



Produção *in vitro* de embriões ovinos a partir de oócitos coletados durante os períodos seco e chuvoso

[*In vitro* embryo production from oocytes collected during dry and rainy periods in sheep]

FQG Bezerra, JCF Silva, PGC Silva, LF Cantanhêde, SRL Basto, LM Freitas Neto, MT Moura, PF Lima, MAL Oliveira*

Laboratório de Biotecnologia aplicada à Reprodução Animal. Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE, Recife. Brasil.

Resumo

Objetivou-se determinar o efeito dos períodos seco (Julho a Janeiro) e chuvoso (Fevereiro a Junho) sobre a produção *in vitro* de embriões ovinos. Os ovários foram coletados em abatedouro e transportados ao laboratório em recipiente térmico contendo solução fisiológica aquecida a 38 °C. Os ovócitos foram recuperados de folículos medindo 2 a 6 mm e selecionados com base na sua morfologia. Utilizou-se 1231 ovócitos na estação seca e 1252 na chuvosa em 12 réplicas, os quais foram submetidos à maturação *in vitro*, fecundação *in vitro* e cultivo *in vitro* no mesmo ambiente atmosférico. As taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário até os estádios de 8 a 16 células, mórula e blastocisto foram avaliadas, respectivamente, no 3º, 4º, 5º e 8º dia após a fecundação *in vitro*. Os blastocistos foram avaliados quanto à incidência de apoptose determinada pela fragmentação do DNA. A taxa de ovócitos viáveis para a fecundação *in vitro*, clivagem e número de embriões no estágio entre 8 e 16 células foi maior ($P < 0,05$) durante o período chuvoso. No entanto, as taxas de maturação *in vitro*, de mórula, de blastocistos e de apoptose não diferiram ($P > 0,05$) entre os períodos. Os resultados permitem concluir que não existe influência climática sobre a maturação *in vitro* de ovócitos, bem como sobre a produção *in vitro* de embriões da espécie ovina.

Palavras-chave: Complexos *cumulus* oophorus, clima, estresse térmico, apoptose.

Abstract

The work was aimed to determine the effect of dry (July to January) and rainy (February to June) periods on *in vitro* embryo production in sheep. Ovaries were collected at a slaughterhouse and transported to the laboratory in a thermal container with physiological saline at 38 °C. Oocytes were retrieved from 2 to 6 mm follicles and selected based upon their morphology. A total of 1231 oocytes were used during the dry period and 1252 oocytes used during the rainy period in 12 replicates, which were submitted to *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture under similar atmospheric conditions. The cleavage rate, embryonic development to the 8-16 cell, morulae and blastocyst stages were recorded on 3rd, 4th, 5th and 8th day after *in vitro* fertilization. Blastocysts were evaluated for the incidence of apoptosis determined by DNA fragmentation. The rate of viable oocytes for *in vitro* fertilization, cleavage and number of 8-16 cell embryos was higher ($P < 0.05$) during the rainy season. However, the rates of *in vitro* maturation, morulae, blastocyst and apoptosis rates did not differ ($P > 0.05$) between periods. The results allow the conclusion that the period of the year does not affect oocyte maturation and *in vitro* embryo production in sheep.

Key words: *Cumulus*-oocyte complexes, weather, heat stress, apoptosis.

Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões permite acelerar o melhoramento

genético devido o aumento do número de descendentes de uma fêmea com alto mérito zootécnico (SIMPLICÍO et al., 2007). Contudo, a qualidade dos embriões

*Autor para correspondência/Corresponding author: Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171-900.

E-mail: maloufrpe@uol.com.br

Recebido em: 15 de agosto de 2014.

Aceito em: 15 de setembro de 2014.

PIV permanece inferior àquela dos produzidos *in vivo* em consequência do menor número de células, maior acúmulo de lipídeos, alterações cromossômicas, transcricionais e epigenéticas, além de outros fatores, como influência do sistema de cultivo *in vitro* (LONERGAN et al., 2006; LAZZARI et al., 2010).

A variabilidade qualitativa dos gametas pode interferir na quantidade e qualidade dos embriões PIV em decorrência de fatores genéticos e ambientais. O efeito negativo de fatores ambientais, como estresse térmico calórico sobre o ovócito e o embrião no período de pré-implantação foi anteriormente descrito por DUTT (1963) e AL-KATANANI et al. (2002). Todavia, na espécie ovina o efeito desse tipo de estresse sobre o ovócito permanece pouco elucidado (OZAWA et al., 2005), embora já tenha sido descrito que o embrião no estágio inicial de desenvolvimento é severamente afetado pelo estresse térmico calórico (EALY et al., 1993).

O fator ambiental também interfere diretamente sobre a nutrição das doadoras de ovócitos e exerce, mesmo que indiretamente, influência sobre a eficiência da PIV de embriões, ressaltando-se que tanto a restrição alimentar, quanto a oferta excessiva de alimentos reduz a competência dos ovócitos (VÁZQUEZ et al., 2010; GRAZUL-BILSKA et al., 2012). A produção de calor endógeno nos ruminantes é também influenciada pela quantidade e qualidade do alimento, podendo reduzir a ingestão de matéria seca e induzir balanço energético negativo com consequente deficiência nutricional que afeta a reprodução (BACCARI JÚNIOR, 2001).

A Região Semiárida do Nordeste brasileiro é marcada pelos períodos seco e chuvoso. Durante o período chuvoso, os ovinos possuem dieta com alto teor nutritivo e em quantidade satisfatória devido a abundância e diversidade da vegetação forrageira da Caatinga, sendo necessária apenas a suplementação mineral. Por outro lado, no período seco a oferta de alimento reduz em quantidade e qualidade, frequentemente abaixo das necessidades

fisiológicas do animal, em especial nas categorias de maior exigência nutricional, como matrizes prenhes e/ou lactantes, bem como animais jovens em fase de crescimento (CAVALCANTE et al., 2005).

A incidência de apoptose é um critério de avaliação da qualidade dos embriões PIV (BYRNE et al., 1999), por isso, a determinação da morte celular programada em embriões após o estresse térmico ou outra variação ambiental pode ser uma alternativa para identificar fatores que influenciam o desempenho reprodutivo de ovinos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (WOLFENSON et al., 1995).

Com esse estudo objetivou-se determinar os efeitos indiretos do clima, seco e chuvoso, sobre a competência ovocitária durante a maturação *in vitro* e o consequente impacto desses efeitos sobre a PIV de embriões na espécie ovina.

Material e Métodos

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA) ou conforme descrito abaixo.

Utilizou-se 148 ovelhas sem raça definida no período seco e 136 no chuvoso. Os animais, com idade entre 12 e 48 meses e escore de condição corporal 3, segundo classificação de GONZALEZ-STAGNARO (1991), eram criados de forma extensiva e sem suplementação alimentar na Região do Semiárido do Estado de Pernambuco (latitude 8° 55' 28" de S, longitude 35° 07'48" e 36° 42'10" W). Esses animais foram transportados para a cidade de Igarassu, situada na Região Metropolitana da cidade do Recife (latitude 08° 03' 14" S, longitude 34° 52' 52" W) para serem abatidos na empresa Suimax.

O clima da referida região é quente, com classificação BSH proposta por KOPPEN-GEIGER (1928). A temperatura média anual é da ordem de 24 °C e a taxa pluviométrica média anual da região é de 465 mm. No período seco, Julho a Janeiro, a pluviosidade média mensal é de 15 mm e no chuvoso, fevereiro a junho, é de 72 mm, ocorrendo maior pluviosidade entre os meses de março e abril. Os anos de 2007 e

2008 foram considerados típicos para a região.

Os ovários foram coletados no abatedouro e transportados até o laboratório em solução fisiológica contendo 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina a 30 °C, no tempo máximo de uma hora. Em seguida foram lavados e fatiados (“slicing”) para recuperação dos complexos *cumulus oophorus* (CCOs), segundo BEZERRA et al. (2014). O fatiamento foi realizado em placa de Petri contendo meio de colheita TALP (MC) constituído de 8,0 mg de bicarbonato de sódio, 45,0 mg de glicose, 5,6 mM de piruvato de sódio, 11,9 mg de HEPES (Sigma, H-3375), 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina (Sigma, G-1264) e 20,0 mg de álcool polivinílico (PVA).

Os CCOs foram lavados no MC por três vezes e classificados conforme morfologia recomendada por Gonçalves et al. (2008). Em seguida, grupos de 20 a 25 CCOs foram maturados em gotas de 100 μL no meio TCM-199 (Sigma, M-2520) suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de piruvato de sódio, 2,6 mg mL^{-1} de bicarbonato de sódio, 10% de SFB (GiBCO), 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH/LH (Pluset[®]) e 1 mg mL^{-1} de PVA sob óleo de parafina, em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 a 39 °C durante 24 horas.

Antes da exposição aos espermatozoides, os ovócitos maturados foram selecionados quanto à expansão das células do *cumulus* e lavados em meio Fert-TALP. Posteriormente, grupos de 25 ovócitos foram transferidos para gotas de 100 μL do meio Fert-TALP sob óleo de parafina, onde foi depositada a suspensão espermática na concentração final de 2×10^6 espermatozoides mL^{-1} durante o período de incubação de 18 horas. Utilizou-se sêmen fresco de reprodutor com fertilidade comprovada à FIV, o qual foi submetido a técnica de migração espermática (“swim-up”), em meio Fert-TALP com 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de heparina (Sigma, H-0777), para do obtenção pellet espermático, conforme descrito por PARRISH et al. (1985).

Os zigotos foram desnudados no agitador mecânico Vortex[®] a 2000 rpm em meio “Synthetic oviduct fluid” modificado (mSOF), segundo TERVIT et al. (1972), durante dois minutos para remoção das células do *cumulus oophorus* e verificar a clivagem. Grupos de 25 estruturas foram transferidas para gotas de 100 μL do meio mSOF suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), sob óleo de parafina. Essas estruturas foram acondicionadas em estufa contendo atmosfera úmida (5% de CO_2 , 5% O_2 e 90% N_2) a 39 °C, de acordo com BEZERRA et al. (2014). A taxa de clivagem foi determinada no 3º dia (D3) e o percentual de embriões que desenvolveram até os estádios entre 8 e 16 células, mórula e blastocisto foi determinado, respectivamente, no 4º (D4), 5º (D5) e 8º dia (D8) após a fecundação.

Os blastocistos obtidos no D8 foram avaliados quanto à presença de células apoptóticas pela incidência de fragmentação do DNA. Esta avaliação foi realizada através do ensaio “terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling” (TUNEL) (Roche, R-1684795910), previamente utilizado por PAULA-LOPES e HANSEN (2002a), bem como ROTH e HANSEN (2004). As amostras foram lavadas três vezes em “Phosphate-Buffered Saline” (PBS) contendo 1 mg mL^{-1} de Polivinilpirrolidona (PBS-PVP) e incubados em meio de permeabilização (0,5% de Triton X-100 contendo 0,1% de citrato de sódio) por uma hora. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes em PBS-PVP e incubadas em 15 μL da mistura de TUNEL (PBS/reagente TUNEL) por uma hora a 37 °C. Em seguida lavadas em PBS-PVP, incubadas com o corante DNA específico DAPI por 15 minutos, lavadas em PBS-PVP, transferidas para lâminas cobertas com lamínula. As avaliações dos embriões para apoptose e contagem do número de núcleos foram realizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 1000x, conforme PAULA-LOPES e HANSEN (2002ab).

Os dados foram avaliados utilizando a análise de variância pelo método dos

quadrados mínimos. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão (análise de variância entre grupos). Foram também consideradas as medidas tratadas em percentuais. Inicialmente, foi realizada uma comparação de variâncias, seguida do teste *F* para variâncias utilizando o programa SAS versão 9.1 (2003) ao nível de significância 5% ($P < 0,05$). Depois um teste *t* para comparação de médias, no nível de significância 5%, para variâncias equivalentes ou variâncias distintas, conforme o que foi verificado no teste *F* para variâncias, condorme SAMPAIO (2007).

Resultados

O número total de ovócitos coletados foi de 1231 no período seco e 1252 no chuvoso, não havendo diferença ($P > 0,05$) entre as médias dos ovócitos recuperados por ovário (Tabela 1). As médias da maturação *in vitro* no período chuvoso foram semelhantes ($P > 0,05$) as obtida no período seco. Os valores médios dos ovócitos fecundados *in vitro* apresentaram diferença ($P < 0,05$) quando comparou-se os períodos seco e chuvoso.

Tabela 1. Média e desvio padrão concernentes a recuperação de ovócitos por ovário, maturação e fecundação *in vitro* na espécie ovina

Variáveis	Período climático	
	Seco ($\bar{x} \pm s$)	Chuvoso ($\bar{x} \pm s$)
Número de Ovários	295	271
Ovócitos recuperados por ovário	4,17 \pm 0,33 ^a	4,62 \pm 0,51 ^a
Maturação <i>in vitro</i> *	55,16 \pm 5,60 ^a	57,16 \pm 7,38 ^a
Fecundação <i>in vitro</i> (18h)**	29,33 \pm 3,96 ^a	30,91 \pm 4,31 ^b

Letras minúsculas na mesma linha indica diferença ($P < 0,05$) pelo Teste *t*. \bar{x} = média, s = desvio padrão. *Ovócitos selecionados para maturação *in vitro*. **Ovócitos maturados com *cumulus* expandido foram selecionados para fecundação *in vitro*.

Os valores médios de clivagem e de embriões com 8 a 16 células foi superior ($P < 0,05$) no período chuvoso, entretanto, o desenvolvimento embrionário até os

estádios de mórula e de blastocistos foi semelhante ($P > 0,05$) entre os períodos climáticos (Tabela 2).

Tabela 2. Média e desvio padrão concernentes ao número de ovócitos e ao desenvolvimento de embriões PIV da espécie ovina

Variáveis	Período climático	
	Seco ($\bar{x} \pm s$)	Chuvoso ($\bar{x} \pm s$)
Número de Ovócitos	1231	1252
Clivagem (D3)	24,91 \pm 1,72 ^b	25,83 \pm 1,52 ^a
Embrião - 8 a 16 células (D4)	22,58 \pm 1,44 ^b	23,25 \pm 1,13 ^a
Mórula (D5)	21,08 \pm 1,24 ^b	21,25 \pm 1,42 ^b
Blastocisto (D8)	9,16 \pm 1,40 ^b	9,91 \pm 1,31 ^b

Letras minúsculas na mesma linha indica diferença ($P < 0,05$) pelo Teste *t*. \bar{x} = média, s = desvio padrão.

Quanto à qualidade dos embriões, tanto no período seco quanto no chuvoso, não foi observada diferença ($P > 0,05$) na

taxa de blastocistos que apresentavam células apoptóticas (Figura 1).

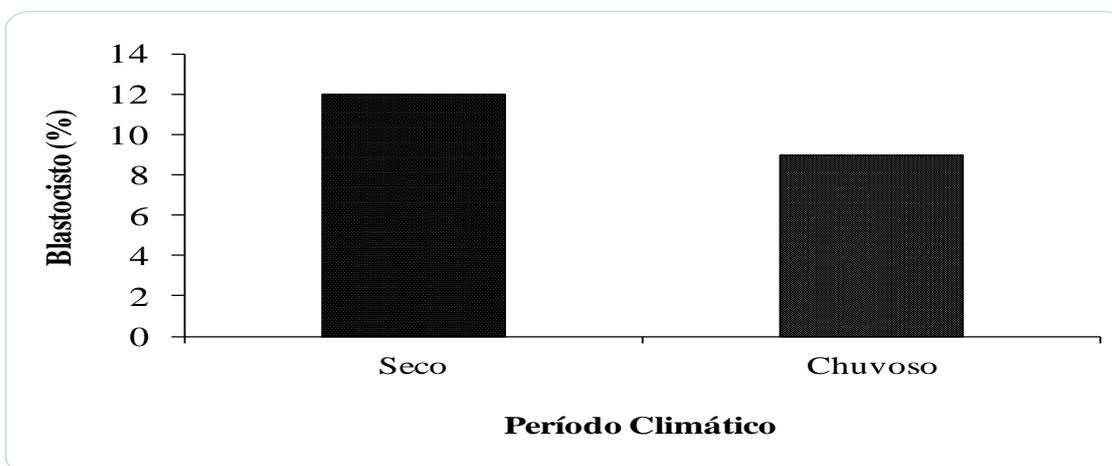


Figura 1. Efeito dos períodos seco e chuvoso sobre a incidência de apoptose em blastocistos ovinos produzidos *in vitro* pelo teste TUNEL.

Discussão

A aquisição da competência dos ovócitos que ocorre durante a foliculogênese é influenciada pela idade da doadora, tamanho dos folículos, dentre outros fatores (MERMILLOD et al., 1999). Apesar da natureza heterogênea dos ovócitos imaturos usados para a PIV, sua maturação e posterior desenvolvimento embrionário também podem ser influenciados pelas condições de cultivo *in vitro* (SIMPLÍCIO et al., 2007). Embora exista uma extensa literatura buscando melhorar os protocolos de PIV de embriões, menor atenção tem sido dada para a identificação dos fatores ambientais que afetam sua eficiência na espécie ovina.

No período chuvoso do semiárido nordestino existe maior abundância de alimentos (ZERON et al., 2001). Este fato pode estar relacionado com os resultados registrados para esse período, quando foram obtidos ovócitos de melhor qualidade que proporcionaram resultados mais significativos de clivagem e de embriões que desenvolveram até 16 células. No período seco, que contempla os meses de maior estiagem do ano, as pastagens e a vegetação da Caatinga apresentam baixo

valor nutritivo e menor oferta de alimento associado ao estresse térmico (SIMPLÍCIO et al., 2007). Apesar disso, os estádios de mórula e de blastocisto mantiveram-se inalterados, independentemente do período climático avaliado.

A ocorrência de apoptose, adotada como critério de avaliação da qualidade embrionária, tem sido amplamente estudada por ser um mecanismo fisiológico na embriogênese associada a qualidade dos embriões, tanto nos produzidos *in vivo* quanto *in vitro* (BETTS e KING, 2001; RUBIO POMAR et al., 2005). Entretanto, a apoptose nos embriões no estágio de blastocisto ocorreu de forma similar nos períodos seco e chuvoso, resultado que corroborou a prévia observação de BEZERRA et al. (2014), ao mencionarem que a sua incidência em ovócitos, avaliada pela atividade de *Caspases* e fragmentação de DNA, não foi afetada, independentemente do período do ano.

Para avaliação da condição de estresse térmico foi determinado o índice de temperatura e umidade (ITU) no semiárido do Estado de Pernambuco durante a pesquisa. O valor de ITU determina a ocorrência de estresse térmico quando

atinge valores acima de 70 (DU PREEZ et al. durante o período chuvoso, a média do ITU observada foi de 68 e de 75 no seco, caracterizando a condição de estresse térmico que os animais desse experimento foram submetidos. Sabidamente, um fator relevante a ser considerado na PIV de embriões é a condição do cultivo *in vitro* que pode alterar o metabolismo embrionário e interferir na qualidade dos embriões, conforme foi verificado por RIZOS et al. (2002). Esse relato corroborou os achados desse trabalho tendo em vista que os embriões menos desenvolvidos apresentaram médias mais expressivas do que aqueles no estágio de blastocisto.

Segundo OLIVEIRA et al. (1997), a cinética do desenvolvimento embrionário, em condições artificiais, é maior naqueles em estádios iniciais. Esse fato foi também verificado por THOMPSON (2000) e FONTANIER-RAZZAQ et al. (2001), ao relatarem que, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, os embriões de ruminantes apresentam desenvolvimento semelhante nos estádios iniciais. Por outro lado, descrevem que a partir desse momento, o desenvolvimento *in vitro* apresenta-se mais lento.

Os resultados sugerem que a PIV pode ser utilizada durante qualquer período do ano, mesmo em condições de grande variação na oferta de alimento e de estresse térmico. Existe a possibilidade de que outros fatores ambientais, como luminosidade e umidade, possam ter também influenciado na eficiência da PIV.

Conclusão

Os dados obtidos nesse trabalho permitem concluir que a qualidade e a quantidade de embriões produzidos *in vitro* independe do período climático, seco ou chuvoso.

O trabalho foi submetido e aprovado pela CEUA-UFRPE sob licença nº 009/2012, obedecendo às normas do comitê de ética e experimentação animal.

Referências

AL-KATANANI, Y.M. et al. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte

al., 1990). Segundo SILVA et al. (2009), competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.2, p.390-6, 2002.

BACCARI JÚNIOR, F. **Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2001. 142p.
BETTS, D.H.; KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.171-191, 2001.

BEZERRA, F.Q.G. et al. Efeito dos períodos seco e chuvoso sobre a maturação nuclear e incidência de apoptose em oócitos ovinos. **Medicina Veterinária**, Recife, v.8, n.1, p.20-30, 2014.

BYRNE, A.T. et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using tunel. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.117, n.1, p.97-105, 1999.

CAVALCANTE, A.C.R. et al. **Sistema de produção de caprinos e ovinos de corte para o nordeste brasileiro**. Embrapa Caprinos Sistemas de Produção. 2005. Disponível: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/CaprinoseOvinosdeCorte/CaprinosOvinosCorteNEBrasil/alimentacao.htm>>.

Acesso em: 10 jul. 2014.

DU PREEZ, J.D. et al. Heat stress in dairy cattle and other livestock under Southern African conditions. II. Identification of áreas of potencial heat stress during summer by means of observed true and predicted temperature-humidity index values. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, Pretoria, v.57, p.183-187, 1990.

DUTT, R.H. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. **Journal of Animal Science**, Colchester, v.22, p.713-9, 1963.

EALY, A.D. et al. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.10, p.2899-905, 1993.

FONTANIER-RAZZAQ, N. et al. DNA damaging agents increase gadd153 (CHOP-10) messenger RNA levels in bovine preimplantation embryos cultured *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Madison, v.64, n.5, p.1386-1391, 2001.

GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D. et al. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2008. p.261-92.

GONZALEZ-STAGNARO, C. Control y manejo de los factores que afectan al

- comportamiento reproductivo de los pequeños rumiante em el mediotropical. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NUCLEAR AND RELATED TECHIQUES IN ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH. 1991. Viena. **Proceedings...** Viena: Intertation Atomic Energy Agency, 1991. p.405-421.
- GRAZUL-BILSKA, A.T. et al. Overfeeding and underfeeding have detrimental effects on oocyte quality measured by *in vitro* fertilization and early development in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v.43, n.4, p.289-98, 2012.
- KÖPPEN, W.; GEIGER, R. *Klimate der Erde*. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928. Wall-map 150cmx200cm.
- LAZZARI, G. et al. Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus *in vitro* culture for different domestic species. **Theriogenology**, Los Altos, v.73, n.6, p.748-57, 2010.
- LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.65, n.1, p.137-52, 2006.
- MERMILLOD, P. et al. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.54, p.449-60, 1999.
- OLIVEIRA, M.A.L. et al. Cocultura de embriões *Mus musculus* com monocamada de células de linhagem primária e contínua em um sistema sem fluxo externo de CO₂. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.123-126, 1997.
- OZAWA, M. et al. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. **Reproduction**, v.129, n.5, p.621-30, 2005.
- PARRISH, J.J. et al. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, v.24, n.5, p.537-49, 1985.
- PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Apoptosis is an adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, Orlando, v.295, n.1, p.37-42, 2002a.
- PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat Shock-Induced Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos is a Developmentally Regulated Phenomenon. **Biology of Reproduction**, Madison, v.66, n.4, p.1169-77, 2002b.
- RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction Development**, New York, v.61, n.2, p.234- 248, 2002.
- ROTH, Z.; Hansen PJ. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, Madison, v.71, n.6, p.1898-906, 2004.
- RUBIO, P. et al. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. **Theriogenology**, Los Altos, v.63, p.2254–2268, 2005.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**. 3ª ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2007, p.264.
- SILVA, T.G.F. et al. Impactos das mudanças climáticas na produção leiteira do estado de Pernambuco: análise para cenários B2 e A2 do IPCC. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v.24, n.4, p.489-501, 2009.
- SIMPLÍCIO, A.A. et al. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.234-46, 2007.
- TERVIT, H.R. et al. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.30, n.3, p.493-7, 1972.
- THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos -- a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.263-275, 2000.
- VÁZQUEZ, M.I. et al. Undernutrition and exogenous melatonin can affect the *in vitro* developmental competence of ovine oocytes on a seasonal basis. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.45, n.4, p.677-84, 2010.
- WOLFENSON, D. et al. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v.52, n.2, p.1106-13, 1995.
- ZERON, Y. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v.121, n.3, p.447-54, 2001.