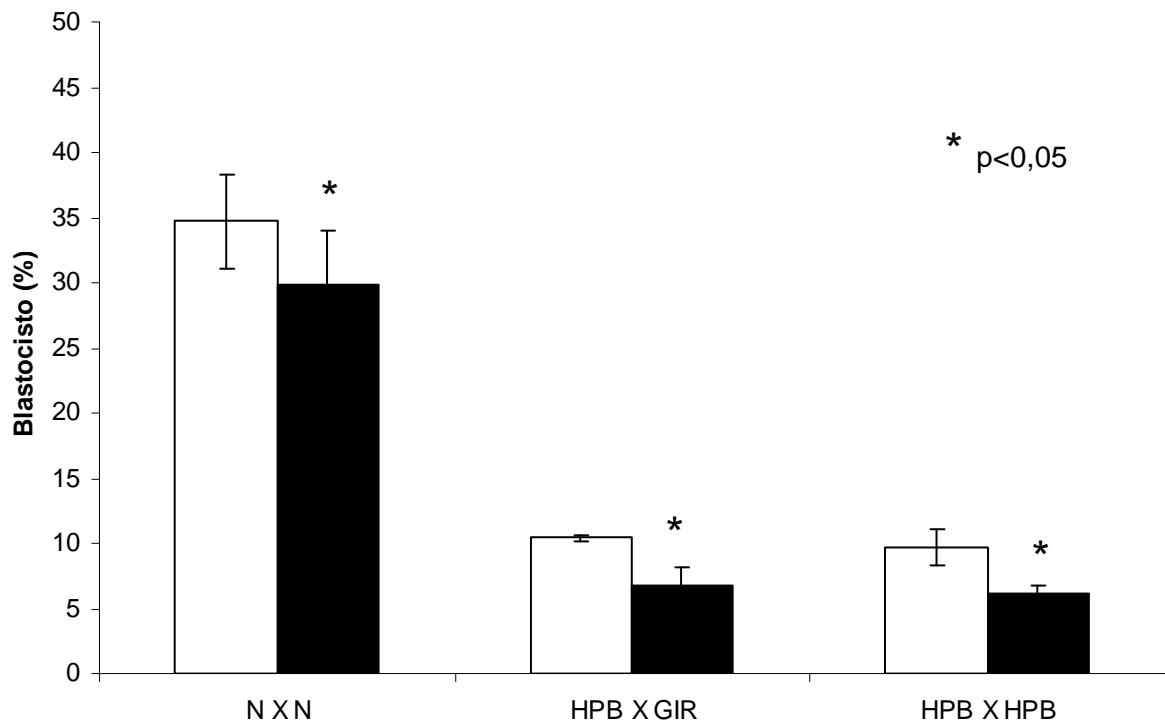
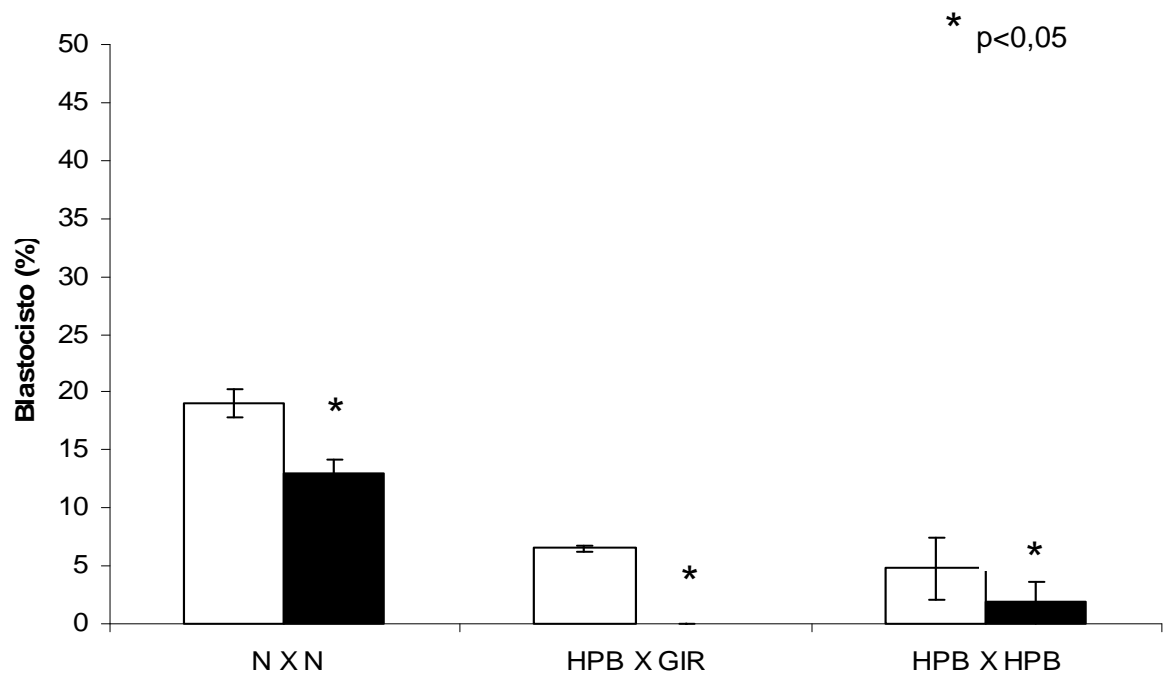
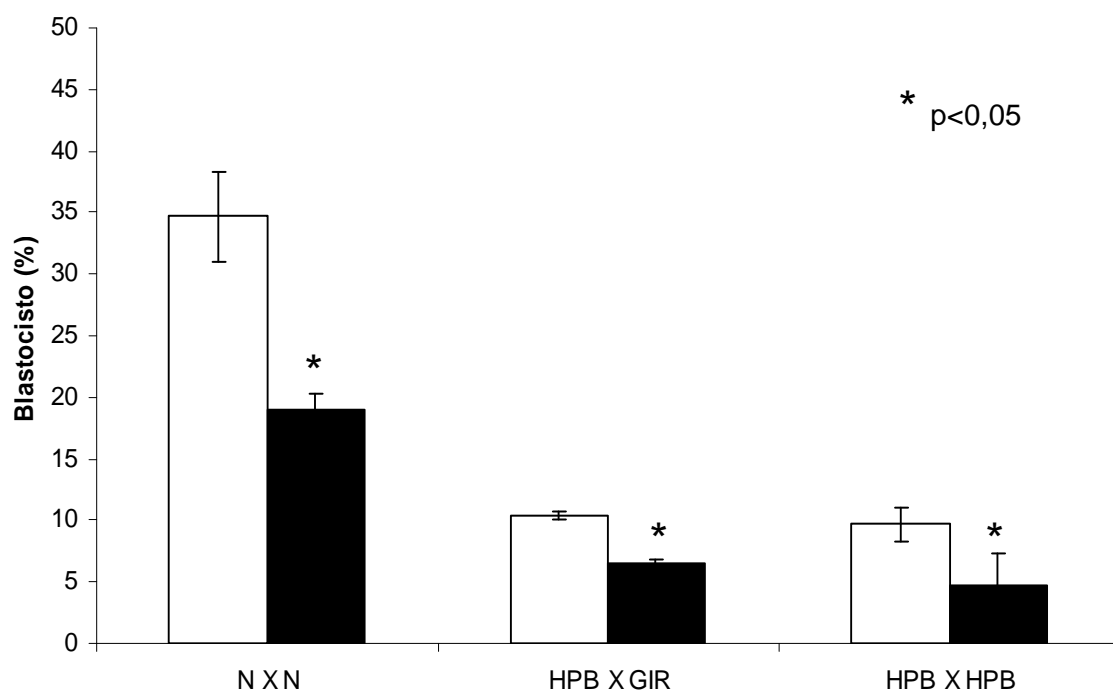
A**B**

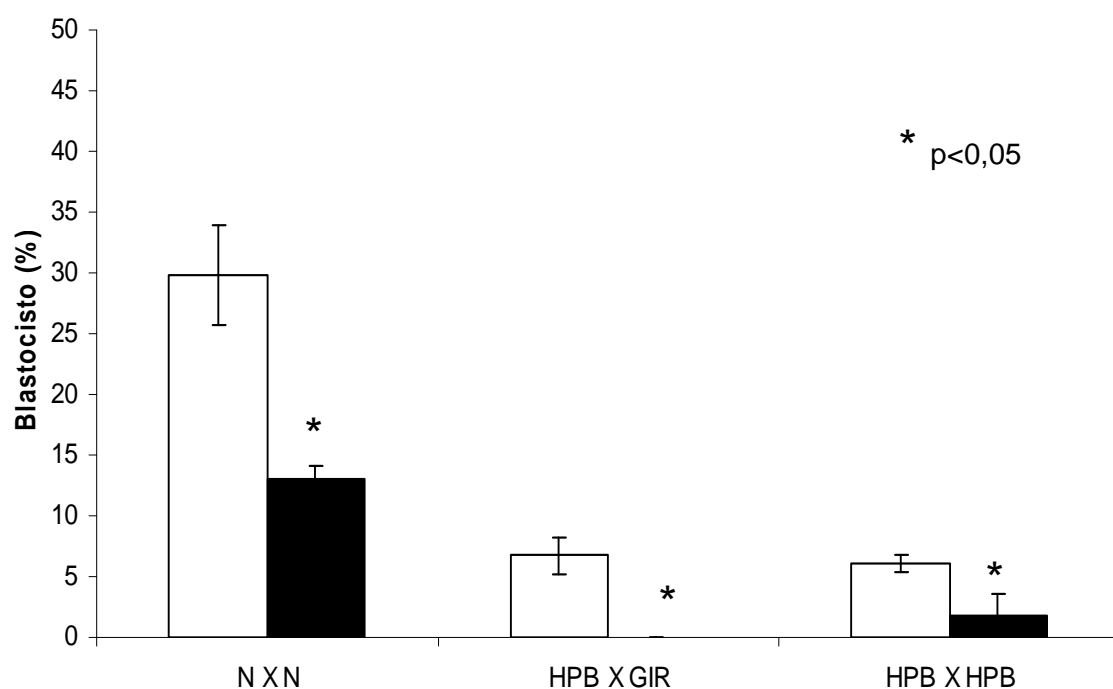
Figura 2. Média (\pm EPM) das taxas de blastocisto dos oócitos de vacas das raças Nelore (N) e Holandesa Preto e Branco (HPB) obtidos 4 horas (A) e 6:30 horas (B) após a coleta dos ovários em abatedouro e fertilizados com sêmen de touros N, Gir (Gir) e HPB, mantidos à 39 °C (em branco) ou submetidos ao ETC (12h, 96hpi, 41 °C) (em preto).



419

420

421

B

422

423

424

425

426

427

Figura 3. Média (\pm EPM) das taxas de blastocisto dos oócitos de vacas das raças Nelore (N) e Holandesa Preto e Branco (HPB) obtidos 4 (em branco) e 6:30 (em preto) horas após a coleta dos ovários em abatedouro e fertilizados com sêmen de touros N, Gir (Gir) e HPB, mantidos à 39 °C (A) ou submetidos ao ETC (B, 12h, 96hpi, 41 °C).

4. Discussão

Os resultados obtidos no primeiro experimento indicaram que não houve influência do ETC no desenvolvimento embrionário dentre todos os cruzamentos testados, entretanto, no segundo experimento os efeitos deletérios do ETC puderam ser evidenciados com a redução nas taxas de blastocisto em todas as raças testadas. Além disso, a influência da raça do touro na resistência embrionária ao ETC não foi evidenciada em ambos os experimentos.

Diferentemente do primeiro, os dados do segundo experimento estão de acordo com a literatura sobre os efeitos deletérios do ETC em raças zebuínas, taurinas e mestiças. Paula Lopes et al. [38] comparando a resistência ao ETC (41 °C, 6h, 96hpi) 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. [27] demonstraram que embriões *Bos taurus* (HPB x An) e mestiços (HPB x N) apresentaram maior sensibilidade ao ETC (41 °C, 12 h, 96hpi) 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. [39] verificaram que a taxa de prenhez em receptoras inovuladas com embriões da raça Nelore submetidos ao ETC (41 °C, 12h, 96hpi) 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 observados nos experimentos 1 e 2 é o fato dos oócitos do experimento 1 terem sido obtidos de vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) com fenótipo predominante HPB, enquanto que no experimento 2 os ovários eram provenientes de vacas taurinas (HPB puras), ou seja, de animais mais sensíveis aos efeitos do ETC. Nas raças taurinas, a maior sensibilidade ao ETC está relacionada a menor adaptação destas raças as condições climáticas onde a temperatura é mais elevada [3]. Prayaga et al. [40] 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 cruzados 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 [41,42], e durante os primeiros estágios de clivagem do desenvolvimento embrionário [21]. Os efeitos do ETC na mortalidade embrionária diminuem com o avanço da prenhez, se tornando mínimos a partir do terceiro dia do estro em vacas [21]. Vários estudos *in vitro* demonstram que os embriões bovinos se tornam mais resistentes ao ETC com o avanço no seu desenvolvimento [21,23,27,33]. De acordo com Edwards & Hansen [33], existem pelo menos duas possibilidades para explicar o porquê os 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 do que embriões com menor

número de 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 adquira mecanismos de termoproteção durante seu desenvolvimento, como por exemplo, as HSPs e Glutathione.

Além disso, como já foi dito anteriormente a capacidade de termotolerância é uma característica influenciada pela raça do animal, sendo que a aquisição de termotolerância embrionária pode ser conferida pelo oócito, pelo espermatozóide ou por ambos como demonstram alguns estudos [2,25-28, 38].

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. No experimento 1 o efeito da raça do touro não foi evidenciada, pois as taxas de blastocisto e blastocisto eclodido não diferiram entre os grupos controle (39 °C) e ETC (41 °C, 96hpi, 12h), 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. Embora no experimento 2 os oócitos utilizados fossem provenientes de vacas HPB puras, não foi evidenciado o efeito da raça do touro, já que as taxas de blastocisto e blastocisto eclodido dos oócitos fertilizados com sêmen de touros zebuino (raça Gir) e taurino (raça HPB) não apresentaram diferenças significativas após o ETC. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Saito et al. [26] que também utilizaram seis touros das raças Gir e HPB para fertilizar oócitos de vacas HPB e não observaram diferenças

significativas nas taxas de blastocisto e blastocisto eclodido entre os touros Gir e HPB. O efeito da raça do touro na sensibilidade embrionária ao ETC também não foi evidenciado por Block et al. [25] que utilizaram sete touros das raças Angus e Brahman na fertilização de oócito HPB submetendo-os ao ETC (96hpi, 41 °C, 6 horas). Por outro lado, Eberhardt et al. [27] 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. [27] 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 [43-45]. Palma & Sinowatz [46] 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 [47,48].

Adicionalmente, existem outros fatores que podem influenciar na viabilidade dos oócitos para produção de embriões *in vitro*, como por exemplo, o intervalo de tempo que os oócitos permanecem dentro dos folículos ovarianos no *post mortem* bem como a temperatura do meio de armazenamento dos ovários nesse período [49]. Os resultados obtidos no experimento 2 demonstraram que os oócitos aspirados 4 horas após o abate dos animais originaram taxas de blastocisto mais elevadas quando comparado ao grupo 6:30 horas. Estes resultados corroboram com os apresentados por Bondin et al. [49], que ao analisarem os intervalos de tempo de 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas após o abate dos animais e a aspiração dos

oócitos, verificaram que o intervalo de tempo de 4 horas apresentava taxas de produção embrionária superiores as obtidas com 2, 6 e 7 horas. Estes autores sugeriram que quando os oócitos são aspirados em intervalos superiores a 4 horas após o abate, pode ocorrer modificações no micro ambiente folicular, resultando em uma menor capacidade de desenvolvimento do oócito.

Embora a PIV tenha sido realizada no mesmo laboratório e nas mesmas condições de maturação e cultivo, as taxas de blastocisto obtidas no experimento 2 (4 a 6 %) foram inferiores aos descritos por Eberhardt et al. [27] (28 a 30%) e Saito et al. [26] (37 a 40%), em oócitos aspirados 6:30 horas após o abate de vacas HPB. Uma possível explicação para estes resultados seria a temperatura de armazenamento dos ovários até sua chegada ao laboratório. Os ovários coletados tanto no experimento 1 como no 2 foram acondicionados em recipientes térmicos contendo solução salina mantida em temperatura de 30 a 37 °C por meio da substituição desta solução por outra aquecida durante o transporte dos ovários. Nos experimentos de Saito et al. [26] e Eberhardt et al. [27] não houve substituição da solução salina, ocorrendo assim, acentuada redução da temperatura dos ovários (<30°C) durante o transporte até o laboratório.

Estudos em bovinos demonstraram que o acondicionamento dos ovários a 20 [50] ou 25 °C [52] por um período de 8 horas após o abate não reduziu as taxas de maturação oocitária e a conseqüente produção de blastocisto quando comparada à temperatura de 37 a 39 °C. Desta forma, é possível que as melhores taxas de blastocisto obtidas por Saito et al. [26] e Eberhardt et al. [27] sejam resultado da manutenção da qualidade oocitária em decorrência da redução na temperatura dos ovários.

Conclui-se que o ETC (41 °C, 12h, 96hpi) influenciou o desenvolvimento de embriões provenientes de oócitos de vacas HPB puras. Entretanto, o mesmo não foi observado em embriões provenientes de oócitos de vacas HPB mestiças. A resistência ao ETC dos embriões produzidos *in vitro*, não foi influenciada pela raça do touro (Gir vs HPB), indicando que o oócito tem maior importância na termotolerância embrionária do que o espermatozóide. Além disso, o intervalo de tempo de 6:30 horas entre o abate dos animais e a aspiração dos oócitos influenciou negativamente o desenvolvimento embrionário.

Agradecimentos

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

5. Referências

- [1] Associação dos Criadores de Nelore do Brasil (ACNB), 2006, www.nelore.org.br.
- [2] Barros CM, Pegorer, MF, Vasconcelos, JL, Eberhardt, BG, Monteiro, FM. Importance of sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. Theriogenology 2006;65: 210 -18.
- [3] Hansen PJ. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. Anim Reprod Sci 2004;82-83: 349-60.

- 576 [4] Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula Lopes FF, al-Katanani YM,
577 Krininger III CE, Chase, CC Jr. Adverse impact of heat stress on embryo
578 production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 2001;55:
579 91-103.
- 580 [5] Allen TE, Pan Y, Haynan R. The effect of feeding on the evaporative heat
581 loss and body temperature in Zebu and Jersey heifers. *J Agric Res* 1963;
582 14:580-93.
- 583 [6] Cartwright TC. Responses of beef cattle to high ambient temperatures. *J*
584 *Anim Sci* 1955;14:350–62.
- 585 [7] Carvalho FA, Lammoglia MA, Simoes MJ, Randel RD. Breed affects
586 thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle
587 subjected to heat stress. *J Anim Sci* 1995;73:3570-73.
- 588 [8] Finch VA. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to
589 production in the tropics. *J Anim Sci* 1986;62:531-42.
- 590 [9] Gaughan JB, Mader TL, Holt SM, Josey MJ, Rowan KJ. Heat tolerance of
591 Boran and Tuli crossbred steers. *J Anim Sci* 1999;77:2398-2405.
- 592 [10] Hammond AC, Chase CC, Jr., Bowers EJ, Olson TA, Randel RD. Heat
593 tolerance in Tuli-, Senepol-, and Brahman-sired F1 Angus heifers in Florida.
594 *J Anim Sci* 1998;76:1568-77.
- 595 [11] Hammond AC, Olson TA, Chase CC, Jr., Bowers EJ, Randel RD, Murphy
596 CN, Vogt DW, Tewolde A. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos*
597 *taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman,
598 Angus, and Hereford cattle in Florida. *J Anim Sci* 1996;74: 295-303.

- 599 [12] McDowell RE, Lee, DHK., Fohrman, MH. The relationship of surface area to
600 heat tolerance in Jersey and Sindhi – Jersey (F1) crossbred cows. J Anim
601 Sci 1953; 12:747-56.
- 602 [13] Johnston JE, Hamblin, FB, Schrader, GT. Factors concerned in the
603 comparative heat tolerance of Jersey, Holstein, and Red Sindhi-Holstein
604 (F1) cattle. J Anim Sci 1958;17:473-79.
- 605 [14] Klibler HH, Brody, S. Environmental physiology with special reference to
606 domestic animals. XIII. Influence of increasing temperature, 40 to 105 °F, on
607 heat production, and cardiorespiratory activities in Brown Swiss and
608 Brahman cows and heifers. Mo Res Bull 1951:473.
- 609 [15] Seif SM, Johnson HD, Lippincott AC. The effects of heat exposure (31 °C)
610 on Zebu and Scottish Highland cattle. Int J Biometeorol 1979;23: 9-14.
- 611 [16] O'Bannon EB, Cornelison, PR, Ragsdale, AC, Brody, S. Relative growth
612 rates at 80 and 50 ° F of Santa Gertrudis, Brahman and Shorthorn heifers. J
613 Anim Sci 1955;14:1187 [abstract].
- 614 [17] Johnson HDJ. Environmental temperature and lactation (with special
615 reference to cattle). Int J Biom 1965;9:103–16.
- 616 [18] Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke
617 RA, Hansel W. High environmental temperature and humidity decrease
618 oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. Theriogenology
619 1998;49: 657-65.
- 620 [19] Skinner JD, Louw GN. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and
621 *Bos taurus* cattle. J Appl Physiol 1966;21:1784-90.

- 622 [20] Thatcher WW, Hansen, PJ. Environment and reproduction. In: Reprod
623 Domest Anim Amesterdan: Elsevier World Animals Science Series 1993;9:
624 433-57.
- 625 [21] Ealy AD, Drost, M, Hansen, PJ. Developmental changes in embryonic
626 resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. J Dairy Sci
627 1993;76: 2899-2905.
- 628 [22] Paula Lopes FF, Chase, CC., Jr. Al-Katanani, YM, Krininger, CE, Rivera,
629 RM, Tekin, S, Majewski, AC, Ocon, OM, Olson, TA, Hansen, PJ. Genetic
630 divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences
631 between breeds developed in temperate versus hot climates in responses
632 of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to
633 increased culture temperatures. Reproduction 2003;125:285-94.
- 634 [23] Barros CM, Monteiro, FM, Mello, DS, Carvalho, LM, Teixeira, AB, Trinca,
635 LA, Freitas, EC. Resistance of *Bos indicus* to heat shock, compared to
636 crossbred or *Bos Taurus*, at early stages of in vitro embryo development.
637 In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTION IN DOMESTIC
638 RUMINANTS, 6th, Scotland, 2002;p.A4.
- 639 [24] Hernández Cerón J, Chase, CC Jr, Hansen, PJ. Differences in heat
640 tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano,
641 and Angus Breeds. J Dairy Sci 2004;87:53-8.
- 642 [25] Block J, Chase CC, Jr., Hansen PJ. Inheritance of resistance of bovine
643 preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal
644 versus paternal contribution. Mol Reprod Dev 2002;63:32-37.
- 645 [26] Saito DY. Estudo da influência da raça do touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*)
646 na resistência de embriões bovinos ao estresse térmico calórico in vitro, no

- 647 estágio inicial de desenvolvimento., Instituto de Biociências. Botucatu:
648 UNESP, 2006;p.42.
- 649 [27] Eberhardt BG, Satrapa RA, Capinzaiki CR, Trinca LA, Barros CM. Influence
650 of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs *Bos taurus taurus*) and the breed
651 of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the
652 resistance of bovine embryos to heat. Anim Reprod Sci 2009;114: 54-61.
- 653 [28] Pegorer MF, Vasconcelos JL, Trinca LA, Hansen PJ, Barros CM. Influence
654 of sire and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy
655 and embryonic loss in lactating Holstein cows during summer heat stress.
656 Theriogenology 2007;67:692-97.
- 657 [29] Paula Lopes FF, Hansen PJ. Heat shock-induced apoptosis in
658 preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated
659 phenomenon. Biol Reprod 2002;66:1169 -77.
- 660 [30] Al-Katanani YM, Hansen PJ. Induced thermotolerance in bovine two-cell
661 embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development.
662 Mol Reprod Dev 2002;62:174-80.
- 663 [31] Biggers BG, Geisert RD, Wetteman RP, Buchanan DS. Effect of heat stress
664 on early embryonic development in the beef cow. J Anim Sci 1987;64:
665 1512-18.
- 666 [32] Ealy AD, Hansen PJ. Induced thermotolerance during early development of
667 murine and bovine embryos. J Cell Physiol 1994;160: 463-68.
- 668 [33] Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and
669 preimplantation embryos to heat shock. Mol Reprod Dev 1997;46:138-45.

- 670 [34] Edwards JL, King WA, Kawarsky SJ, Ealy AD. Responsiveness of early
671 embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and
672 glutathione. *Theriogenology* 2001;55: 209-23.
- 673 [35] Hansen PJ. Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in
674 protection of the mamalian preimplantation embryo from heat shock. *Ann*
675 *Rev Biomed Sci* 1999; 1: 5-29.
- 676 [36] Khurana NK, Niemann, H. Energy metabolism in preimplantation bovine
677 derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 2000;62: 847-56.
- 678 [37] SAS: Statistical Analysis System. A user's guide. SAS Institute C, version
679 9.1.3., 2002/2003.
- 680 [38] Paula Lopes FF, Chase, CC JR., Al-Katanani, YM, Krininger, I CE, Rivera,
681 RM, Tekin, S, Majewski, I AC, Ocon, OM, Olson, TA, Hansen, PJ. Breed
682 differences in resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock.
683 *Theriogenology* 2001;55: 436 [Abstract] .
- 684 [39] Sartorelli ES. Influência do estresse térmico calórico na taxa de apoptose
685 de embriões bovinos (zebuínos vs taurinos) produzidos in vitro e na
686 capacidade dos mesmos originarem gestações., Faculdade de Medicina
687 Veterinária e Zootecnia (FMVZ). Botucatu: Universidade Estadual Paulista
688 Júlio de Mesquita Filho (UNESP), 2007, Tese (Doutorado em Medicina
689 Veterinária).
- 690 [40] Prayaga KC. Evaluation of beef cattle genotypes and estimation of direct
691 and maternal genetic effects in a tropical environment. 2. Adaptive and
692 temperament traits. *Australian Journal of Agricultural Research* 2003;54:
693 1027-38.

- 694 [41] Al-Katanani YM HP. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos
695 and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. Mol
696 Reprod Dev 2001;62: 174-80.
- 697 [42] Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Influence of summer heat stress on
698 pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or
699 artificial insemination. Theriogenology 1989;31: 765-78.
- 700 [43] Lacandra GM, Dell'Aguila, ME, Fusco, S, Sciorci, RL, Perrone, P, Minoia,
701 P. *In vitro* fertility test of bull semen. In: The 13th International Congress on
702 Animal Reproduction, Sydney, 1993;656-58.
- 703 [44] Lazzari G, Galli, C. Bull effect on the development of in vitro matured and
704 fertilized bovine oocytes cultured into ligated oviduct of the sheep. n: The
705 9th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, Lyon;
706 1993;224[abstract].
- 707 [45] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone
708 WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen.
709 Theriogenology 1986;25: 591-600.
- 710 [46] Palma GA, Sinowatz, F. Male and female effects on the in vitro production
711 of bovine embryos. Anat Histol Embryol 2004; 33:257-62.
- 712 [47] Hillery FL PJ, First NL. . Bull specific effect on fertilization and embryo
713 development in vitro Theriogenology 1990;33: 249 [abstract].
- 714 [48] Shi DS LK, Gordon I. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and
715 their subsequent development in vitro. Theriogenology 1990;33:324
716 [abstract].

- 717 [49] Blondin P, Coenen, K, Guilbault, LA, Sirardl, MA. In vitro production of
718 bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation.
719 Theriogenology 1997;47:1061-75.
- 720 [50] Abe S, Shioya, Y. Effects of temperature and duration of preservation of
721 bovine ovaries in physiological saline on the development of bovine
722 embryos derived from follicular oocytes matured and fertilized *in vitro*. Anim
723 Sci Technol Jpn 1996; 67:633-38.
- 724 [51] Nakao H, Nakatsuji N. Effect of storage conditions of bovine ovaries and
725 oocytes on the success rate of in vitro fertilization and culture. J Reprod
726 Dev 1992;38:11-13.
- 727 [52] Yang NS, Lu, K.H. and Gordon, I. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC)
728 of bovine oocytes from stored ovaries. Theriogenology 1990;33: 352
729 [abstract].
- 730 [53] Andrade ER, Amorim, CA, Matos, MHT, Rodrigues, APR, Silva, JRV, Dode,
731 MAN, Figueiredo, JR. Evaluation of saline and coconut water solutions in
732 the preservation of sheep preantral follicles in situ. Small Ruminant
733 Research 2002;43:235-43.
- 734 [54] Carvalho FC, Lucci CM, Silva JR, Andrade ER, Bao SN, Figueiredo JR.
735 Effect of Braun-Collins and saline solutions at different temperatures and
736 incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ.
737 Anim Reprod Sci 2001;66:195-208.
- 738 [55] Ferreira MA, Brasil AF, Silva JR, Andrade ER, Rodrigues AP, Figueiredo
739 JR. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian
740 preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid
741 supplementation. Theriogenology 2001;55: 1607-17.

ANEXO 1

Taxas de clivagem, mórula, blastocisto e blastocisto eclodido de oócitos de vacas Nelore (N) fertilizados com sêmen de touros Nelore, Angus, Brahman, Holandês Preto e Branco (HPB) e Gir testados.

Raças de touros	Oócitos Nelore (n)	Clivagem (%)	Mórula (%)	Blastocisto (%)	Blastocisto eclodido (%)
Nelore 1	62	77,4	64,5	38,7	22,5
Nelore 2	57	78,9	66,6	29,8	15,7
Nelore 3 +	62	82,2	72,5	41,0	25,8
Nelore 4	60	86,6	70,0	26,6	13,3
Nelore 5	61	72,1	63,9	27,8	16,3
Nelore 6	56	89,2	80,3	25,0	16,0
Nelore 7 ++	122	57,3	26,2	13,9	3,2
Nelore 8 ++	118	56,7	22,8	7,60	0,85
Nelore 9 ++	120	54,1	19,1	10,0	0
Angus 1	50	76,0	60,0	26,0	10,0
Angus 2	49	73,4	51,0	28,5	14,2
Angus 3	47	72,3	51,0	23,4	4,8
Angus 4	52	84,6	55,7	26,9	11,5
Angus 5	42	66,6	61,9	30,9	11,9
Angus 6	52	71,1	51,9	25,0	11,5
Angus 7 ++	125	51,2	29,6	8,0	0
Angus 8 ++	112	51,7	22,3	8,0	0
Angus 9 ++	118	51,7	26,2	11,0	0,8
Brahman 1	58	77,6	55,2	31,0	12,0
Brahman 2	62	79,0	61,3	32,2	14,5
Brahman 3	66	78,8	59,0	37,9	19,7
Brahman 4	58	81,0	58,6	32,7	17,2
Brahman 5	60	85,0	70,0	25,0	15,0
Brahman 6	62	74,2	48,4	27,4	14,5
Brahman 7 ++	102	67,6	36,3	11,7	3,9
Brahman 8	58	77,6	55,2	31,0	12,0
HPB 1	54	66,7	40,7	24,0	9,30
HPB 2	58	72,4	60,3	25,8	13,8
HPB 3	54	62,9	42,6	24,0	7,4
HPB 4	60	68,3	60,0	25,0	13,3
HPB 5	51	66,7	56,8	29,4	13,7
HPB 6	53	75,5	62,2	28,3	15,1
HPB 7 ++	93	73,1	31,20	8,6	1,0
GIR 1	50	78,0	56,0	30,0	12,0
GIR 2	58	75,8	62,0	31,0	17,2
GIR 3	48	68,7	50,0	27,1	12,5
GIR 4	52	73,0	51,9	25,0	13,4
GIR 5	46	73,9	54,3	26,1	15,2
GIR 6	44	72,7	54,5	29,5	11,3
GIR 7 ++	92	83,7	33,7	14,1	4,3

*Touro controle (taxa de blastocisto \geq a 25 %)

**Touros com taxa de blastocisto < 25%