

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JOÃO JOSÉ FERREIRA EVANGELISTA

**AÇÃO FARMACOLÓGICA DAS VITAMINAS A & E NA PRODUÇÃO DE
OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS**

FORTALEZA

2010

JOÃO JOSÉ FERREIRA EVANGELISTA

**AÇÃO FARMACOLÓGICA DAS VITAMINAS A & E NA PRODUÇÃO DE
OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Co-Orientador: Prof. Dr. Rômulo José Vieira

FORTALEZA

2010

E93a Evangelista, João José Ferreira

Ação farmacológica das vitaminas A & E na produção de oócitos e embriões bovinos / João José Ferreira Evangelista. – Fortaleza, 2010.

107 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Recuperação de Oócitos 2. Desenvolvimento Embrionário
3. Vitamina A 4. Vitamina E I. Moraes, Maria Elisabete Amaral de (Orient.) II. Título.

CDD: 615.1

JOÃO JOSÉ FERREIRA EVANGELISTA

**AÇÃO FARMACOLÓGICA DAS VITAMINAS A & E NA PRODUÇÃO DE
OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO***

Aprovada em: 07/01/2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes – Orientadora
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Rômulo José Vieira - Co-Orientador
Universidade Federal do Piauí – UFPI
Faculdade Integral Diferencial - FACID

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

✚ A Deus, por estar comigo em todos os momentos.

✚ Ao meu Pai e Mestre Sérgio Evangelista, um grande exemplo de homem íntegro e um grande profissional, obrigado por estar do meu lado e vibrando por mais esta nova conquista.

✚ A minha Mãe Zélia, guerreira em todos os sentidos, obrigado por me ajudar e estar do meu lado nas minhas derrotas e comemorar sempre os momentos de alegrias.

✚ A minha esposa Janaina, que está e sempre estará ao meu lado, obrigado por me fazer me erguer das minhas derrotas e vibrar comigo nos momentos de alegrias e conquistas.

✚ Ao meu filhão João Filho pela demonstração de uma Vida cheia de energia, e que tudo na vida vale a pena ser vivido, peço desculpas pela ausência em momentos difíceis e importantes, pelas brigas incontidas e desnecessárias, mas às vezes necessárias, obrigado por você existir!

✚ Aos meus irmãos Serginho, Neusalídia, Patrícia e Ricardo, obrigado pela motivação e companheirismo, mesmo nos momentos de ausência.

✚ Às minhas queridas Avós Lídia (*in memorian*) e Neusa (*in memorian*), obrigado por estar olhando por mim e vibrando por mais esta nova conquista.

✚ Aos meus queridos Avôs João Evangelista (*in memorian*) e José Ferreira, dois grandes exemplos de vida que sempre estarão presentes no meu caminho profissional e nas minhas conquistas.

✚ Ao meu Sogro Chico Monteiro, pelo exemplo de vida e um grande profissional que lutou pela vida.

✚ A minha Sogra Helena Serra Azul, sempre presente e prestativa nos momentos mais oportunos, pelo exemplo de bondade e generosidade.

✚ Professora Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes, pela orientação desta Dissertação, obrigado pela paciência e disponibilidade sempre em me ajudar em todos os momentos, que transcende a atividade didática profissional.

✚ Ao professor Dr. Rômulo José Vieira, pela co-orientação desta dissertação e pela oportunidade que foi me dada para conhecer um grande profissional na área da Veterinária.

✚ À Embriotec Reprodução Animal Ltda, aos profissionais e amigos, Luiz Antônio Abadia, Mara Emília Noletto de Carvalho Abadia, Alexandre Sardinha Carvahêdo, Emerson Martins Soares e Waldyr Velloso de Almeida Filho pela disponibilidade em ceder as instalações e proporcionarem condições necessárias para a execução desta dissertação.

✚ Ao professor Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura, pela contribuição na realização deste projeto com seus conhecimentos e amizade.

✚ Ao Dr. Carlos Eduardo Azevedo Souza, pelo préstimo apoio na realização deste projeto e pelo prazer desta nova amizade.

✚ Ao Dr. Assis Roberto de Bem (*in memorian*), pelo seu exemplo de vida dedico a minha eterna gratidão aos conhecimentos recebidos para minha vida pessoal e profissional.

✚ Ao amigo Regivaldo Vieira de Souza, por sempre participar de momentos importantes na minha vida profissional.

✚ A todos os professores do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelos ensinamentos a mim emitidos.

✚ A todos da biblioteca, em especial para Norma de Carvalho Linhares, Rosane Maria Costa e Eliene Gomes Vieira Nascimento pela competência na orientação da normalização desta Dissertação.

✚ A toda a minha FAMÍLIA e AMIGOS, que estiveram presentes e solidários na realização deste trabalho.

Estou convencido, porém, de que a rigurosidade, a séria disciplina intelectual, o exercício da curiosidade não me fazem necessariamente um ser mal-amado, arrogante, cheio de mim mesmo.

Ou, em outras palavras, não é a minha arrogância intelectual a que fala de minha rigurosidade científica. Nem a arrogância é sinal de competência, nem a competência é causa de arrogância. Não nego a competência, por outro lado, de certos arrogantes, mas lamento neles a ausência de simplicidade que, não diminuindo em nada seu saber, os faria gente melhor. Gente mais gente.

(Paulo Freire)

RESUMO

Na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos vários fatores contribuem para as variáveis na produção e qualidade dos oócitos e embriões. Avaliou-se o uso parenteral de vitamina A (VA) e vitamina E (VE) na produção de oócitos colhidos por aspiração folicular (OPU) e embriões por produção *in vitro* (PIV) em de vacas (n=22), sendo: Simental (S) (n=2); Nelore (N) (n=4); Brahma (B) (n=5) e Gir (G) (n=11). Todos os animais foram alocados na fase pré-tratamento (F1) (n=22) (não receberam vitaminas) e os mesmos animais utilizados para a fase pós-tratamento (F2) (receberam 1.000.000 UI de vitamina A e 1g de vitamina E). A primeira OPU foi na F1, logo em seguida foi aplicado 1.000.000 UI de VA e 1g de VE, e após 12 dias realizou-se nova OPU para fazer a F2. Os oócitos (CCO) foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro*. As 44 OPU produziram 520 oócitos, 217 (F1) e 303 (F2), havendo efeito significativo, com acréscimo de 86 oócitos, obtendo média e desvio padrão $9,86 \pm 5,53$ F1 e $13,77 \pm 2,0$ F2, (*p<0,0219). Quando separada as raças NBG (Nelore, Brahma e Gir) (n=20) houve acréscimo de 95 oócitos, obtendo média e desvio padrão $9,90 \pm 5,81$ F1-NBG e $14,65 \pm 9,44$ F2-NBG, (*p<0,0085). As 44 PIV produziram 224 embriões, sendo 93 F1 e 131 F2, obtendo média e desvio padrão $4,23 \pm 3,09$ F1 e $5,95 \pm 4,05$ F2, (*p<0,0228). Quando separada as NBG a produção foi de 214 embriões, havendo acréscimo de 38 embriões, obtendo valores de $4,45 \pm 3,15$ F1 e $6,25 \pm 4,09$ F2, (*p<0,0285). Houve um efeito significativo na quantidade produzida de oócitos (n=22) e oócitos NBG (n=20). Houve efeito na produção de embriões de todas as raças (n=22) e embriões NBG (n=20). A suplementação com VA e VE aumentou o número de oócitos totais ($1,7 \pm 0,7$); oócitos NBG ($1,8 \pm 0,8$); embriões totais ($3,9 \pm 1,6$) e embriões NBG ($4,7 \pm 1,6$). A resposta da F2 comparado com a F1 na produção de oócitos e embriões foi significativa quando todas as raças estavam agrupadas e também quando foi agrupado apenas as *Bos taurus indicus* (NBG). O uso das vitaminas A e E pode ser usada para maior recuperação oocitária e embrionária em raças Zebuínas.

Palavras-chave: Recuperação de Oócitos. Desenvolvimento Embrionário. Vitamina A. Vitamina E.

ABSTRACT

The *in vitro* (IVP) bovine embryos production has several factors that contribute to the variables in the production and quality of oocytes and embryos. We evaluated the parenteral use of vitamin A (VA) and vitamin E (VE) in the production of oocytes collected by follicular aspiration (OPU) and embryos by *in vitro* production (IVP) in cows (n = 22), where: Simmental (S) (n = 2), Nelore (N) (n = 4), Brahma (B) (n = 5) and Gir (G) (n = 11). All animals were allocated in the pre-treatment (F1) (n = 22) (not receiving vitamins) and the same animals used for post-treatment (F2) (received 1,000,000 IU of vitamin A and vitamin 1g E). The first OPU was in F1, soon after 1,000,000 IU was administered 1 g of VE and VA, and after 12 days was held to make the new OPU F2. Oocytes (COC) were matured, fertilized and cultured *in vitro*. The OPU 44 yielded 520 oocytes, 217 (F1) and 303 (F2), with significant effect, an increase of 86 oocytes, obtaining mean and standard deviation 9.86 ± 5.53 13.77 ± 2.0 F1 and F2, (*p <0.0219). When separate races NBG (Nelore, Brahman and Gir) (n = 20) there was an increase of 95 oocytes, obtaining mean and standard deviation 9.90 ± 5.81 and 14.65 NBG F1-F2- $NBG \pm 9.44$, (*p <0.0085). The 44 IVP embryos produced 224, 93 F1 and 131 F2, getting mean and standard deviation 4.23 ± 3.09 5.95 ± 4.05 F1 and F2, (*p <0.0228). When separated from the NBG production was 214 embryos, with an increase of 38 embryos, obtaining values of 4.45 ± 3.15 6.25 ± 4.09 F1 and F2, (*p <0.0285). There was a significant effect on the quantity produced of oocytes (n = 22) and NBG oocytes (n = 20). It was an increased in all breeds embryos production (n = 22) and NBG embryos (n = 20). Supplementation with VE and VA increased the total number of oocytes (1.7 ± 0.7); NBG oocytes (1.8 ± 0.8); total embryos (3.9 ± 1.6) and embryos NBG (4.7 ± 1.6). The response of the F2 compared to F1 in the production of oocytes and embryos was significant when all races were grouped together and also when it was grouped only *Bos taurus indicus* (NBG). The use of vitamins A and E can be used to greater oocyte recovery and embryo in Zebu breeds.

Keywords: Oocyte Retrieval. Embryonic Development. Vitamin A. Vitamin E.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Dinâmica do desenvolvimento folicular ovariano e secreção de gonadotrofinas durante ciclos estrais de 2 e 3 ondas em bovinos..... | 31 |
| 2 | Doadoras de oócitos da raça Nelore | 56 |
| 3 | Doadoras de oócitos da raça Gir..... | 56 |
| 4 | Bomba de Vácuo..... | 59 |
| 5 | Doadora de oócitos da raça Nelore em processo de aspiração folicular... | 60 |
| 6 | Fotomicrografia de oócitos em placa de petri, momentos após aspiração folicular..... | 61 |
| 7 | Acondicionamento de oócitos para transporte..... | 63 |
| 8 | Estufa de maturação oocitária..... | 64 |
| 9 | Fotomicrografia de oócitos após maturação <i>in vitro</i> | 65 |
| 10 | Fotomicrografia de oócitos após maturação <i>in vitro</i> | 65 |
| 11 | Fotomicrografia de oócito em processo de fecundação <i>in vitro</i> | 66 |
| 12 | Fotomicrografia de embriões em processo de cultivo <i>in vitro</i> | 67 |
| 13 | Fotomicrografia de oócitos momentos após a aspiração folicular (OPU).. | 70 |
| 14 | Produção de oócitos verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando todos os animais estudados..... | 72 |
| 15 | Produção de oócitos verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando conjuntamente as raças Nelore, Brahma e Gir..... | 72 |
| 16 | Produção de oócitos verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando as quatro raças individualmente: Simental, Nelore, Brahma e Gir..... | 75 |
| 17 | Comparação entre as raças Simental, Nelore, Brahma e Gir, em relação à produção de oócitos, em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento)..... | 76 |
| 18 | Eficácia do tratamento com as vitaminas A e E calculada em função da produção de oócitos para cada raça estudada: Simental, Nelore, Brahma e Gir..... | 77 |

| | | |
|----|---|----|
| 19 | Fotomicrografia de embriões produzidos por fecundação <i>in vitro</i> | 79 |
| 20 | Produção de embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando todos os animais estudados..... | 80 |
| 21 | Produção de embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando conjuntamente as raças Nelore, Brahma e Gir..... | 80 |
| 22 | Produção de embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando as quatro raças individualmente: Simental, Nelore, Brahma e Gir..... | 84 |
| 23 | Comparação entre as raças Simental, Nelore, Brahma e Gir, em relação à produção de embriões, em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento)..... | 85 |
| 24 | Eficácia do tratamento com as vitaminas A e E calculada em função da produção de embriões para cada raça estudada: Simental, Nelore, Brahma e Gir..... | 86 |
| 25 | Taxa de conversão de oócitos para embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando todos os animais estudados..... | 88 |
| 26 | Taxa de conversão de oócitos para embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando conjuntamente as raças Nelore, Brahma e Gir..... | 88 |
| 27 | Taxa de conversão de oócitos para embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando as quatro raças individualmente: Simental, Nelore, Brahma e Gir..... | 89 |
| 28 | Comparação entre as raças Simental, Nelore, Brahma e Gir, em relação à taxa de conversão de oócitos para embriões, em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento)..... | 91 |
| 29 | Eficácia do tratamento com as vitaminas A e E calculada em função da taxa de conversão de oócitos para embriões para cada raça estudada... | 92 |

LISTA DE TABELAS

- 1 Valores da média e desvio padrão do número de oócitos referentes às contagens efetuadas em todos os 22 animais estudados e nas 20 matrizes pertencentes às raças Nelore, Brahma e Gir em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento)..... 71
- 2 Valores da média e desvio padrão do número de oócitos referentes às contagens efetuadas nos animais pertencentes às raças Simental (2), Nelore (4), Brahma (6) e Gir (11) em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento)..... 73
- 3 Mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo da eficácia do tratamento com as vitaminas A e E, calculada em função da produção de oócitos, para cada raça individualmente e para todos os animais estudados... 77
- 4 Valores da média e desvio padrão do número de embriões referentes às contagens efetuadas em todos os 22 animais estudados e nas 20 matrizes pertencentes às raças Nelore, Brahma e Gir em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento)..... 79
- 5 Valores da média e desvio padrão do número de embriões referentes às contagens efetuadas nos animais pertencentes às raças Simental (2), Nelore (4), Brahma (6) e Gir (11) em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento)..... 83
- 6 Mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo da eficácia do tratamento com as vitaminas A e E, calculada em função da produção de embriões, para cada raça individualmente e para todos os animais estudados..... 86
- 7 Valores da média e desvio padrão da taxa de conversão referentes às observações realizadas em todos os 22 animais estudados e nas 20 matrizes pertencentes às raças Nelore, Brahma e Gir em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento)..... 87
- 8 Valores da média e desvio padrão da taxa de conversão referentes às observações realizadas nos animais pertencentes às raças Simental (2), Nelore (4), Brahma (6) e Gir (11) em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento)..... 90
- 9 Mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo da eficácia do tratamento com as vitaminas A e E, calculada em função da taxa de conversão de oócitos para embriões, para cada raça individualmente e para todos os animais estudados..... 92

LISTA DE QUADROS

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Produção de óocitos do grupo controle e tratado por aspiração folicular (OPU)..... | 78 |
| 2 | Produção de embriões do grupo controle e tratado por produção <i>in vitro</i> (PIV)..... | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|---|
| AF | Aspiração folicular |
| AR | Ácido retinóico |
| Be | Blastocisto eclodido |
| Bi | Blastocisto inicial |
| Bl | Blastocisto |
| Bx | Blastocisto expandido |
| CCO | Complexo cumulus-oócito |
| CE | Ciclo Estral |
| CEHC | Hydroxychroman carboxietil |
| CIV | Cultivo <i>in vitro</i> |
| CRBP | Proteínas celulares de ligação com retinol |
| FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| FIV | Fecundação ou Fertilização <i>in vitro</i> |
| FSH | Hormônio Folículo Estimulante |
| GAP | Junções com o citoplasma |
| HECM | Hamster Embryo Culture Medium |
| IA | Inseminação artificial |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IETS | International Embryo Transfer Society |
| IU | Unidade internacional |
| LH | Hormônio luteinizante |
| MII | Metáfase II |

| | |
|---------|--|
| MIV | Maturação <i>in vitro</i> |
| MZT | Transição maternozigótica |
| OPU | Ovum pick-up - aspiração folicular transvaginal guiada por ultrasonografia |
| PIV | Produção <i>in vitro</i> de embriões |
| PIVE | Produção <i>in vitro</i> de embriões |
| RBP | Proteína de ligação do retinol |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SOF | Synthetic Oviductal Fluid |
| TALP | Tyrode modificado |
| TE | Transferência de embriões |
| TCM-199 | Meio Tissue Culture Medium |
| TOC | Tocoferóis |
| Toc-3 | Tocotrienóis |
| TRA | Tecnologias de Reprodução Assistida |
| VG | Vesícula germinativa |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 28 |
| 2.1 | Fisiologia bovina..... | 28 |
| 2.2 | Produção <i>in vitro</i> de embriões..... | 32 |
| 2.3 | Vitaminas..... | 43 |
| 2.3.1 | Vitamina A..... | 44 |
| 2.3.2 | Vitamina E..... | 46 |
| 3 | JUSTIFICATIVA..... | 51 |
| 4 | OBJETIVOS..... | 52 |
| 4.1 | Objetivos gerais..... | 52 |
| 4.2 | Objetivos específicos..... | 52 |
| 5 | PROTOCOLO EXPERIMENTAL..... | 53 |
| 5.1 | Local do experimento..... | 53 |
| 5.2 | Aspectos éticos..... | 53 |
| 5.3 | Fluxograma..... | 54 |
| 5.4 | Animais experimentais..... | 55 |
| 5.5 | Apresentação das Vitaminas..... | 57 |
| 5.6 | Fases experimentais..... | 57 |
| 5.7 | Metodologia experimental..... | 57 |
| 5.8 | Aspiração folicular..... | 58 |
| 5.9 | Manipulação de oócitos..... | 61 |

| | | |
|-------------|---------------------------------------|-----------|
| 5.9.1 | Lavagem e seleção dos oócitos..... | 61 |
| 5.9.2 | Transporte de oócitos..... | 62 |
| 5.9.3 | Maturação <i>in vitro</i> (MIV)..... | 63 |
| 5.9.4 | Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)..... | 66 |
| 5.9.5 | Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)..... | 67 |
| 5.10 | Análise estatística..... | 68 |
| 6 | RESULTADOS..... | 70 |
| 7 | DISCUSSÃO..... | 93 |
| 8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 98 |
| 9 | CONCLUSÃO..... | 99 |

1 INTRODUÇÃO

Os bovinos estão indubitavelmente entre as mais importantes espécies de animais domésticos no mundo, por isso eles estão incluídos nas “grande cinco” espécies cultivadas no mundo, juntamente com ovinos, caprinos, frangos e suínos. De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), o tamanho da população mundial de bovinos domésticos é de cerca de 1,4 bilhões. Essa espécie também compreende uma notável diversidade. A FAO relata a existência de 897 raças locais adaptadas a ambientes muito diferentes e difíceis, abrangendo desde montanhas a áreas desérticas e condições extremas em termos de umidade, temperatura e altitude (AJMONE-MARSAN; GARCIA, 2008).

A domesticação bovina é um fato, em milênios de acasalamentos seletivos o homem tem moldado os ancestrais selvagens dos bovinos, produzindo uma série de raças principalmente domadas, produtivas e altamente diferenciadas por todo o mundo. A história dos bovinos domésticos teve início há cerca de 10.000 anos com a domesticação (AJMONE-MARSAN; GARCIA, 2008).

A domesticação dos animais representou um marco na história da humanidade. Ela gradualmente transformou populações migratórias de caçadores em fazendeiros com assentamentos estáveis. Seguiram-se a segurança do alimento e abundância relativa, permitindo o crescimento da população, a estratificação progressiva da sociedade e o desenvolvimento da religião, cultura e ciência (AJMONE-MARSAN; GARCIA, 2008).

O rebanho bovino brasileiro em 2008 era composto de 202.287.196 cabeças, distribuídas em todo território segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). O estado com maior população bovina é Mato Grosso com 26.018.216 animais e a menor população encontra-se no Distrito Federal com um rebanho de 80.000 cabeças. O Ceará tem um rebanho de 2.460.523 bovinos (IBGE, 2008). De fundamental importância tem sido a nutrição do rebanho, pois influencia de forma significativa a eficiência reprodutiva dos animais (REICHENBACH, 2003).

A eficiência reprodutiva é determinante na obtenção de maior produtividade e retorno econômico nos sistemas de produção animal. As tecnologias utilizadas para influenciar a eficiência reprodutiva incluem as denominadas tecnologias de reprodução assistida (TRA), como a inseminação artificial, a sincronização dos ciclos reprodutivos, a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões, a criopreservação de gametas e embriões, entre outras (PIVATO, 2006).

No caso dos bovinos, em média, um macho gera entre 15 a 20 produtos por ano, enquanto uma fêmea, na maioria das vezes, gera uma cria por ano, o que corresponde a oito a dez produtos durante toda sua vida reprodutiva (ABADIA, 2006).

A seleção genética em bovinos proporcionou animais com alta produção de leite e carne. No entanto, em condições naturais, vacas conseguem produzir no máximo, uma cria por ano. A multiplicação mais efetiva de fêmeas bovinas geneticamente superiores implica na necessidade de promover múltiplas ovulações como ferramenta importante para aumentar a produção de embriões (AMARAL *et al.*, 2004).

Bem *et al.* (1995) relataram o enorme progresso científico no que concerne à embriologia nos mamíferos na década de 90 e mencionaram novas tecnologias que foram desenvolvidas e outras que estavam em desenvolvimento por centenas de equipes no mundo todo. Abordagens celulares, moleculares e genéticas já criavam novas oportunidades para o desenvolvimento da pecuária, nesta ocasião se incluía a transferência de embriões, como sendo a primeira das modernas tecnologias a ser incrementada em nível de campo.

A partir da década de 50, a inseminação artificial (IA) e a criopreservação do sêmen derrubaram barreiras para a disseminação do material genético do macho. No entanto, somente a partir dos anos 80, houve melhor aproveitamento genético de fêmeas, com os avanços científicos determinados pela superovulação e transferência de embriões e, mais recentemente, pela produção "*in vitro*" (PIV) de embriões (LEIVAS, 2006).

No atual contexto de evolução da produtividade na pecuária nacional, associado às evoluções científicas e tecnológicas, várias biotecnologias ligadas a reprodução animal vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de aumentar

a eficiência reprodutiva, maximizando a produção de animais geneticamente superiores, visando o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes, em um curto período de tempo. Seguindo a evolução das principais biotecnologias adotadas e trabalhadas no Brasil, é importante ressaltar, inicialmente, o papel da IA, sendo a primeira biotecnologia adotada nos sistemas de produção brasileiros que visa à multiplicação genética de touros de alto valor (RENESTO, 2004).

Os avanços obtidos nas biotécnicas reprodutivas ao longo dos anos permitiram uma maior participação da fêmea bovina no processo de melhoramento genético do rebanho. Isso porque, o número de descendentes deixados por uma única fêmea ao longo de sua vida reprodutiva aumentou significativamente com o aperfeiçoamento das técnicas de transferência e produção *in vitro* de embriões (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Do ponto de vista do risco de doenças, o deslocamento de embriões é sem dúvida muito mais seguro para o comércio, que transportar animais ou sêmen (STRINGFELLOW *et al.*, 1998).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) expandiu-se nas diferentes espécies animais pouco tempo após o nascimento de Louise Brown em 1978, na Inglaterra, o primeiro bebê de proveta do mundo (VARAGO *et al.*, 2008).

Até a década de 40, o conhecimento sobre a fecundação *in vitro* (FIV) era baseado no estudo de ovócitos de estrelas do mar. Os invertebrados marinhos foram primeiramente utilizados na pesquisa, porque, ao contrário dos mamíferos, a fecundação ocorre externamente ao sistema reprodutor da fêmea. Embora o primeiro estudo relativo à fecundação em mamíferos tenha ocorrido em 1935, até a década de 50 praticamente nenhum sucesso tinha sido obtido. Em 1951, Austin e Chang, observaram que, quando os espermatozóides eram depositados no trato reprodutivo da coelha logo após o momento da ovulação, poucos oócitos eram fecundados. Por outro lado, uma proporção muito grande de gametas era fecundada quando a inseminação ocorria na tuba uterina, várias horas antes da ovulação. Foi postulado que os espermatozóides de algumas espécies mamíferas necessitavam de algum tempo no trato reprodutivo feminino antes de adquirir a capacidade de penetrar nos oócitos. Este

conjunto de mudanças foi denominado de capacitação espermática (VARAGO *et al.*, 2008).

Varago *et al.* (2008) relatam que o aumento no interesse na fecundação *in vitro* de oócitos de mamíferos ocorreu após a descoberta da capacitação espermática, em poucos anos, oócitos de coelha foram fecundados *in vitro* utilizando-se espermatozóides capacitados no útero. No entanto, somente após 20 anos é que o processo de fecundação de oócitos de coelha foi repetido, desta vez utilizando-se espermatozóides capacitados.

Em bovinos, até 1985, poucos relatos de fecundação *in vitro* eram encontrados na literatura, e a maioria dos estudos era realizada na América do Norte, utilizando oócitos maturados *in vivo*. O nascimento do primeiro bezerro por fecundação *in vitro* ocorreu no dia 9 de junho de 1981. Nesse trabalho, foram utilizadas 22 doadoras e sete receptoras e, para a fecundação, foram utilizadas amostras de sêmen fresco e congelado. As amostras de sêmen eram de animais pré-selecionados para inseminação artificial, o que indicava uma boa qualidade seminal. A colheita dos oócitos foi realizada por via cirúrgica e foram recuperados 177 oócitos já maturados dos quais 52% foram fecundados. Embora grande quantidade de embriões tenha sido transferida, a gestação só foi alcançada em uma receptora, a qual havia recebido apenas um embrião no estágio de quatro células. O primeiro bezerro de fecundação *in vitro* nasceu pesando 45 kg e, após alguns meses de observação, não foram constatadas alterações no desenvolvimento e comportamento do animal (VARAGO *et al.*, 2008).

Desde a década de 70 quando a transferência de embriões (TE) foi iniciada, esta tecnologia foi progressivamente propagada, passando a ser cada vez mais utilizada pelos técnicos atuantes nesse setor. Entretanto, foi a partir do ano 2.000 que se observou o expressivo crescimento da produção de embriões *in vitro*, o que fez com que o Brasil passasse a ser reconhecido como referência mundial na área de tecnologias de embriões. Nos últimos quatro anos, o Brasil foi responsável por aproximadamente 25% da produção total e 50% da produção *in vitro* de embriões bovinos no mundo (ALONSO, 2008).

A Fertilização *In Vitro* (FIV), é considerada a terceira geração de biotecnologia aplicada ao Melhoramento Genético, após a IA e a TE (RENESTO, 2004).

O dado estatístico sobre o comércio de transferência de embriões elaborados pela “International Embryo Transfer Society” (IETS) em 2006, mostra que as transferências de embriões produzidos *in vivo* e de embriões PIV continuou a aumentar em pouco menos de um milhão de transferências. Em todo o mundo, mais de 670.000 embriões produzidos *in vivo* foram transferidos, dos quais aproximadamente metade foi transferido a fresco e metade congelados. Em contrapartida, cerca de 292.000 embriões PIV foram transferidos no mesmo ano, sendo a maioria (aproximadamente 75%) transferida a fresco (LONERGAN, 2008).

Segundo relatório apresentado pela IETS, o Brasil ocupa posição destacada entre os países que aplicam comercialmente e em larga escala as diversas biotecnologias da reprodução animal, tendo sido responsável por cerca de 200.000 transferências de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) em 2006, o equivalente a aproximadamente 50% de todo movimento mundial (ALONSO, 2008).

O Brasil ocupa uma posição de destaque no cenário mundial no uso da biotecnologia de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. Esta técnica tornou-se de eleição por muitos criadores pelas vantagens que apresenta como a redução do manejo na propriedade, além de oferecer bom índice de produção (LEIVAS, 2006).

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma importante biotécnica de reprodução assistida aplicável a mamíferos domésticos de interesse econômico. Essa biotécnica pode ser utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas que as impeçam de reproduzir pela forma natural ou via transferência de embriões (TE). A PIV é também uma excelente ferramenta para pesquisa de fenômenos biológicos que ocorrem durante a maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de oócitos, capacitação espermática e eventos relacionados ao início do desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação. Devido à sua capacidade de produzir um grande número de embriões, a PIV se tornou um instrumento indispensável para outras biotécnicas como a clonagem, a manipulação de genes e a transferência de núcleos (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Na bovinocultura brasileira, essas tecnologias de reprodução assistida também vêm sendo amplamente utilizadas e adaptadas ao nosso sistema de produção

e, ao longo da sua evolução, tem revelado bons índices reprodutivos, confirmando ser um processo economicamente viável, bastante divulgado e empregado na pecuária moderna (RENESTO, 2004).

A transferência de embriões em bovinos continua sendo um dos métodos mais econômicos e práticos para a obtenção do aumento das taxas de reprodução de fêmeas com alto valor genético, tanto em rebanhos de corte como de leite (REICHENBACH, 2003).

Segundo Rumpf (2007) a PIV proporciona um melhor aproveitamento de matrizes de elevado mérito genérico, podendo chegar a produzir 36 crias por ano de uma única fêmea, para Varago *et al.* (2008) é possível obter entre 25 e 50 bezerras/vaca/ano. Podendo ser utilizada em bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, vacas com subfertilidade adquirida e vacas senis. Renesto (2004) citou outra vantagem particular da FIV em relação a outras biotécnicas, que é a maximização do uso do sêmen, permitindo maior produção de embriões com doses de alto valor comercial e inclusive sêmen sexado.

A biotecnologia de embriões também é importante para acelerar o melhoramento genético de gado e para as tecnologias emergentes como transferência nuclear de células somáticas (FEUGANG *et al.*, 2009).

A PIV utilizada convencionalmente para estudos básicos de gametas ou suporte para outras biotécnicas, tornou-se também uma importante ferramenta no melhoramento genético. Na década de 90, associada à obtenção crescente de resultados melhores e mais estáveis, passou a ser aplicada comercialmente em vários países. Fatos como estes permitiram o uso da OPU (ovum pick-up)/PIV em animais de diferentes categorias (idade, estatus reprodutivo, aptidão) e não apenas para animais com infertilidade adquirida ou que não respondem a superovulação, finalidade para a qual foi inicialmente proposta (LEIVAS, 2006).

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos obteve avanços consideráveis nos últimos anos e está sendo rapidamente incorporada aos projetos de produção (ALVES *et al.*, 2003).

O sucesso da PIV está associado a diferentes variáveis como a raça, idade, fase do ciclo e principalmente o fator individual da doadora que é determinante no

número de oócitos viáveis (varia entre zero a mais de cem), ou mesmo índice de produção embrionária e bezerras nascidas. Fatores externos como temperatura, nutrição e condições de estresse podem favorecer, ou prejudicar os resultados de acordo com o potencial de cada animal. Além destes fatores, o sêmen utilizado para a fecundação, assim como o protocolo empregado em todo o processo de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) são decisivos nos índices de produção e qualidade dos embriões (LEIVAS, 2006).

A PIV de embriões bovinos é utilizada comercialmente com frequência (LEIVAS, 2006; PASCHOAL *et al.*, 2007), com o objetivo de se obter um maior número de produtos nascidos por ano de fêmeas selecionadas (LEIVAS, 2006), sendo importante para acelerar a produção de animais geneticamente superiores (GONÇALVES *et al.*, 2007) e diminuir o intervalo entre gerações e acelerar o melhoramento genético animal (VARAGO *et al.*, 2008). A pesquisa nesta área ainda é importante para a otimização dos resultados já estabelecidos com produção de embriões de melhor qualidade (PASCHOAL *et al.*, 2008).

A PIV em bovinos é freqüentemente utilizada para manejar gado com baixa fertilidade, mas está se tornando um método de escolha para ampliar o uso de sêmen raro e/ou caro ou para o uso mais eficiente de pequenas quantidades de sêmen tais como com espermatozoides sexados (LONG, 2008).

A otimização da técnica de PIV visando à produção de embriões de boa qualidade e em número cada vez mais expressivo resultará na diminuição do custo por embrião produzido e possibilitará uma maior difusão da técnica entre os produtores. Ainda, tais melhorias seriam de grande valia para o aprimoramento de outras biotécnicas que dependam da PIV (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Pierson e Ginther em 1984 relataram o início da técnica de detecção e monitoramento de estruturas ovarianas por ultra-sonografia transretal, e os mesmos em 1987 comparam os resultados da ultra-sonografia com os resultados de cortes de ovários, sendo a técnica de ultra-som validada como uma ferramenta para detecção de folículos com diâmetro >2mm e para monitoramento de corpos lúteos (ADAMS; JAISWAL, 2008).

Em 1985, no Canadá, a equipe de Sirard foi pioneira no uso de laparoscopia

para recuperação de ovócitos de bovinos maturados *in vivo*, do ovário de vacas doadoras. Em 1988, Pieterse e colaboradores, na Holanda, descreveram a técnica de aspiração transvaginal de ovócitos bovinos, usando o auxílio da ultra-sonografia, e constataram que era um meio que tornava possível repetidas recuperações de ovócitos de uma mesma doadora (PIVATO, 2006).

No início da década de 90, com a introdução da OPU, seguida pela PIV, a expectativa no incremento da produtividade das fêmeas aumentou (RENESTO, 2004). A aplicação em escala comercial da PIV se tornou viável após o advento da aspiração folicular *in vivo* e pelo aprimoramento das condições de cultivo *in vitro* (GONÇALVES *et al.*, 2008; PONTES *et al.*, 2008; VARAGO *et al.*, 2008), tendo sido utilizada como instrumento importante para exploração maximizada do potencial reprodutivo dos rebanhos, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal. Nesta espécie, a produção *in vitro* de embriões alcançou um desenvolvimento tecnológico que atualmente permite a sua aplicação em escala comercial, podendo-se obter entre 50 a 100 embriões/fêmea/ano (VARAGO *et al.*, 2008).

O ganho genético anual em um rebanho com um programa de superovulação e transferência de embriões em fêmeas selecionadas é de 1,8 a 2,4 %. Utilizando-se novilhas selecionadas pelo pedigree, o índice aumenta, variando entre 2,6 a 3,5%. À medida que se avança no emprego de tecnologia, os índices aumentam mais, como no caso da bipartição de embriões chegando a 4% (BEM *et al.*, 1995). O ganho genético obtido em programas de melhoramento animal, através do emprego de tecnologias de embriões, foi estimado em 18 a 22% (REICHENBACH, 2003). Na última década, os produtores de leite e carne bovina incrementaram consideravelmente o uso da aspiração folicular (OPU) associada à produção *in vitro* de embriões (PIV) (BRUM *et al.*, 2006).

A aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia (OPU) pode ser realizada a campo e empregada na produção de embriões bovinos, favorecendo os programas de melhoramento genético (ALVES *et al.*, 2003). Kruij e colaboradores (1994), recomendaram que a OPU pode ser realizada de forma repetida em vacas com até 12 anos ou gestantes.

Atualmente, a PIV de embriões compreende três etapas desenvolvidas em

laboratório: a maturação oocitária *in vitro*, a fecundação dos oócitos *in vitro* e o cultivo embrionário *in vitro* até os estádios de mórula e blastocisto, quando os embriões poderão ser transferidos ou criopreservados. No entanto, o desenvolvimento da técnica se deu de maneira progressiva, sendo que os índices de produção embrionária alcançados atualmente e a realização de todo o procedimento dentro do laboratório (*in vitro*) só foi possível após anos de pesquisas em diferentes áreas da biotecnologia e da fisiologia. Como exemplo de pesquisas, há o estudo da função, desenvolvimento e metabolismo de gametas e embriões, utilização da ultra-sonografia, desenvolvimento de fármacos seguros e efetivos como as prostaglandinas e implantes liberadores de hormônios, desenvolvimento de meios de cultivo, entre outros. Hoje, é possível produzir embriões na espécie bovina, sem levar em consideração o estágio do ciclo estral das doadoras, podendo-se repetir o procedimento sem interferir negativamente no número de oócitos recuperados (VARAGO *et al.*, 2008).

O uso comercial em larga escala da PIV está, portanto, vinculada à melhoria dos índices zootécnicos e conseqüentemente a diminuição dos custos. Tendo em vista que a aspiração pode ser feita a campo, enquanto a PIV requer laboratório adequado, a tendência é que ocorra, no Brasil, o mesmo que em outros países como Alemanha, França e Canadá, onde existem laboratórios regionais de PIV que recebem os oócito aspirados por veterinários que atuam em fazendas. No laboratório é produzido o embrião *in vitro* que é entregue ao veterinário que o transferirá para vacas receptoras que levarão a gestação a termo (RUMPF, 2007).

Diversos parâmetros são utilizados para avaliar a qualidade dos embriões PIV como morfologia, criotolerância, transcrição (mRNA), eclosão *in vitro* e prenhez após a transferência. Entretanto, nenhuma dessas técnicas permite uma seleção eficiente que assegure bons índices de prenhez. O aumento da eficiência da PIV está condicionado ao desenvolvimento de trabalhos que visem aperfeiçoar e simplificar as condições de cultivo durante as várias etapas do processo, principalmente no que se refere à maturação citoplasmática e molecular de oócitos obtida *in vitro* (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Um aumento do interesse na fecundação *in vitro* de oócitos de mamíferos ocorreu após a descoberta da capacitação espermática e, em poucos anos, oócitos de

coelha foram fecundados *in vitro* utilizando-se espermatozóides capacitados no útero. No entanto, somente após 20 anos é que o processo de fecundação de oócitos de coelha foi repetido, desta vez utilizando-se espermatozóides capacitados *in vitro* (VARAGO *et al.*, 2008).

A atenção conferida nos últimos anos a vitamina A e seus derivados, coletivamente conhecidos como retinóis, é devido aos seus efeitos sobre a reprodução bovina, que vão desde o desenvolvimento folicular até a fase de pré-implantação embrionária (GOMEZ *et al.*, 2006). A demanda de vitamina A em vacas superovuladas é estimada maior, tornando a suplementação uma proposta viável interferindo no ambiente uterino, no maior aporte de nutrientes para o embrião, entendendo-se assim o seu efeito benéfico (AMARAL *et al.*, 2004).

A vitamina A tem função importante no crescimento, morfogênese e diferenciação celular. A utilização desta vitamina em cultivo de embriões *in vitro*, confere melhores resultados de obtenção de blastocistos. As taxas de prenhez são animadoras quando comparadas com o grupo que não recebeu suplementação, talvez por um melhor desenvolvimento e diferenciação do trofoectoderma (HIDALGO *et al.*, 2003).

Livingston *et al.* (2004) reconheceram que os retinóis são importantes reguladores do desenvolvimento nos vertebrados, diferenciações celulares e funções teciduais. Estudos demonstraram que o desempenho tanto *in vivo* como *in vitro* reprodutivo é influenciado por estas substâncias, nos eventos que incluem o desenvolvimento folicular, maturação oocitária e o desenvolvimento inicial do blastocisto. No ambiente de cultivo de células em atmosfera de CO₂ é confirmado a sua ação antioxidante.

A vitamina E ocorre naturalmente nas membranas celulares e está presente na proteção celular do estresse oxidativo. Cultura de embriões *in vitro* adicionada de vitamina E, obtiveram melhorias desde o desenvolvimento embrionário inicial, expansão do blastocisto a um melhor desenvolvimento gestacional (OLSO, 2000).

Koo *et al.* (1997) relataram que a adição de composto de vitaminas aos meios de cultura não melhoram a qualidade e quantidade de embriões suínos no desenvolvimento “*in vitro*”, contrariando o relato de Naruse e colaboradores (2006) onde

a adição foi positiva para o desenvolvimento e melhoria da qualidade do embrião desta espécie.

Segundo Velas-Pereira *et al.* (2002), a vitamina E exerce papel importante na contenção da fragilidade eritrocitária de bovinos tratados com gossipol.

A viabilidade econômica da técnica de produção *in vitro* de embriões está intimamente relacionada à eficiência dos laboratórios. Não apenas com relação à taxa de produção dos embriões, mas principalmente com a qualidade do embrião, a capacidade de estabelecer gestação, desenvolvimento fetal e placentário normais, obtenção de gestações saudáveis e viáveis. Embora o custo da produção *in vitro* de embriões seja superior ao da transferência de embriões, justifica-se o seu emprego em caso de fêmeas com distúrbios reprodutivos adquiridos que inviabilizem a produção de descendentes (VARAGO *et al.*, 2008).

A necessidade de compreensão exata das exigências metabólicas e fisiológicas do oócito e do espermatozóide, bem como dos embriões em sistemas de cultivo *in vitro* apontam para a realização de novas pesquisas até que seja estabelecida a condição ideal para que o maior número possível de oócitos maturados *in vitro* possa ser fecundado e sustentem o subsequente desenvolvimento do embrião (VARAGO *et al.*, 2008).

Apesar dos avanços ocorridos nos últimos anos nessa biotécnica de PIV, várias questões relacionadas à avaliação da competência biológica dos gametas e ao próprio sistema de cultivo precisam ser esclarecidas (RUMPF, 2007).

Há poucas informações na literatura sobre a ação farmacológica da vitamina A e E de forma combinada na produção e qualidade de oócitos e embriões. Além disso, existe carência de trabalhos que correlacionam a importância das vitaminas e as respostas reprodutivas dos animais.

A oferta suficiente de alimentos saudáveis, a prevenção e controle de enfermidades e a sobrevivência harmoniosa do homem nos diferentes ecossistemas é sem dúvida o maior desafio da ciência na atualidade. O investimento na biotecnologia animal no Brasil é respaldado por dois principais fatos. O primeiro é o fato que o Brasil ainda lidera a lista dos países com maior biodiversidade e o segundo, é que o mercado interno por carne e leite é o terceiro maior do mundo (RUMPF, 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia bovina

A fêmea bovina tem em seus ovários ao nascimento em torno de 150 mil folículos primordiais (0 a 700.000). Ao chegar a puberdade este número diminui ficando entre 12.000 a 86.000, e destes, somente poucos chegam a ovulação (0,01%) durante o período de vida, enquanto o restante sofre atresia (PIVATO, 2006).

A foliculogênese é o processo de desenvolvimento pelo qual um folículo primordial ativado se desenvolve até o tamanho de folículo pré-ovulatório acompanhando o crescimento e a diferenciação do oócito e da camada de células da granulosa que o circunda. Baseado nas várias características morfológicas, incluindo o número de camadas de células da granulosa que circunda o oócito, as características morfológicas das células da granulosa, o diâmetro do oócito e do folículo, além da presença ou ausência do antro cheio de líquido, os folículos são classificados de várias maneiras, mas em geral podem ser classificados como primordial, primário, secundário ou terciário (antral ou vesicular) (ADAMS; JAISWAL, 2008).

Para Adams e Jaiswal (2008) o início do crescimento folicular, chamado de ativação, inicia-se com a transformação das células achatadas da pré-granulosa do folículo primordial em uma única camada de células cúbicas da granulosa (células foliculares), e o folículo passa a ser denominado de folículo primário. A proliferação das células da granulosa resulta em um aumento do número de camadas ao redor do oócito. Um folículo com duas a seis camadas de células da granulosa é chamado de folículo secundário, e um folículo com mais de seis camadas de células e com um antro cheio de líquido é denominado de folículo terciário (ou antral). O diâmetro de um folículo primordial mede cerca de 0,04 mm e o diâmetro do menor folículo antral é 0,25 mm. O folículo de Graaf ou pré-ovulatório passa a ser chamado de folículo ovulatório após o pico pré-ovulatório de gonadotrofina. Em bovinos, os folículos primordial, primário, secundário e terciário surgem pela primeira vez nos dias 90, 140, 210 e 250 de

gestação, respectivamente. O tempo necessário para um folículo crescer do maior estágio pré-antral (folículo secundário) até o tamanho de folículo ovulatório maduro é estimado em cerca de 42 dias.

O ciclo estral (CE) bovino é compreendido pelos eventos reprodutivos que se apresentam entre dois períodos de receptividade sexual (estro). As fêmeas da espécie bovina ao atingirem a puberdade exibem comportamento estral em média a cada 21 dias, variando de 17 a 24 dias tanto em raças européias quanto zebuínas até que a prenhez se estabeleça (RENESTO, 2004).

Durante o ciclo estral ocorrem importantes alterações no córtex ovariano que incluem crescimento e atresia de vários folículos antrais até o aparecimento do folículo ovulatório, bem como a formação e lise do corpo lúteo. O crescimento folicular na espécie bovina exhibe padrão contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade e continua na vida reprodutiva até a senilidade. Muitos estudos com ultra-sonografias seriadas foram realizados e demonstraram que durante o ciclo estral de novilhas ou vacas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* ocorrem duas ou três ondas de crescimento folicular (RENESTO, 2004).

Este processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos, que leva ao crescimento do folículo pré-ovulatório, é conhecido como dinâmica folicular, enquanto que o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular. Cada onda folicular é composta por três fases: recrutamento ou emergência, seleção e dominância (RENESTO, 2004).

A emergência da primeira onda folicular é observada em torno de um dia e meio após a ovulação quando um conjunto de folículos antrais dependentes de FSH começa a se desenvolver. Foi observado um aumento na concentração plasmática de FSH que antecede um a dois dias a emergência de cada onda folicular. Em torno de três a quatro dias após a emergência da onda o hormônio foliculo estimulante (FSH) reduz para níveis basais e o futuro folículo dominante é selecionado, continua seu crescimento, enquanto o restante dos folículos detém seu crescimento ou regridem e são chamados de subordinados (RENESTO, 2004).

A emergência das ondas foliculares em bovinos é caracterizada pelo crescimento repentino (em dois ou três dias) de oito a 41 pequenos folículos, que são

inicialmente detectados por ultra-sonografia com um diâmetro de três a quatro mm. Por cerca de dois dias, a taxa de crescimento é similar entre os folículos da onda, e então um folículo é selecionado para continuar crescendo (folículo dominante) enquanto que os restantes dos folículos subordinados tornam-se atresícos e regridem (ADAMS; JAISWAL, 2008).

A maioria dos ciclos estrais em bovinos (ou seja, > 95%) é composta ou por duas ou três ondas foliculares. Parece não haver preferência de raça ou idade específica para um dado padrão de ondas em *Bos taurus taurus*. Um aumento na proporção do padrão de três ondas, no entanto, foi associado a um baixo padrão nutricional e estresse térmico (ADAMS; JAISWAL, 2008). Em ambos os padrões de ciclo estral – duas e três ondas, a emergência da primeira onda coincide com o dia da ovulação (Dia zero). A emergência da segunda onda ocorre no 9° ou 10° dia para ciclos de duas ondas, e no 8° ou 9° dia para ciclos de três ondas. Nos ciclos de três ondas, uma terceira onda surge no 15° ou 16° dia. Sob a influência da progesterona (por exemplo, no diestro), o folículo dominante de ondas sucessivas sofre atresia. O folículo dominante presente no início da luteólise torna-se o folículo ovulatório, e a emergência da próxima onda é atrasada até o dia da ovulação subsequente. O corpo lúteo começa a regredir mais cedo nos ciclos de duas ondas (16° dia) do que nos ciclos de três ondas (19° dia), resultando em um ciclo estral correspondentemente menor (20 dias versus 23 dias, respectivamente). Portanto, o ciclo estral de 21 dias em bovinos existe somente como uma média entre os ciclos de duas e três ondas (Figura 1).

O número de folículos recrutados dentro de cada onda varia amplamente entre os indivíduos, mas é altamente repetido em um mesmo indivíduo. O padrão de ondas é repetível nos indivíduos, e a duração da dominância da primeira onda reflete o padrão da onda. A presença dos receptores de FSH nas células da granulosa e a resposta ao FSH exógeno fornecem argumento para a hipótese de que a dinâmica folicular pré-antral torna-se progressivamente sincronizada a um padrão de ondas (ADAMS; JAISWAL, 2008).

In vivo, os folículos préovulatórios atingem um diâmetro de 12-20mm, e ovulam um oócito com núcleo e citoplasma maturados adequadamente. Entretanto, os oócitos coletados para PIV são em sua maioria oriundos de pequenos folículos antrais

(GONÇALVES *et al.*, 2008). A tuba uterina é o local da fecundação e desenvolvimento embrionário *in vivo* (RENESTO, 2004).

Provavelmente o responsável pela queda do FSH antes da seleção é a produção de estradiol e inibina, sobretudo pelas células da granulosa do folículo dominante, que atuam inibindo a liberação de FSH pela hipófise anterior. As concentrações de FSH são mantidas em níveis basais até o folículo dominante da primeira onda perder sua dominância, resultando em aumento nos níveis de FSH e subsequente emergência da segunda onda folicular (RENESTO, 2004).

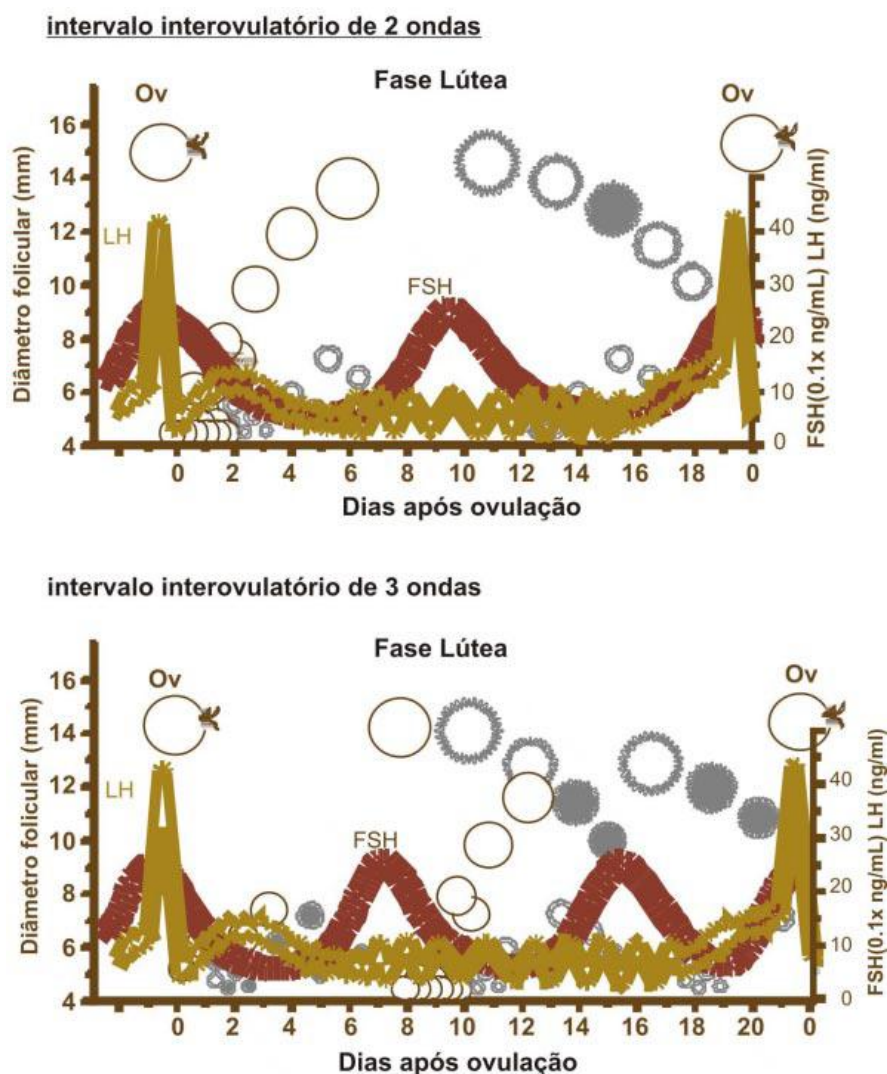


Figura 1 - Dinâmica do desenvolvimento folicular ovariano e secreção de gonadotrofinas durante ciclos estrais de duas e três ondas em bovinos.

Fonte: Adams e Jaiswal (2008).

Os dois ovários atuam primariamente como uma unidade única, ou seja, cada onda folicular inclui folículos de ambos os ovários, que respondem em harmonia. O folículo dominante suprime os subordinados e a emergência de uma nova onda através de um canal sistêmico ao invés de um canal local. A presença de um folículo dominante em um ovário não tem nenhum efeito que não poderia ser visto igualmente no outro ovário. Portanto, nenhuma relação intra-ovariana foi encontrada em relação à localização dos sucessivos folículos dominantes durante o ciclo estral (ADAMS; JAISWAL, 2008).

A seleção do folículo dominante está associada ao declínio dos níveis de FSH na circulação durante os três primeiros dias da onda. Folículos pequenos da onda emergente (ou seja, < 6 mm) são dependentes de concentrações elevadas de FSH circulante para continuar se desenvolvendo – em face ao declínio do FSH após o pico, eles atingem um platô e começam a regredir dentro de duas a cinco dias. De maneira oposta, o folículo destinado a tornar-se dominante pode manter a proliferação celular e a produção de estradiol apesar do declínio na concentração do FSH, uma habilidade que parece ser produzida pela manutenção da alta expressão de mRNA do receptor de FSH e da afinidade de ligação com FSH (ADAMS; JAISWAL, 2008).

2.2 Produção *in vitro* de embriões

Na década de 60, Edwards verificou que o desenvolvimento da maturação nuclear dos oócitos, a partir da remoção dos mesmos do ambiente folicular, era um fenômeno comum em várias espécies, incluindo a bovina. Ao cultivar *in vitro* oócitos inclusos em folículos e oócitos livres, foi possível concluir que o fator inibitório da maturação estava presente no folículo, pois este desaparecia com a remoção dos oócitos do ambiente folicular (VARAGO *et al.*, 2008).

O início da embriogênese é um processo complexo, caracterizado pelo uso de proteínas maternas e transcrições no desenvolvimento do embrião até a sua ativação do genoma (FEUGANG *et al.*, 2009).

Além da maturação nuclear e citoplasmática, foi constatado que as células foliculares, ou seja, as células da granulosa e do “*cumulus oophorus*” têm um papel importante durante a aquisição da competência oocitária na maturação *in vitro*. Oócitos com massa de células do *cumulus* claras e expandidas apresentavam maiores taxas de clivagem após a fecundação *in vitro* comparados àqueles sem células do cumulus ou com o cumulus compacto (VARAGO *et al.*, 2008).

A origem folicular do oócito tem influência significativa sobre o seu potencial de desenvolvimento e parece que depois que o oócito é removido do folículo seu potencial de desenvolvimento é limitado (LONERGAN, 2008) e que as condições de cultura pós-fertilização influenciam a qualidade e a viabilidade destes blastocistos (FEUGANG *et al.*, 2009). Enquanto a adição de uma variedade de gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento têm sido relatados por aumentar o desenvolvimento do blastocisto, esse aumento tende a ser modesto e raramente se aproxima, por exemplo, daquele obtido com oócitos maturados *in vivo*. A capacidade intrínseca de desenvolvimento do oócito, avaliado pelo desenvolvimento até o estágio de blastocisto, tem sido positivamente relacionada com o tamanho do folículo antral do qual ele é removido, com o estágio da onda folicular, e com o local de maturação (*in vivo* vs *in vitro*) (LONERGAN, 2008).

Inúmeras evidências têm sido apresentadas nos últimos anos, indicando que o potencial de desenvolvimento de embriões *in vitro*, depende da qualidade dos ovócitos dos quais se originam. Está bem estabelecido que somente ovócitos competentes tenham a capacidade de terem desenvolvimento embrionário normal. Essa competência é progressivamente adquirida durante os estágios finais da foliculogênese, através de várias mudanças celulares e moleculares que conferem ao ovócito a capacidade de completar a divisão meiótica, garantir uma fecundação monospermica, descondensar a cabeça do espermatozóide, transpor a transição materno-zigótica e prosseguir o seu desenvolvimento. Portanto, quando um ovócito imaturo é removido do folículo, ele deve ser capaz de sofrer não só a maturação nuclear e citoplasmática, mas também a maturação molecular (DODE, 2006).

Tendo em vista que oócitos maturados *in vitro*, quando comparados aos *in vivo* apresentam menores taxas de blastocisto, pode-se supor que o baixo

desenvolvimento embrionário se deve a deficiência do oócito, seja na maturação nuclear, citoplasmática ou na molecular. Vários fatores podem afetar o sucesso da maturação oocitária, entre eles pode-se citar a morfologia do complexo cumulus-oócito (CCO), as condições de maturação e a competência do oócito (DODE, 2006).

A associação íntima entre células do cumulus e oócito é um requisito básico para o crescimento folicular normal e aquisição da competência, assim como para coordenação da maturação nuclear e citoplasmática. As células do cumulus são células da granulosa especializadas, que estão metabolicamente associadas com o oócito através de projeções celulares que atravessam a zona pelúcida e formam pequenas junções com o citoplasma (gap). Essas junções são a única entrada de substâncias ou estímulos no ooplasma. No oócito imaturo essas células estão muito compactadas e durante a maturação iniciam a secreção de ácido hialurônico que se deposita entre elas, separando-as e causando expansão. Essa ligação metabólica vai diminuindo gradativamente à medida que a expansão aumenta. A maturação de oócitos bovinos na presença de um inibidor das junções gap, visando bloquear a comunicação entre oócitos e células do cumulus, causa uma diminuição drástica na taxa de blastocisto, confirmando que a presença dessas células é essencial para a maturação completa. Além das características morfológicas, as condições de cultivo também afetam drasticamente o processo de maturação. A presença de hormônios, substâncias antioxidantes, fatores de crescimento, temperatura, atmosfera gasosa, são alguns fatores que influenciam no sucesso da maturação (DODE, 2006).

Tentativas para melhorar a competência de oócitos bovinos têm sido realizadas, utilizando agentes fisiológicos e farmacológicos, para reter ovócitos imaturos em estágio de vesícula germinativa, por vários períodos de tempos antes da maturação *in vitro* (DODE, 2005).

In vivo, a maturação nuclear do oócito inicia após o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) durante o estro (GONÇALVES *et al.*, 2008).

A origem do folículo é vital para conferir aos oócitos, o ambiente necessário para adquirir competência para o desenvolvimento, e que a qualidade intrínseca do oócito no início do processo de produção *in vitro* é o fator mais importante em determinar o seu destino final (DODE, 2006).

Um oócito competente difere de um incompetente por sua capacidade de sustentar o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, essa diferença é o resultado da expressão diferenciada de genes. Se os estoques de mRNA maternos contribuem para a competência, mudanças qualitativas e quantitativas devem existir entre RNA de ovócitos competentes e incompetentes (DODE, 2006).

Para que o oócito seja capaz de ser fecundado e posteriormente se desenvolver até o estágio de blastocisto, ele precisa ser maturado e, durante essa fase, sofrer diversas transformações tanto em seu citoplasma quanto em seu núcleo. Durante todo o seu desenvolvimento, o oócito se encontra no estágio diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa (VG). *In vivo*, o reinício da meiose ou maturação tem início após o pico préovulatório de LH durante o estro e, *in vitro*, a retirada do oócito do contato com as células foliculares é suficiente para dar início ao processo de maturação nuclear. A maturação nuclear do oócito compreende a progressão do estágio diplóteno da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II (MII). Em bovinos, o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. *In vitro*, diferentes condições de cultivo já foram testadas para a maturação de oócitos e vários meios de maturação (Fluído sintético de oviduto (SOF), DMEM, Ham's F-10, Ham's F-12 e meio de cultivo tecidual 199-TCM 199). O TCM199 é o meio mais difundido entre os laboratórios de produção *in vitro*, sendo, geralmente, suplementado com soro fetal bovino (SFB), FSH, LH, piruvato e antibiótico, entretanto existem variações entre os diferentes protocolos de PIV (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Os oócitos adquirem progressivamente a capacidade de completar a maturação nuclear, citoplasmática e suportar o desenvolvimento embrionário até a fase final de crescimento. A maioria dos oócitos colhidos para PIV está incluso em pequenos folículos antrais e, apesar de competentes para o reinício da meiose, apresentam baixa capacitação para o desenvolvimento embrionário. *In vivo*, a capacitação é adquirida ao longo do desenvolvimento folicular devido às alterações moleculares e ultra-estruturais ocorridas no oócito durante esse período, que o tornam apto a suportar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário. Em suporte a essa idéia, oócitos derivados de folículos grandes são mais capacitados para o desenvolvimento embrionário que oócitos oriundos de folículos pequenos. Entretanto, o

tamanho folicular não parece ser único responsável pela total capacitação dos CCOs. Oócitos coletados seis horas após o pico pré-ovulatório de LH e maturados *in vitro*, apresentam uma elevada taxa de desenvolvimento embrionário, muito semelhante à obtida *in vivo* (GONÇALVES *et al.*, 2007).

In vivo, o espermatozóide percorre um longo trajeto para chegar ao infundíbulo e fecundar o oócito. Durante esse percurso, glicosaminoglicanas presentes no trato genital feminino induzem sua capacitação (GONÇALVES *et al.*, 2008).

A produção *in vitro* de embriões ainda permite o aumento do potencial de exploração zootécnico de fêmeas de genética superior em um menor período de tempo, uma vez que as sessões de aspiração folicular podem ser realizadas a cada 15 dias. Realizada nesta periodicidade, ou mesmo mensalmente, com índices de produção de 40%, seu rendimento pode superar aquele obtido pela transferência de embriões, e a relação custo/benefício pode se tornar justificável (VARAGO *et al.*, 2008).

A técnica de PIV compreende algumas etapas que vão desde a recuperação dos oócitos até o cultivo embrionário *in vitro*. Há mais de uma década, a técnica de aspiração folicular transvaginal tem sido a melhor opção para a recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina. A OPU apresenta uma maior flexibilidade em relação a TE, pois permite a obtenção de oócitos de fêmeas a partir dos seis meses de idade (ainda com resultados inferiores nessa idade), de vacas prenhes até o terceiro mês de gestação ou mesmo após o parto. A eficiência do procedimento de aspiração folicular (AF) transvaginal está relacionada à metodologia utilizada, e esta, interfere na quantidade e morfologia dos complexos cumulus oócitos (CCOs), e conseqüentemente na competência para o desenvolvimento embrionário. A aspiração folicular duas vezes por semana produz uma maior percentagem de embriões grau um e um maior número de embriões transferíveis do que aspirações realizadas uma vez por semana. No entanto, a aspiração folicular semanal de animais da raça Nelore pode produzir um bezerro por semana através da PIV, isso demonstra a capacidade da associação OPU/FIV em multiplicar de maneira rápida e eficiente animais geneticamente superiores (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Existem fatores técnicos e biológicos que influenciam o resultado da AF. Dentre os fatores biológicos, pode-se citar: freqüência e momento da aspiração

folicular, fisiologia, condição corporal, raça e idade da doadora. Na verdade, estes fatores são reflexos do momento do ciclo estral, do status reprodutivo, da nutrição e dos efeitos do ambiente (PIVATO, 2006).

Um dos estudos pioneiros foi realizado por Chang (1955) utilizando oócitos de coelho. Neste estudo, observou-se que a maturação *in vitro* aparentemente não era afetada pela adição de extratos de pituitária ao meio de cultivo, pelo tamanho do folículo e pelo *status* reprodutivo do animal. Os primeiros trabalhos experimentais em embriologia de mamíferos foram realizados com coelhos, tendo em vista características biológicas favoráveis. O tamanho do oócito relativamente grande facilitou a manipulação, e a ovulação induzida pelo acasalamento foi importante para determinação precisa da idade do embrião (VARAGO *et al.*, 2008). Os ovócitos maturados *in vivo* são mais competentes que os maturados *in vitro* (KASTELIC, 2006).

Em bovinos, tanto a MIV como a FIV dos oócitos é conduzida por 18 à 24h, à temperatura de 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar com umidade saturada, sendo o CO₂ utilizado para controlar o pH dos meios tamponados com bicarbonato. A concentração de oxigênio geralmente não é controlada nestas fases, sendo aproximadamente 20%, o que difere muito da concentração de 5% de O₂ encontrada no trato reprodutivo das fêmeas, ou mesmo do líquido de folículos em crescimento. A alta concentração de oxigênio pode ser tóxica para oócitos e embriões de mamíferos, pela formação de radicais livres e liberação de substâncias tóxicas no meio, baixa concentração de oxigênio (5%O₂) apresenta melhores resultados de produção de blastocistos e também de qualidade dos mesmos, especialmente em sistemas de cultivo desprovidos de células somáticas. O controle da concentração de oxigênio durante a MIV e FIV para níveis próximos aos do trato reprodutivo pode ser uma alternativa para a melhoria do processo de PIV (LEIVAS, 2006).

A atmosfera gasosa com 5% de O₂ é utilizada na tentativa de mimetizar o ambiente encontrado no oviduto e embora 5% de O₂ não aumente os índices de produção quando comparada a sistemas que utilizam o co-cultivo com células somáticas, a mesma está associada à produção de embriões de melhor qualidade (LEIVAS, 2006).

A adequação da concentração de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de

embriões para níveis próximos aos do trato reprodutivo pode ser uma alternativa para incremento na eficiência da produção embrionária (PONTES *et al.*, 2008).

Na maioria dos laboratórios, no processo de fecundação *in vitro* em bovinos usa-se sêmen congelado. No entanto, após a descongelação, é necessário selecionar os espermatozóides vivos e capazes de fecundar. Esta seleção é realizada na maioria das vezes pela separação em gradiente de Percoll, embora outros sistemas possam ser utilizados como o “*swim-up*” ou o lavado espermático. O percoll é composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente descontínuo de duas ou três fases (90, 45 e 30%) para separação espermática (VARAGO *et al.*, 2008).

Após a fusão do espermatozóide com o oócito, ocorre a ativação, evidenciada na maioria dos mamíferos pela exocitose dos grânulos corticais e retomada da meiose. O núcleo espermático se descondensa e transforma-se no pronúcleo masculino. O pronúcleo migra para o centro do oócito, o envelope nuclear se desintegra e ocorre a associação dos cromossomos para a primeira divisão mitótica, a clivagem. Consequentemente inicia-se o desenvolvimento embrionário por sucessivas divisões e alterações morfológicas para a formação de mórulas e blastocistos (VARAGO *et al.*, 2008).

Atualmente, o processo de fecundação *in vitro* na espécie bovina é o que apresenta maior sucesso dentre todas as espécies, sendo que 40% ou mais dos oócitos maturados e fecundados *in vitro* podem se desenvolver até blastocisto, e muitos bezerros já nasceram após a utilização destas técnicas (VARAGO *et al.*, 2008).

Técnicas de preparação de sêmen são usualmente utilizadas na produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos visando melhorar a qualidade espermática após descongelação. Dentre estas técnicas, a centrifugação em gradiente de Percoll tem sido a mais utilizada (CARVALHO *et al.*, 2008).

Terminada a etapa de maturação, os oócitos precisam ser fecundados para que sejam capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto. *In vivo* os espermatozóides necessitam chegar à ampola do oviduto para fecundar o oócito. Durante esse percurso, principalmente no ístmo, glicosaminoglicanos induzem a capacitação dos espermatozóides. A capacitação nada mais é que uma

desestabilização da membrana plasmática, pela remoção de algumas proteínas, sem modificações morfológicas, mas bioquímicas, resultando em uma hiperativação espermática. Esse processo torna possível a ligação do espermatozóide à zona pelúcida, onde ocorre a reação do acrossomo. *In vitro*, para que esse processo ocorra, os meios usados devem fornecer um ambiente adequado. O meio mais usado para fecundação *in vitro* é o FERT-TALP, que contém em sua constituição fatores capazes de promover a capacitação espermática como é o caso da heparina. Outros fatores importantes para a motilidade e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina também estão presentes no meio. O co-cultivo (espermatozóide e oócito) é realizado por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Os espermatozóides viáveis contidos em uma palheta de sêmen precisam ser separados do plasma seminal, crioprotetores, extensores e dos espermatozóides mortos antes de serem co-cultivados com os oócitos. Para bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de PERCOLL e o *swim-up*. Após a separação, os espermatozóides são diluídos a uma concentração final de 1 a 5 x 10⁶ espermatozóides viáveis/ml de meio (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Após o maior entendimento do processo de fecundação em mamíferos, meios capazes de favorecer o crescimento embrionário até o estágio de blastocisto começaram a ser desenvolvidos. Em 1967, um primeiro trabalho demonstrou que zigotos de rata evoluíam até o estágio de duas células embrionárias na presença de lactato e piruvato. Um ano depois, Whitten e Biggers obtiveram desenvolvimento de embriões em um meio simples, sem o aporte de substâncias macromoleculares de origem materna. No entanto, durante o cultivo, muitos embriões paravam o desenvolvimento entre duas e 16 células dependendo da espécie estudada. Anos mais tarde esta parada foi denominada de bloqueio do desenvolvimento embrionário, que corresponde até hoje a uma resposta embrionária aos efeitos adversos ou carenciais do sistema de produção no momento da transição do genoma materno para o embrionário. Na espécie bovina, os embriões sofrem bloqueio no estágio de oito células (VARAGO *et al.*, 2008).

O aperfeiçoamento dos sistemas de cultivo *in vitro* (CIV) permitiram o avanço

de outras biotécnicas tais como a clonagem e a manipulação de genes. No entanto, o gargalo da PIV está na baixa produção e qualidade de embriões, em consequência da deficiência dos processos *in vitro* para uma adequada maturação citoplasmática do oócito, dificultando os processos de preservação dos oócitos e embriões e, conseqüentemente, a implantação em sistemas de produção animal. Estudos básicos da regulação da maturação de oócito são essenciais para a geração de conhecimentos necessários para o aumento dos índices de produção de embriões *in vitro* (GONÇALVES *et al.*, 2007).

O momento crítico para o desenvolvimento embrionário inicia logo após a fecundação quando o cromossomo feminino reinicia a segunda meiose para formar o pró-núcleo feminino. O embrião, em sua fase inicial de desenvolvimento, é dependente do material genético materno acumulado durante a maturação citoplasmática. Essa fase dura até a ativação do genoma embrionário, a qual ocorre, em bovinos, no estágio de 8-16 células e é conhecida como “transição maternozigótica” (MZT). A transcrição deficiente do genoma embrionário durante essa fase leva ao bloqueio do desenvolvimento em várias espécies. Esse fato foi um dos principais entraves da produção *in vitro* de embriões bovinos nas décadas de 60 e 70, entretanto esta dificuldade contribuiu para o desenvolvimento dos sistemas de cultivo embrionário (GONÇALVES *et al.*, 2007).

O tempo de cultivo *in vitro* varia de sete a nove dias, dependendo do objetivo da rotina de PIV, em temperatura de 39°C com atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada. A taxa de blastocisto geralmente é avaliada no sétimo dia de cultivo *in vitro* sendo que, os blastocistos produzidos podem permanecer na estufa de cultivo até o nono dia caso se deseje avaliar a taxa de eclosão *in vitro* (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Antes mesmo da descoberta do bloqueio embrionário, em 1955, Averill e colaboradores reportaram a possibilidade de cultivar embriões ovinos utilizando a transferência de embriões no estágio de duas ou quatro células para o oviduto de coelhas. Em bovinos, este fato só foi reportado anos mais tarde, quando foi comprovado que embriões bovinos em estágio inicial de desenvolvimento poderiam ser cultivados até a fase de blastocisto fora do ambiente uterino de fêmeas bovinas. Assim

como na espécie ovina, estes trabalhos foram realizados utilizando a transferência dos embriões para a tuba uterina de coelhas (VARAGO *et al.*, 2008).

As células somáticas do folículo ovariano, particularmente as células do cumulus (CCs), desempenham um papel chave na aquisição de competência de desenvolvimento do oócito *in vivo* (GILCHRIST, 2008).

No co-cultivo com células somáticas, o meio de cultivo deve ser bastante rico, pois as células somáticas irão competir com os embriões pelos nutrientes. O benefício da adição das células somáticas está na produção de fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal - EGF, fator de crescimento tumoral α - TGF α e fator de crescimento tumoral β 1 - TGF β 1), na remoção de componentes inibitórios do meio de cultivo como radicais livres, metabólitos celulares, amônia e outros. No entanto, os compostos secretados pelas células apresentam concentração variada e nem sempre é possível identificá-los, podendo ocorrer alteração dos nutrientes presentes no meio, o que impede a avaliação da relação dos componentes e as exigências do embrião. Por esta razão, na década de 90, o co-cultivo foi sendo substituído por outros meios de cultivo. Surgiram meios quimicamente definidos simples, como o Hamster Embryo Culture Medium (HECM), ou complexos como o TCM-199 (Tissue Culture Medium). Ambos sem a adição de soro. Dentre os meios testados, os melhores resultados com relação ao desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto ocorreram em meio denominado Synthetic Oviductal Fluid (SOF), baseado no fluido do oviduto de ovelhas (VARAGO *et al.*, 2008).

A maioria dos laboratórios tem utilizado o cultivo de embriões em meios semi-definidos com pouco ou nenhum soro e baixa tensão de oxigênio (5% de O₂ em comparação aos 20% encontrados no ar atmosférico), sem co-cultivo em células somáticas. A atmosfera de cultivo, diferentemente daquela usada na maturação e na fecundação *in vitro*, passa a ser 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ e umidade saturada a 39°C. Entre os fatores benéficos da baixa tensão de O₂ no meio de cultivo *in vitro* pode-se destacar o aumento do diâmetro embrionário, do número de células da massa celular interna, da transformação de mórula para blastocisto e de blastocisto expandido para eclodido, melhora no aspecto geral do embrião, além da menor espessura da zona pelúcida, o que facilita a eclosão do embrião (VARAGO *et al.*, 2008).

A MIV é uma tecnologia muito importante, uma vez que tem o potencial de captar a vasta oferta de oócitos dentro de um ovário. Em animais domésticos, a produção de embriões a partir de ovários não estimulados usando oócito MIV é uma prática muito difundida e é uma importante plataforma tecnológica para reprodução artificial, clonagem e produção de animais transgênicos (GILCHRIST, 2008).

O cultivo pode se estender até o sétimo dia após a fecundação *in vitro*, quando é realizada a seleção e a avaliação dos embriões para a transferência ou criopreservação. Para avaliação da taxa de eclosão ou da qualidade embrionária, principalmente pela determinação do número e viabilidade de blastômeros, o cultivo *in vitro* pode se estender até o 8º ou 9º dia após a fecundação *in vitro* (VARAGO *et al.*, 2008).

Geralmente, é esperado que, após a maturação *in vitro*, aproximadamente 90% dos oócitos submetidos à maturação atinjam a metáfase II com expulsão do primeiro corpúsculo polar. Destes, 80% são fecundados e começam a se dividir, pelo menos até o estágio de duas a quatro células. No entanto, apenas 25 a 40% destes embriões alcançam o estágio de blastocisto ou blastocisto expandido. Este fato mostra que o cultivo *in vitro* é o principal passo a determinar a eficiência do sistema e que muito deve ser feito para a melhoria dos resultados (VARAGO *et al.*, 2008).

Os antibióticos são amplamente utilizados na medicina veterinária, principalmente nos sistemas de cultivo para a produção animal. O mecanismo de ação dos antibióticos é exercido essencialmente por: interferência na síntese da parede celular, inibição da síntese de proteínas; lesão à membrana citoplasmática; inibição da síntese de ácidos nucleicos e da síntese de metabólitos essenciais. Dentre os vários antibióticos conhecidos e utilizados na produção *in vitro* de embriões, a gentamicina e o sulfato de amicacina são os mais utilizados nos meios de transporte de oócitos, meios de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* (VILA *et al.*, 2008).

O cultivo embrionário *in vitro* varia de sete a nove dias a 39°C, atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada. A taxa de blastocisto geralmente é avaliada no sétimo dia após a fecundação sendo que, os blastocistos podem permanecer na estufa até o 9º dia para avaliar a taxa de eclosão *in vitro* (GONÇALVES, *et al.*, 2008; PONTES *et al.*, 2008).

Os índices atuais de blastocistos obtidos com a técnica de produção *in vitro* de embriões giram em torno de 20 a 50% (média de 35%). Cada fêmea bovina é capaz de produzir 50 a 100 embriões/ano, com um regime de duas punções semanais por doadora, durante vários meses. Ainda que satisfatórios esses resultados estão aquém do que a técnica é capaz de fornecer. O aumento da eficiência da PIV está condicionado ao desenvolvimento de trabalhos que visem aperfeiçoar e simplificar as condições de cultivo durante as várias etapas do processo, principalmente no que se refere à maturação *in vitro* de oócitos. (GONÇALVES *et al.*, 2007).

As taxas de gestação obtidas a partir de embriões produzidos *in vitro* podem ser bastante variáveis. Esta variação está associada à qualidade do embrião, o que, por sua vez, depende das condições de produção de cada laboratório. Além disso, como na transferência de embriões (TE), o estado reprodutivo e nutricional das receptoras também interfere nos resultados. Os índices de gestação aos 60 dias têm variado entre 20 e 60% de acordo com cada equipe de trabalho (VARAGO *et al.*, 2008).

2.3 Vitaminas

William Fletcher estava pesquisando as causas da doença Beribéri quando descobriu que comer arroz integral impedia Beribéri e comendo arroz polido. Fletcher acreditava que havia nutrientes especiais contidas na casca do arroz. O bioquímico Inglês Sir Frederick Gowland Hopkins descobriu também que os fatores de determinados alimentos são importantes para saúde (SEN *et al.*, 2006).

Em 1912, o cientista polonês Cashmir Funk chamou de peça especial nutricional dos alimentos. Vitamine foi mais tarde abreviada para vitamina, quando se descobriu que nem todas as vitaminas contêm nitrogênio, e, portanto, nem todas são aminas. Juntos, Hopkins e Funk formularam a hipótese da deficiência de vitaminas poder fazer pessoas doentes. A vitamina E foi descoberta em 1922 em folhas verdes de legumes por pesquisadores da Universidade da Califórnia, Herbert Katherine Evans e Bishop. Foi cientificamente chamado tocoferol, isso vem da palavra grega que significa

tokos parto, e phero sentido de trazer à luz, eo final ol foi adicionada para indicar as propriedades desta molécula de álcool. Em 1936, foi descoberto que a vitamina E era abundante em trigo óleo de gérmen (SEN *et al.*, 2006).

Durante o processo de oxidação celular pode ocorrer a reação em cadeia que se inicia com ataque de um radical livre nos fosfolipídios da membrana, levando à formação de um radical lipídio que reage com oxigênio da molécula tornando-se radical peroxil. Este radical formado ataca outra ligação dupla do fosfolipídio de membrana, que reage com oxigênio e assim propaga a reação de destruição da membrana em cadeia (SALES, 2005).

2.3.1 Vitamina A

Apesar de existir mais de 600 diferentes carotenóides, apenas 10% são precursores da vitamina A, sendo o β -caroteno a forma mais ativa e disponível na dieta. As plantas não produzem vitamina A, que é encontrada somente no reino animal, mas produzem grande variedade de seu precursor, os carotenóides. Uma unidade internacional (IU) de β -caroteno é definida como a atividade de 0,6 μ g de β -caroteno que corresponde a 0,3 μ g de retinol (vitamina A) (SALES, 2005).

Vitamina A é geralmente complementada em dietas de ruminantes, para garantir o máximo de saúde e produtividade. Infelizmente o retinol suplementar é destruído pelos microorganismos ruminais. A quantidade de concentrado em uma dieta é um fator associado à destruição ruminal. Existe uma perda de 80% de vitamina A quando os bovinos foram alimentados com dietas de 70% de concentrado, mas quando alimentados dietas ricas em forragens, as perdas foram apenas 20% (ALOSILLA *et al.*, 2006).

O uso da dieta e caroteno em reprodução levou por vezes contraditórias explicações para a sua função e benefícios. Os resultados publicados anteriormente não mostraram um efeito da vitamina independente de p-caroteno sintético sobre a fertilidade de coelho (BESENFELDER *et al.*, 1996).

A vitamina A tem muitas funções, incluindo a manutenção das células epiteliais, visão, regulação gênica, e função de células imunes. Os requerimentos diários de vitamina A para vacas adultas é de 76 UI / kg de peso vivo, sendo baseado na eficiência reprodutiva. Uma vaca em lactação pode consumir de 4000 a 400.000 UI de vitamina ao dia, a partir de ingredientes básicos. O fator de conversão de 1 mg de beta-caroteno = 400 UI de vitamina A (WEISS, 1997).

Em estudos *in vitro* ruminal, encontrou-se que 67 a 72% do retinol foi destruído no prazo de 12 h de incubação em líquido ruminal, obtido a partir de bovinos alimentados com 50 ou 70% de dietas ricas em concentrado, a destruição foi de 16 a 20% quando o líquido ruminal foi obtido de gado que tinha sido alimentado com alta (> 75%) dieta de forragem (WEISS, 1997).

Retinóides regulam o desenvolvimento e diferenciação dos blastocistos bovinos *in vitro*, através do envolvimento dos receptores de retinóide X (RXRs). Agonistas de RXR podem ser utilizadas para controlar o desenvolvimento de blastocistos e de diferenciação.

A aplicação de 1.000.000 UI de vitamina A em vacas superovuladas não afetou a taxa de ovulação ou embriões total recuperado, mas aumentou a média número de alta qualidade (graus 1 e 2; 4,25 vs 1,86, P = 0,01) e total de embriões transferíveis (Grades 1, 2 e 3; 5,87 vs 3,13, P = 0,04). O número médio de blastocistos foi maior para grupo tratado com Vitamina A (2,25 vs ,73; P = 0,02). A vitamina A pode melhorar a qualidade do embrião sem afetar a taxa de ovulação em bovinos superovuladas (SHAW *et al.*, 1995).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o efeito da vitamina A no início da embriogênese, incluindo seus efeitos sobre a esteroidogênese, o crescimento e maturação folicular, efeitos diretos sobre o concepto e alterações sobre a atividade secretora uterina (SHAW *et al.*, 1995).

Babaei *et al.* (2006) relataram evidências de que a vitamina A é administrada de forma sistêmica pode aumentar o potencial de desenvolvimento de blastocistos em cultura e é capaz de reduzir os efeitos adversos da vitrificação, pelo menos durante os primeiros dois dias de cultivo em embriões murinos.

A vitamina A tem sua ação sobre as células da granulosa do folículo ovariano

(SALES, 2005). As células foliculares, ou seja, as células da granulosa e do “*cumulus oophorus*” têm um papel importante durante a aquisição da competência oocitária na maturação *in vitro* (VARAGO *et al.*, 2008) e *in vivo* (GILCHRIST, 2008). A origem folicular do oócito tem influência significativa sobre o seu potencial de desenvolvimento (LONERGAN, 2007) (FEUGANG *et al.*, 2009). Vários fatores podem afetar o sucesso da maturação oocitária, entre eles pode-se citar a morfologia do complexo *cumulus-oócito* (CCO), as condições de maturação e a competência do oócito (DODE, 2005).

Estudo indica que o desequilíbrio da função imune estava presente no gado JB com baixos níveis séricos de VA durante a fase de engorda (YANO *et al.*, 2009).

O estresse térmico em vacas holandesas não afetou as concentrações de α -tocoferol, β -caroteno, retinol, palmitato de retinol, ou quantidade total de proteínas ou concentrações plasmáticas de malondialdeído no músculo (TROUT *et al.*, 1998).

A baixa concentração de β -caroteno no plasma (1,53 +/-0,14 mg/L), durante o período pré-parto está associada a anovulação durante a primeira onda folicular pós-parto (KAWASHIMA *et al.*, 2009). Demonstrando assim a importância de níveis mínimos de retinol no plasma e líquido folicular para o desenvolvimento folicular até a ovulação.

2.3.2 Vitamina E

A deficiência de vitamina E foi descrita pela primeira vez, na Universidade da Califórnia em Berkeley em 1922, por Evans e Bishop durante as investigações de infertilidade em ratos, alimentados com banha rançosa. Em 1936, Evans e seus colegas isolaram um fator que impediu que os sintomas de deficiência de vitamina E e nomeou de tocoferol. No ano seguinte, outros tocoferóis foram isolados a partir de óleos vegetais, mas estes tinham baixa atividade biológica. Esta foi a primeira descrição de diferentes formas naturais de vitamina E. A existência de oito diferentes formas naturais, todos com atividades antioxidante relativamente potente, tem suscitado interesse a função desta vitamina (TRABER *et al.*, 1999).

A auto-oxidação de moléculas biológicas por oxigênio molecular, tais como

lipídios, proteínas e DNA, é aceito no desenvolvimento de inúmeros eventos patológicos, tais como câncer e até mesmo os processos de envelhecimento. Tal oxidação geralmente procede por uma cadeia de radicais livres mediados mecanismo e da cadeia de quebra de antioxidantes, tais como a vitamina E, suprimir a oxidação e proteger as moléculas biológicas e de tecidos de dano oxidativo. A vitamina E é uma descrição genérica para todos os tocoferóis (TOC) e tocotrienóis (Toc-3) de derivados. Ambos os tocoferóis e tocotrienóis tem quatro isômeros, designado α , β , γ e δ . O α -tocoferol é a vitamina E que in vivo exerce a maior atividade biológica (YOSHIDA *et al.*, 2003; SEN *et al.*, 2006; SEN *et al.*, 2007). Tocoferóis estão presentes em vegetais poliinsaturados, óleos e no gérmen de sementes de cereais, enquanto tocotrienóis são encontrados na aleurona e subaleurone camadas de sementes de cereais e de óleos de palma (YOSHIDA *et al.*, 2003).

A

atividade antioxidante de α -tocoferol na prevenção de radicais livres, que iniciam danos teciduais, é aceito pela maioria dos pesquisadores e acredita-se ser o limpador primário de radicais livres nas células dos mamíferos (JEONG *et al.*, 2006).

A atividade antioxidante de α -tocoferol e ácido ascórbico variam de acordo com as condições. Por exemplo, em concentrações mais elevadas, essas duas vitaminas têm efeitos tóxicos de embriões produzidos in vitro em um sistema de cultura de embriões de camundongos. Embora o ácido ascórbico induzida morte celular por apoptose em altas concentrações, possivelmente através de sua ação pró-oxidante em concentrações mais baixas, que ela tem propriedades antioxidantes, impedindo tanto espontâneas como apoptose induzida por estresse. Portanto, a terapia antioxidante pode ter efeitos negativos e indesejáveis se uma dose limiar segura for superada (JEONG *et al.*, 2006).

A maior porcentagem de blastocistos suínos, obtidos através de FIV, ocorreu com o uso de α -tocoferol nos meios de cultivo, com 100mM (32,4%) em relação a 50mM (28,6%), 200mM (21,4%) comparado com o controle (17,6%). O estudo avaliou os efeitos dos suplemento de antioxidantes sobre a produção de embriões in vitro suínos seguido por FIV, melhorando a frequência de formação de blastocisto. O α -tocoferol sozinho ou em conjunto com o ácido ascórbico melhoraram a qualidade do

blastocisto com a redução da apoptose dos blastômeros. Vários antioxidantes têm sido utilizados para complementar em meios de cultura *in vitro*, especialmente α -tocoferol e ácido ascórbico, os presentes resultados confirmaram dose dependente dos efeitos benéficos de um suplemento antioxidante (JEONG *et al.*, 2006).

A vitamina E é um potente limpador peroxil radical e pode proteger ácidos graxos poliinsaturados dentro de fosfolipídios das membranas biológicas e no plasma lipoproteínas. Quando a vitamina E reage com um radical peroxil, ele forma um radical tocopheroxyl. São oito diferentes formas naturais de vitamina E. Essas diferentes formas têm funções específicas (TRABER *et al.*, 1999).

A absorção da vitamina E a partir do lúmen intestinal é dependente de processos necessários para a digestão e absorção de gordura em enterócitos. Os ácidos biliares e ácidos graxos livres são componentes importantes para a formação de mistura micelas, que contenham produtos de lipólise e de atingir estes junto com a vitamina E para enterócitos. Na verdade, os ácidos biliares são essenciais para a absorção de vitamina E, e deficiência de vitamina E ocorre em humanos com doença hepática colestática porque lhes falta a capacidade para secretar ácidos biliares. Esterases pancreáticas, necessárias para a liberação de ácidos graxos livres da dieta triglicerídeos, também são necessários para a clivagem hidrolítica de ésteres de tocoferol, uma forma comum de síntese da vitamina E na dieta suplementos (TRABER *et al.*, 1999).

A vitamina E é transportada em lipoproteínas do plasma de uma maneira inespecífica. No plasma, proteínas específicas de transporte de vitamina E foram descritos.

Devido à sua baixa absorção intestinal, a principal via de excreção do ingerido vitamina E é a eliminação fecal (TRABER *et al.*, 1999).

O tocotrienol tem uma melhor ação antioxidante. Além disso, tocotrienol tem demonstrado possuir efeitos hipocolesterolêmico, tem sido sugerido para ter um anti-trombótico e efeito anti-tumoral, indicando que pode servir como um agente eficaz na prevenção e / ou tratamento de doenças cardiovasculares, câncer (THERIAULT *et al.* 1999) e inibe fortemente a adesão das plaquetas. O efeito de antiadesivo parece estar relacionada com uma redução no número e tamanho dos pseudópodos (SEN *et al.*,

2007). As atividades fisiológicas de tocotrienol sugerem ser superiores as do α -tocoferol em muitas situações (THERIAULT *et al.*, 1999).

Peroxidação de lipídios de membrana é conhecida por modificar e inativar componentes celulares que podem ter danos efeitos sobre os fatores cruciais celulares que levam à doença (THERIAULT *et al.*, 1999).

A administração oral de tocotrienóis resultou na supressão significativa do fígado e do pulmão carcinogênese em camundongos poderia ser agentes promissores para a prevenção do câncer (WADAA *et al.*, 2005).

A apresentação natural de vitamina E é a mistura de duas classes de compostos, tocoferóis e tocotrienóis. Cevada, arroz farelo de aveia e óleo de palma tem sido relatada ser rica em tocotrienol. A diferença estrutural entre tocoferóis e tocotrienóis é que os tocoferóis têm um saturados de cadeia fitilo e tocotrienóis ter um insaturados de cadeia fitilo. A concentração de tocotrienóis no plasma e tecidos, exceto adiposo tecidos, é menor do que a de tocoferóis em humanos e outros animais após a administração oral. O acúmulo de tocotrienóis nas células foi muito superior tocoferóis; essa poderia ser uma das razões que tocotrienóis terem efeito mais significativo do que físico tocoferóis (YOSHIDA *et al.*, 2003).

A vitamina ocorre naturalmente em alimentos e em animais, bem como em tecidos humanos, possivelmente atuando como uma molécula de armazenamento, como uma forma de transporte, ou como mensageiro lipídicos para a modulação da transdução de sinal e expressão gênica (ZINNGG, 2007).

Tocoferóis e tocotrienóis são metabolizados pela degradação da cadeia lateral iniciado pelo citocromo P450 (CYP)- α -hidroxilação catalisada seguido de β -oxidação. Considerando que o tocoferol é apenas fracamente metabolizado, grandes quantidades de produtos finais, hydroxychroman carboxietil (CEHC), são encontrados a partir de outros colos em células HepG2 e na urina humana. Todas as formas de vitamina E, são metabolizados antes de ser excretada na urina como conjugados com ácido glucurônico ou sulfato (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2003).

Nenhum efeito sinérgico foi observado no desenvolvimento do embrião suíno em suplementação nos meios de MIV em um único suplemento de α -tocoferol. Embora, o percentual de blastocisto superior nos suplementados em comparação com o grupo

controle, nenhum outro efeito benéfico foi observado em comparação com α -tocoferol ou ácido L-ascórbico sozinho. Os resultados demonstraram que os efeitos embriotóxicos do α -tocoferol e/ou ácido ascórbico, em termos de frequência de formação de blastocistos e número de células do blastocisto, depende da concentração e da suplementação (HOSSEIN *et al.*, 2007).

A injeção intramuscular de 500 mg de vitamina E e 50mg selênio antes do parto e no pós-parto 30 e 80 d não afetou as concentrações de α -tocoferol e não melhorou a o plasma em relação ao grupo controle, não teve resultado diferente para inseminações feitas no frio e também para a taxa de primeiro e segundo serviço. Dentro de intervalo de 14 dias de suplementação oral, observam-se alterações na concentração de alfa-tocoferol (PAULA-LOPES *et al.*, 2003).

3 JUSTIFICATIVA

A carência de material científico correlacionando a importância do uso parenteral das vitaminas A e E na reprodução animal é um fato reconhecido cientificamente. Buscamos determinar mudanças e adequações aos protocolos existentes no manejo de doadoras de oócitos bovinos, com o emprego da vitamina A e E visando à melhoria qualitativa e quantitativa dos oócitos e embriões.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Investigar os efeitos das vitaminas A e E administradas de forma parenteral em uso combinado em vacas doadoras de oócitos, na qualidade e quantidade oocitária e embrionária;

Melhorar a PIV aumentando a qualidade e número de embriões colhidos;

Proporcionar uma maior difusão e utilização desta técnica como ferramenta de melhoramento genético do rebanho bovino brasileiro.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar as alterações quantitativas dos *oócitos* obtidos de doadoras tratadas com a vitamina A e E parenteral;

Analisar as alterações quantitativas dos *embriões* obtidos de doadoras tratadas com a vitamina A e E parenteral;

Observar as alterações quantitativas dos *oócitos* obtidos de doadoras tratadas com a vitamina A e E parenteral em relação a raça (Simental, Nelore, Brahma e Gir);

Avaliar as alterações quantitativas dos *embriões* obtidos de doadoras tratadas com a vitamina A e E parenteral em relação a raça (Simental, Nelore, Brahma e Gir).

5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.1 Local do experimento

Os experimentos foram realizados na empresa Embriotec Reprodução Animal Ltda, que está localizada a sete quilômetros da Br153 km18, na zona rural no município de Anápolis – Goiás. É uma empresa que há onze anos presta serviços na área de Colheita de Sêmen e Transferência de Embriões em toda região Centro-Oeste e desde 2006 trabalha também com produção in vitro de embriões.

5.2 Aspectos éticos

Os experimentos foram submetidos ao Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará. Todos os cuidados foram tomados na preservação da saúde dos animais, dos pesquisadores e demais profissionais envolvidos neste trabalho e do meio ambiente nas áreas onde se realizou o projeto de pesquisa. Esses cuidados incluem instruções de segurança no manejo de produtos e técnicas biológicas de prevenção de acidentes em laboratórios e acondicionamento correto do material a ser descartado.

5.3 Fluxograma



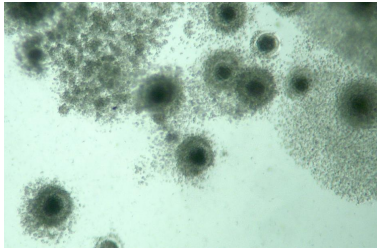
DOADORA
DE OÓCITOS



ASPIRAÇÃO
FOLICULAR



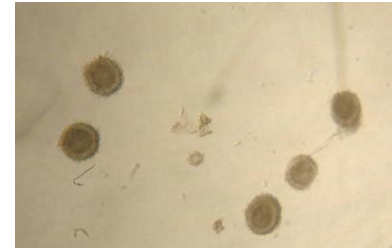
PROCURA E SELEÇÃO
DE OÓCITOS



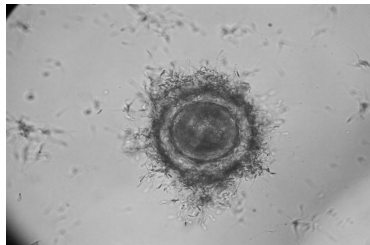
MATURAÇÃO
DE OÓCITOS



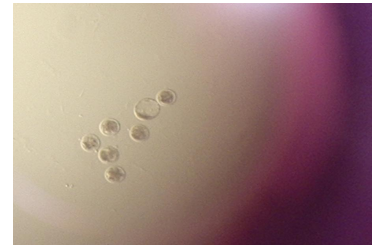
TRANSPORTE
DE OÓCITOS



CLASSIFICAÇÃO
DE OÓCITOS



FERTILIZAÇÃO
DE OÓCITOS



CULTIVO DE
EMBRIÕES

5.4 Animais experimentais

Animais da espécie Bovina (n=22), sexo feminino, sendo dois da raça Simental, quatro da raça Nelore (Figura 2), cinco da raça Brahma e onze da raça Gir (Figura 3). Estas vacas fizeram parte do grupo de doadoras de oócitos trabalhadas pela Embriotec Reprodução Animal Ltda, onde ocorreu toda a parte experimental deste projeto.

As vacas tinham 450 a 600 Kg de peso vivo e idade de três a oito anos, estavam sem produzir leite e não estavam gestantes. Para entrarem no experimento, as doadoras não apresentavam anormalidades ginecológicas detectadas por palpação retal e exame ultrasonográfico.

Foram mantidas em piquetes de capim (*Brachiaria decumbens* e coast cross) e suplementadas com ração balanceada. Água e sal mineral foram fornecidos à vontade durante o período do experimento.

As vacas estavam com escore corpóreo entre 3,5 e 4 (escala de 1 a 5). As fêmeas tinham identificação individual e fichas próprias, foram previamente examinadas quanto à saúde geral.



Figura 2 - Doadoras de óocitos da raça Nelore.



Figura 3 - Doadoras de óocitos da raça Gir.

5.5 Apresentação das Vitaminas

A apresentação da vitamina A, foi o produto comercial Monovin A[®], 10 mL correspondente a 1.000.000 UI de vitamina A, onde foi utilizado para aplicação única após a primeira sessão de aspiração folicular.

A apresentação da vitamina E, foi o produto comercial Monovin E[®], correspondente a 1g de vitamina E, onde foi utilizado 10 mL para aplicação única após a primeira sessão de aspiração folicular.

5.6 Fases experimentais

As 22 doadoras de oócitos foram utilizadas em duas fases distintas, com tratamentos diferenciados apenas para a presença ou não de vitaminas. Sendo uma fase de pré-tratamento e outra de pós-tratamento.

- **Fase Pré-tratamento = F1:** Quando as 22 fêmeas não foram submetidas à aplicação de vitaminas A e E.

- **Fase Pós-tratamento = F2:** Quando as 22 fêmeas foram submetidas à aplicação de vitaminas A e E.

5.7 Metodologia experimental

As doadoras de oócitos foram analisadas em duas fases, em relação à aplicação ou não das vitaminas A e E, totalizando 44 aspirações foliculares e 42 produções de embriões *in vitro*.

Na fase de pré-tratamento (n=22), os animais foram submetidos a sessão de aspiração folicular sem aplicação prévia das vitaminas A e E.

Na fase de pós-tratamento (n=22), os animais utilizados foram os mesmos da fase de pré-tratamento, que logo após a primeira aspiração receberam as aplicações das vitaminas, e após 12 dias foram submetidos à nova sessão de aspiração folicular.

Os oócitos provenientes da fase de pré-tratamento e pós-tratamento foram destinados ao processo de maturação/fertilização e cultivo embrionário.

5.8 Aspiração folicular

O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se equipamento de ultra-som Aloka SSD-500 com transdutor microconvexo de 5 mHz (UST 974-5) conectado a guia de biópsia adaptado por Chuck Bolland, com agulhas 18 G, (Cook VBOAS 1855) e linha de aspiração (Cook VBOA 18L) em tubos de centrífuga de 50 mL. A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba de vácuo, ajustada entre 72 e 78 mmHg (Figura 4 e 5).

Para evitar movimentos peristálticos e desconforto ao animal foi efetivada anestesia epidural com 5 mL de Lidocaína a 2% (Pearson[®]) e em seguida o transdutor foi inserido até o fundo vaginal e, com o auxílio da manipulação transretal, os ovários foram posicionados para obtenção de uma boa visualização na tela do ultra-som. Os folículos a serem aspirados foram posicionados no percurso da linha de punção indicada na tela do ultra-som e quando a agulha se aproximou do folículo a ser aspirado, o pedal da bomba de vácuo foi pressionado e o folículo aspirado, o mesmo procedimento foi repetido em todos os folículos visíveis de cada ovário. A lavagem da agulha e o meio de recebimento dos oócitos foi composto de DPBS (Dulbecco Modificado - Nutricell) acrescido de 5,0 UI/mL de heparina sódica (Liquemine[®]) e 50 mg/mL de Gentamicina (Gentocin[®]) (RENESTO, 2004).



Figura 4 - Bomba de vácuo.

Após a aspiração folicular referência (OPU 1) as mesmas fêmeas foram tratadas com a aplicação intramuscular profunda da vitaminas A (1.000.000 UI de acetato de retinol, Monovin[®] A, Laboratório Bravet[®]) e vitamina E (1g de acetato de α -tocoferol, Monovin[®] E, Laboratório Bravet[®]) e aspiradas novamente (OPU 2) após 12 dias.



Figura 5 - Doadora de óocitos da raça Nelore em processo de aspiração folicular.

5.9 Manipulação de óocitos

5.9.1 Lavagem e seleção dos oócitos

O material aspirado foi transferido para o filtro de colheita de embriões (EmCom®) e lavado com a mesma solução utilizada na aspiração. O sedimento restante no filtro foi observado em placas de *Petri* (100x20mm) e efetuado a busca e contagem dos oócitos e posterior classificação da qualidade (Figura 6) (RENESTO, 2004).



Figura 6 - Fotomicrografia de oócitos em placa de petri, momentos após a aspiração folicular. Observa-se oócitos circundados de células da granulosa. Oócito (seta branca), células da granulosa (seta vermelha). Aumento de 40x.

Os oócitos foram classificados de acordo com sua morfologia (número de camadas de células do *cumulus* e aspecto do citoplasma) em graus I, II e III (GI, GII e GIII), oócitos sem *cumulus* (s/c), expandidos (exp), degenerados (deg) e atrésicos (atr), segundo LONERGAN (1992). Os oócitos considerados viáveis foram classificados como GI, GII e GIII, lavados em solução TCM 199 HEPES (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 50 µg de gentamicina, 2,2 µg de piruvato e transportados em criotubos (Corning®) contendo meio de maturação em banho Maria a 35°C (RENESTO, 2004).

5.9.2 Transporte dos oócitos

Os oócitos foram transportados em meio de maturação composto por meio TCM 199 Bicarbonato, suplementado com 10% SFB, 50UI de hCG/mL, 0,5 µg/mL de FSH, 1µg/mL de estradiol, 2,2µg/mL de piruvato, 70 µg/mL de amicacina em atmosfera de 5% de CO₂ e 5% de O₂ (Figura 7). O tempo médio de transporte variou de seis a oito horas, não ultrapassando oito horas do início da aspiração na primeira vaca até a chegada dos oócitos ao laboratório (RENESTO, 2004).



Figura 7 - Acondicionamento de oócitos para transporte.

5.9.3 Maturação *in vitro* (MIV)

Chegando ao laboratório os oócitos foram lavados três vezes em meio de lavagem TCM-199 Hapes, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 70 μg de amicacina. Em seguida, foram transferidos para placas de *Petri* (100x20mm), em microgotas de 100 μL de meio de maturação, que consistiu de meio TCM 199 Bicarbonato, suplementado com 10% SFB, 50UI de hCG/mL, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FSH,

1 μ g/mL de estradiol, 2,2 μ g/mL de piruvato, 70 μ g/mL de amicacina. Os oócitos permaneceram incubados por 24 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar (RENESTO, 2004) (Figuras 8, 9 e 10).



Figura 8 - Estufa de maturação oocitária.



Figura 9 – Fotomicrografia de oócitos após maturação *in vitro*. Observa-se um oócitos circundados de células da granulosa expandidas. Oócito (seta branca), células da granulosa (seta vermelha). Aumento de 20x.

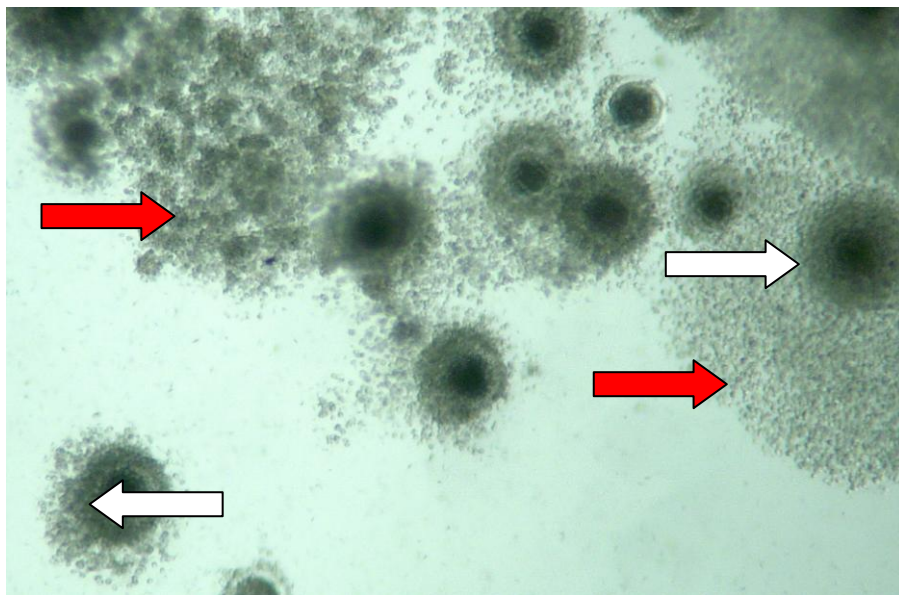


Figura 10 - Fotomicrografia de oócitos após maturação *in vitro*. Observa-se um oócitos circundados de células da granulosa expandidas. Oócito (seta branca), células da granulosa (seta vermelha). Aumento de 20x.

5.9.4 Fecundação *in vitro* (FIV)

Os oócitos maturados foram lavados três vezes em meio de fecundação TALP-FIV e transferidos para microgotas de 100 μ L de meio de fecundação Tyrode modificado (TALP). O sêmen congelado foi separado em Gradiente de Percoll 90 e 45%, submetido a uma força de centrifugação de 900g durante 30 minutos. O sedimento foi recuperado e avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides vivos por mL, de modo que, ao adicionar 4 μ L do sêmen em cada microgota de 100 μ L de meio TALP-FIV-Gotas, obteve-se a concentração final de 100×10^3 espermatozoides vivos por gota. Posteriormente, foram incubados em temperatura de 39°C por 18 a 20 horas, com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, para a fecundação (Figura 11) de acordo com Renesto (2004).

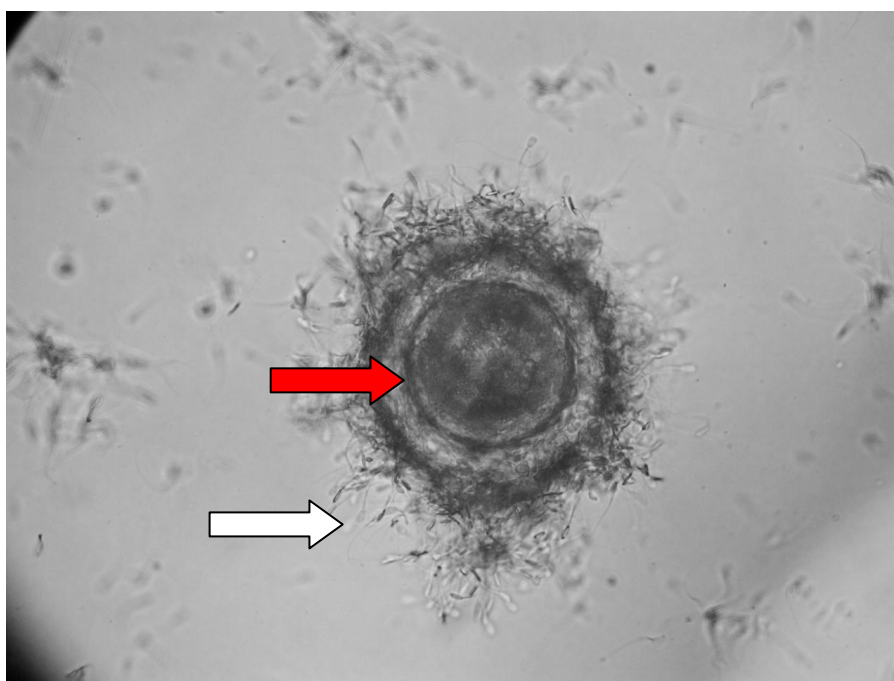


Figura 11 - Fotomicrografia de Oócito em processo de fecundação *in vitro*. Observa-se um oócito circundado de espermatozoides. Espermatozoides circundando oócito (seta branca), oócito sendo fecundado (seta vermelha). Aumento 60x.

Fonte: Gentileza de Regivaldo Vieira de Souza.

Após 168h da FIV foi realizada a classificação dos embriões viáveis em Bi (blastocisto inicial), BI (blastocisto), Bx (blastocisto expandido) e Be (blastocisto eclodido) (VILA et al, 2008) (Figura 12).

5.9.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após o tempo de fecundação, os zigotos foram lavados por três vezes em meio synthetic oviductal fluid (SOF) e as estruturas transferidas para microgotas com 100 μ L de meio de cultivo, recobertas por óleo mineral, permanecendo nestas por um período de seis a oito dias até os zigotos atingirem os estádios de mórula (Mo) e blastocisto (BI). O meio de cultivo foi renovado em cada microgota no terceiro e quinto dia (*feeding*) e no sexto e sétimo dia foi observado o desenvolvimento embrionário (RENESTO, 2004) (Figura 12).

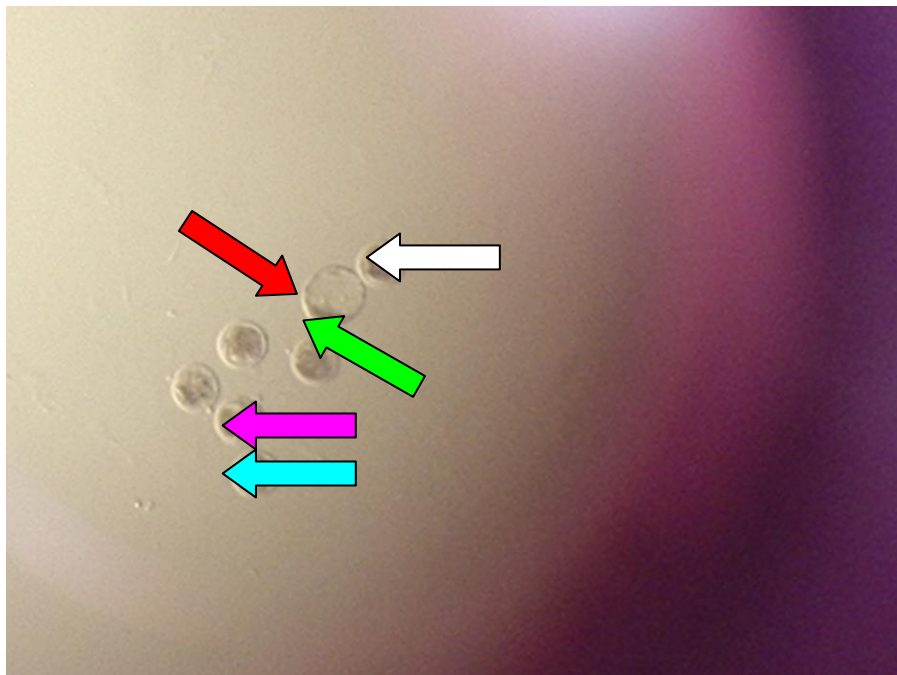


Figura 12 - Fotomicrografia de embriões em processo de cultivo *in vitro*. Observa-se embriões em estágio de mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto expandido. Zona pelúcida de uma mórula compacta (seta branca), blastocele de um blastocisto expandido (seta vermelha), botão embrionário de um blastocisto expandido (seta verde), blastocisto inicial (seta rosa) e mórula compacta (seta azul).

A temperatura no cultivo de embriões utilizada foi de 38,5°C, podendo variar de 38,5°C como utilizado por Vila e colaboradores (2008) ou 38,8°C como relatado por Pontes e colaboradores (2008).

5.10 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram analisados segundo as diferenças entre as variáveis em função do tratamento com vitamina A e E foram avaliadas através do t-Test pareado (SAS, 2003), com nível de significância de 5%. (Statistical Analysis Systems. *SAS User's Guide*. Cary, North Carolina: Statistical Analysis Systems Institute Inc; 2003).

As variáveis quantitativas foram, inicialmente, analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão (dados paramétricos) ou a mediana e intervalo interquartil (dados não paramétricos). Comparações entre as fases de pré e pós-tratamento, considerando todas as raças e cada uma individualmente, foram realizadas pelo teste *t* para dados emparelhados (dados paramétricos) ou pelo teste de Wilcoxon (variáveis não paramétricas). Comparações entre as quatro raças em cada fase do estudo (intergrupos) foram realizadas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre as raças aos pares (dados paramétricos), ou do teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn (variáveis não paramétricas) (ARMITAGE; BERRY, 1994; MOTULSKY, 1995).

A eficácia (E) do tratamento com as vitaminas A e E foi calculada em função da produção de oócitos, de embriões e da taxa de conversão de oócitos para embriões, sendo expressa em termos percentuais conforme a seguinte expressão:

$$E = \left(\frac{P_{Pós} - P_{Pré}}{P_{Pré}} \right) \cdot 100,$$

onde $P_{\text{Pré}}$ e $P_{\text{Pós}}$ correspondem, respectivamente, aos valores dos parâmetros utilizados no pré e pós-tratamento.

Em todos os casos, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade α do erro tipo I (nível de significância), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor P menor que 0,05.

O *software* GraphPad Prism[®] versão 5.00 para Windows[®] (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.



6 RESULTADOS

Nos experimentos foram utilizadas 22 doadoras (duas da raça Simental, quatro da raça Nelore, cinco da raça Brahma e onze da raça Gir). Desses animais, foram feitas 44 aspirações foliculares (OPU) com 44 produções *in vitro* (PIV). Porém, 42 produziram embriões e duas vacas Gir na fase pré-tratamento não produziram embriões.

As 44 aspirações foliculares proporcionaram a produção total de 520 oócitos, sendo que, 217 foram obtidos na fase pré-tratamento (OF1) quando os animais não receberam a aplicação das vitaminas; e 303 na fase pós-tratamento (OF2) quando os animais receberam a aplicação das vitaminas A (1.000.000 UI de acetato de retinol, Monovin[®] A, Laboratório Bravet[®]) e vitamina E (1g de acetato de α -tocoferol, Monovin[®] E, Laboratório Bravet[®]) (Figura 13).

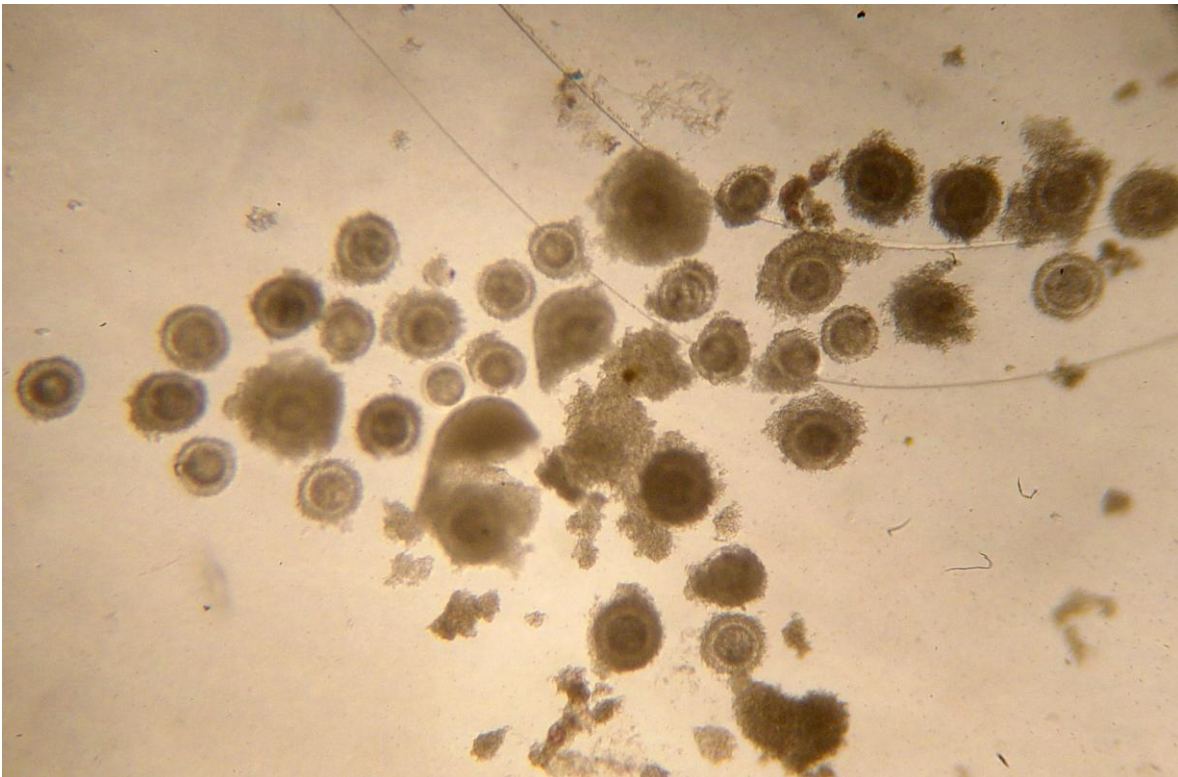


Figura 13 - Fotomicrografia de oócitos momentos após a aspiração folicular (OPU). Esteriomicroscópio Nikon com aumento de 20x.

A resposta da OF2 na produção de oócitos foi de 303 estruturas, com acréscimo de 86 oócitos totais e médias de $3,9 \pm 1,6$ oócitos em relação a OF1. Obteve-se média de $9,86 \pm 5,53$ e $13,77 \pm 9,43$ para a OF1 e OF2 respectivamente, com significância estatística (* $p < 0,03$; $p = 0,0219$) (Tabela 1 e Figura 14).

A resposta na produção de oócitos da fase pós-tratamento quando agrupado os dados das raças Nelore, Brahma e Gir (OF2-NBG) foi de 293 estruturas; com acréscimo de 95 oócitos totais e média de $4,7 \pm 1,6$ oócitos em relação a fase pré-tratamento da raças Nelore, Brahma e Gir (OF1-NGB). Obteve-se média de $9,90 \pm 5,81$ e $14,65 \pm 9,44$ para OF1-NGB e OF2-NGB respectivamente, com resultado significativo (* $p < 0,01$; $p = 0,0085$) (Tabela 1 e Figura 15).

Tabela 1 – Valores da média e desvio padrão do número de oócitos referentes às contagens efetuadas em todos os 22 animais estudados e nas 20 matrizes pertencentes às raças Nelore, Brahma e Gir em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento).

| Raças | Pré-tratamento | | Pós-tratamento | | Significância |
|----------------------|----------------|---------------|----------------|---------------|--|
| | Média | Desvio padrão | Média | Desvio padrão | |
| Todas as raças | 9,86 | 5,53 | 13,77 | 9,43 | P = 0,0219 $\Delta = -3,91$ IC95%: -7,19 a -0,63 |
| Nelore, Brahma e Gir | 9,90 | 5,81 | 14,65 | 9,44 | P = 0,0085 $\Delta = -4,75$ IC95%: -8,14 a -1,36 |

Δ : média das diferenças entre as fases de pré e pós-tratamento; IC95%: intervalo de confiança de 95% da média das diferenças.

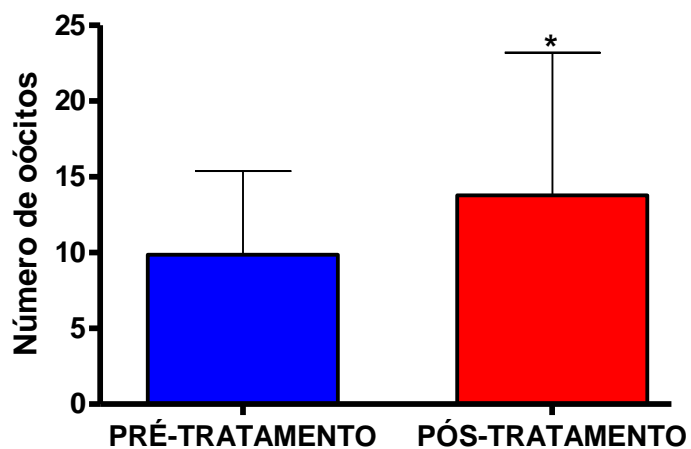


Figura 14 – Produção de oócitos verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando todos os animais estudados. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 22 animais em cada período. O teste *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo. Constatou-se que a produção de oócitos na fase de pós-tratamento foi significativamente maior (* $p= 0,0219$) que a observada no pré-tratamento.

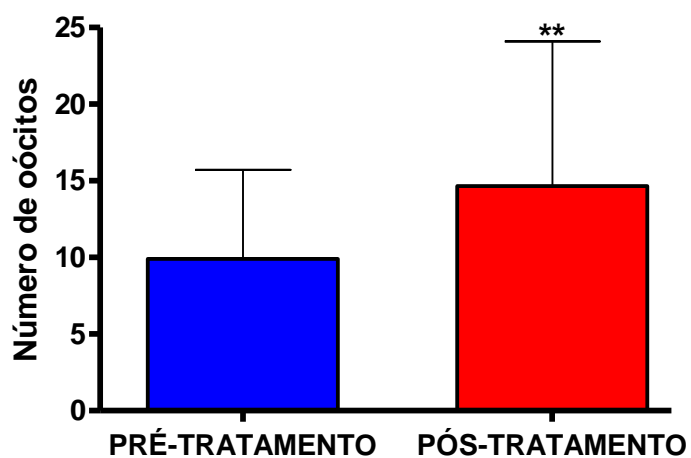


Figura 15 – Produção de oócitos verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando conjuntamente as raças Nelore, Brahma e Gir. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 20 animais em cada período. O teste *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo. Constatou-se que a produção de oócitos na fase de pós-tratamento foi significativamente maior (** $p = 0,0085$) que a observada no pré-tratamento.

Os resultados da produção de oócitos da fase pré-tratamento (OF1) e pós-tratamento (OF2) quando os animais são separados por raça são: Simental $9,50 \pm 0,71$ (OF1S) e $5,00 \pm 1,41$ (OF2S); Nelore $12,00 \pm 7,26$ (OF1N) e $25,00 \pm 11,17$ (OF2N); Brahma $11,20 \pm 7,26$ (OF1B) e $14,00 \pm 6,96$ (OF2B); Gir $8,55 \pm 5,07$ (OF1G) e $11,18 \pm 7,51$ (OF2G) (Tabela 2). Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às contagens efetuadas em 2 animais da raça Simental, 4 da raça Nelore, 6 da raça Brahma e 11 matrizes da raça Gir.

Tabela 2 – Valores da média e desvio padrão do número de oócitos referentes às contagens efetuadas nos animais pertencentes às raças Simental (2), Nelore (4), Brahma (6) e Gir (11) em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento).

| Raça | Pré-tratamento | | Pós-tratamento | | Significância (na mesma raça) |
|-----------------------------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|---|
| | Média | Desvio padrão | Média | Desvio padrão | |
| Simental | 9,50 | 0,71 | 5,00 | 1,41 | P = 0,0704 $\Delta = 4,50$ IC95%: -1,86 a 10,86 |
| Nelore | 12,00 | 7,26 | 25,00* | 11,17 | P = 0,0548 $\Delta = -13,00$ IC95%: -26,50 a 0,50 |
| Brahma | 11,20 | 6,72 | 14,00 | 6,96 | P = 0,2501 $\Delta = -2,80$ IC95%: -8,58 a 2,98 |
| Gir | 8,55 | 5,07 | 11,18 | 7,51 | P = 0,1716 $\Delta = -2,63$ IC95%: -6,63 a 1,35 |
| Significância (entre as raças) | F=0,4687 P=0,7078 | | F=3,8750 P=0,0267 | | |

Δ : média das diferenças entre as fases de pré e pós-tratamento; IC95%: intervalo de confiança de 95% da média das diferenças; *p < 0,05: Nelore maior que Simental e Gir no pós-tratamento (teste de Tukey).

O teste de *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo na mesma raça. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significante entre as duas fases estudadas em nenhuma das raças, embora, na raça Nelore, tenha sido observada uma diferença marginalmente significante ($p = 0,0548$) (Figura 16 e Tabela 2).

A resposta na produção de oócitos da raça Simental na fase pós-tratamento (OF2S) em relação a fase pré-tratamento (OF1S) não demonstrou resultado significativo ($p > 0,05$) (Figura 16 e Tabela 2).

A produção total de oócitos da raça Simental foi de 19 estruturas para a OF1S e dez para OF2S, sendo a variação e média com desvio padrão de 9-10 / $9,5 \pm 0,71$ (OF1S); 4-6 / $5 \pm 1,41$ (OF2S) respectivamente (Figura 16 e Tabela 2). O resultado absoluto na produção de oócitos da OF2S foi menor que do OF1S.

A resposta na produção de oócitos da raça Nelore na fase pós-tratamento (OF2N) em relação a fase pré-tratamento (OF1N) não demonstrou resultado significativo ($p > 0,05$; $p = 0,0548$), podendo ser considerada uma diferença marginalmente significante (Figura 16 e Tabela 2).

A produção total de oócitos da raça Nelore foi de 48 estruturas para a OF1N e 100 para OF2N, sendo a variação e média com desvio padrão de 2-19 / $12,00 \pm 7,26$ (OF1N); 16-40 / $25,00 \pm 11,17$ (OF2N) respectivamente (Figura 16 e Tabela 2). O resultado absoluto na produção de oócitos da OF1N foi menor que do OF2N.

A resposta na produção de oócitos da raça Brahma na fase pós-tratamento (OF2B) em relação a fase pré-tratamento (OF1B) não demonstrou resultado significativo ($p > 0,05$) (Figura 16 e Tabela 2).

A produção total de oócitos da raça Brahma foi de 56 estruturas para a OF1B e 70 para OF2B, sendo a variação e média com desvio padrão de 4-20 / $11,20 \pm 6,72$ (OF1B); 4-23 / $14,00 \pm 6,96$ (OF2B) respectivamente (Figura 16 e Tabela 2). O resultado absoluto na produção de oócitos da OF2B foi menor que do OF1B.

A resposta na produção de oócitos da raça Gir na fase pós-tratamento (OF2G) em relação a fase pré-tratamento (OF1G) não demonstrou resultado significativo ($p > 0,05$) (Figura 16 e Tabela 2).

A produção total de oócitos da raça Gir foi de 94 estruturas para a OF1G e 123 para OF2G, sendo a variação e média com desvio padrão de 2-18 / $8,55 \pm 5,07$ (OF1G); 2-24 / $11,18 \pm 7,51$ (OF2G) respectivamente (Figura 16 e Tabela 2). O resultado absoluto na produção de oócitos da OF1NG foi menor que do OF2G.

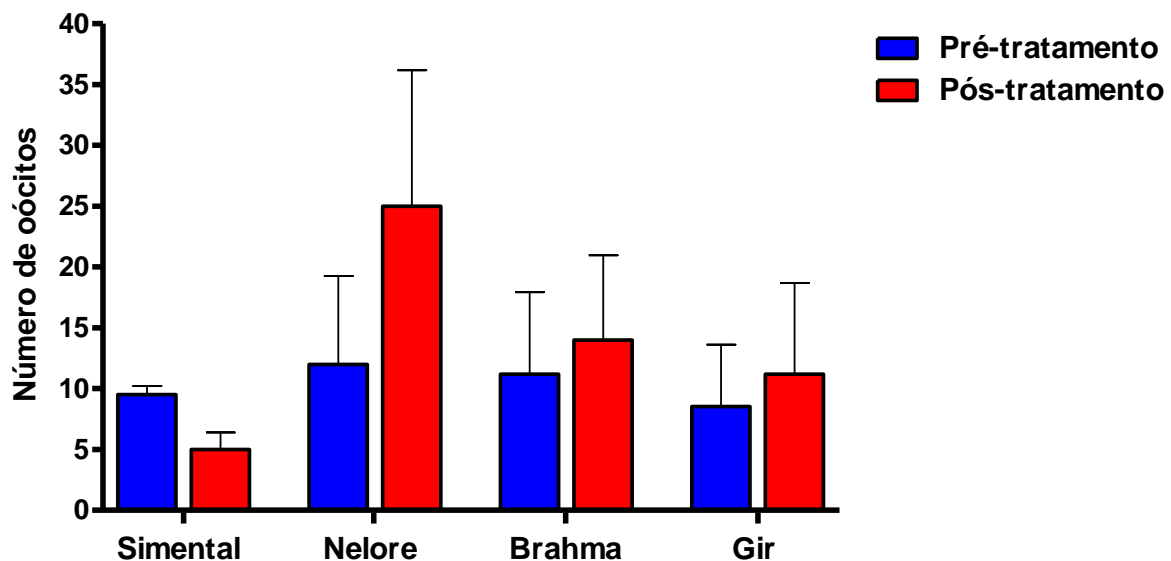


Figura 16 – Produção de oócitos verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando as quatro raças individualmente: Simental, Nelore, Brahma e Gir. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significante entre as duas fases estudadas em nenhuma das raças, embora, na raça Nelore, tenha sido observada uma diferença marginalmente significante ($p = 0,0548$).

Na comparação entre as raças em relação à produção de oócitos, no pré-tratamento e pós-tratamento, quando foram feitas análises de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre as raças duas a duas. Constatou-se que, no pós-tratamento, a produção de oócitos na raça Nelore foi significativamente maior ($*p < 0,05$) que aquela referente às raças Simental e Gir (Figura 17).

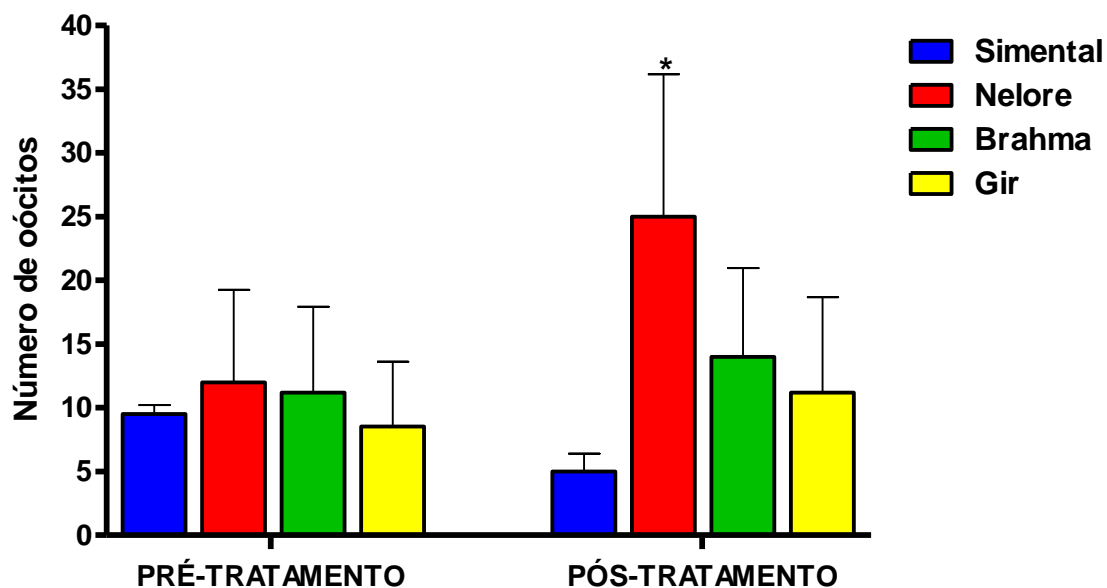


Figura 17 – Comparação entre as raças Simental, Nelore, Brahma e Gir, em relação à produção de oócitos, em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento). Dados expressos como média e desvio padrão, constatou-se que, no pós-tratamento, a produção de oócitos na raça Nelore foi significativamente maior (* $p < 0,05$) que aquela referente às raças Simental e Gir.

A eficácia do tratamento com as vitaminas A e E calculada em função da produção de oócitos para cada raça estudada: Simental, Nelore, Brahma e Gir. Os dados foram expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo correspondentes às contagens efetuadas em 2 animais da raça Simental, 4 da raça Nelore, 6 da raça Brahma e 11 matrizes da raça Gir. Comparações entre as quatro raças foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar diferenças entre as raças duas a duas. Constatou-se que, na raça Nelore, a eficácia do tratamento no que concerne à produção de oócitos foi significativamente maior (* $p < 0,05$) que aquela observada na raça Simental (Figura 18 Tabela 3).

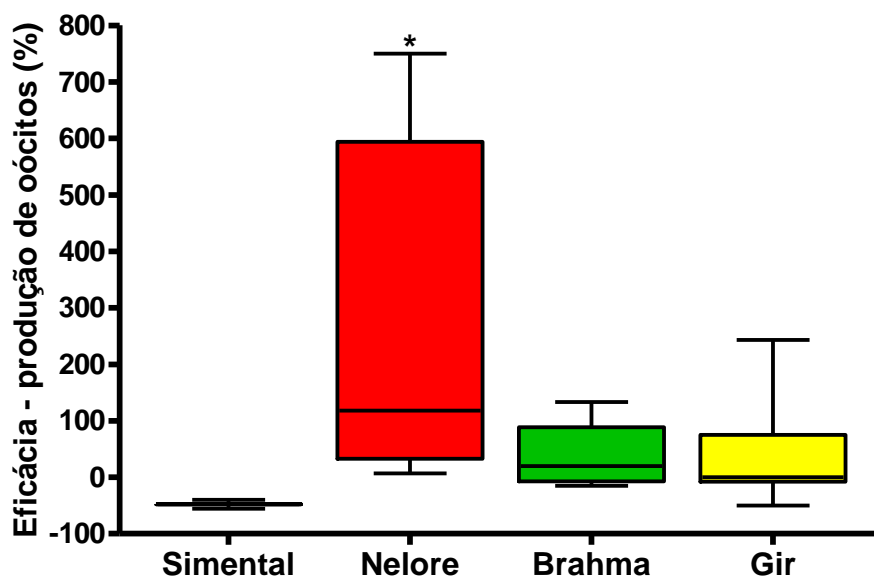


Figura 18 – Eficácia do tratamento com as vitaminas A e E calculada em função da produção de oócitos para cada raça estudada: Simental, Nelore, Brahma e Gir. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo. Na análise estatística foi usado o teste de Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas de Dunn. Constatou-se que, na raça Nelore, a eficácia do tratamento no que concerne à produção de oócitos foi significativamente maior (* $p < 0,05$) que aquela observada na raça Simental.

Tabela 3 – Mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo da eficácia do tratamento com as vitaminas A e E, calculada em função da produção de oócitos, para cada raça individualmente e para todos os animais estudados.

| Raça | Mediana | Intervalo interquartil | Mínimo | Máximo |
|--------------------------------|-----------------------|------------------------|--------|--------|
| Simental | -47,78 | -55,56 a -40,00 | -55,56 | -40,00 |
| Nelore | 117,76* | 32,63 a 593,75 | 6,67 | 750,00 |
| Brahma | 20,00 | -7,50 a 88,54 | -15,00 | 133,33 |
| Gir | 0,00 | -7,69 a 75,00 | -50,00 | 242,86 |
| Significância (entre as raças) | KW=7,9210 P=0,0477 | | | |
| Todas as raças | 8,889 | -9,519 a 102,63 | -55,56 | 750,00 |

KW: Estatística de Kruskal-Wallis; * $P < 0,05$: Nelore *versus* Simental (teste de Dunn).

Os resultados das 44 aspirações foliculares (OPU) proporcionaram a seguinte produção de oócitos por raça: 29 na Simental; 148 na Nelore; 126 na Brahma e 217 na Gir. A variação numérica de oócitos foi de dois a 40 por aspiração, sendo de quatro a dez; dois a 40; quatro a 23 e dois a 24 para as raças Simental, Nelore, Brahma e Gir respectivamente. Houve variações numéricas nas aspirações nos dois grupos, desde dois a 40 oócitos (dois a 20 no controle e quatro a 40 no tratado) (Quadro 1).

Quadro 1 - Produção de oócitos do grupo controle e tratado por aspiração folicular (OPU) - Número absoluto de OPU, quantidade total e variação numérica na produção de oócitos; na produção total por raça (Simental, Nelore, Brahma e Gir) e grupo condensado (agrupamento das raças Simental, Nelore, Brahma e Gir), dos animais controles e tratados.

| Raça | Nº de OPU | Total de oócitos | Variação de oócitos |
|----------------|-----------|------------------|---------------------|
| Simental | 4 | 29 | 4-10 |
| Nelore | 8 | 148 | 2-40 |
| Brahma | 10 | 126 | 4-23 |
| Gir | 22 | 217 | 2-24 |
| Todas as raças | 44 | 520 | 2-40 |

As 22 doadoras proporcionaram 44 produções *in vitro* de embriões (PIV) com produção total de 224 embriões (Figura 19), sendo que 93 obtidos na fase pré-tratamento (EF1) que não receberam a aplicação das vitaminas e 131 na fase pós-tratamento (EF2) que receberam as vitaminas, demonstrando um acréscimo de 40,86% na produção. A média geral de embriões foi de 5,09 por PIV, sendo 4,22 e 5,95 para o EF1 e EF2 respectivamente.

A resposta geral na EF2 em produção de embriões foi de 131 estruturas, com acréscimo de 38 embriões em relação a EF1. Obtendo média de $4,23 \pm 3,09$ e $5,95 \pm$

4,05 para EF1 e EF2 respectivamente, com resultado significativo (* $p < 0,03$; $p = 0,0228$) (Figura 20, 21 e Tabelas 4).

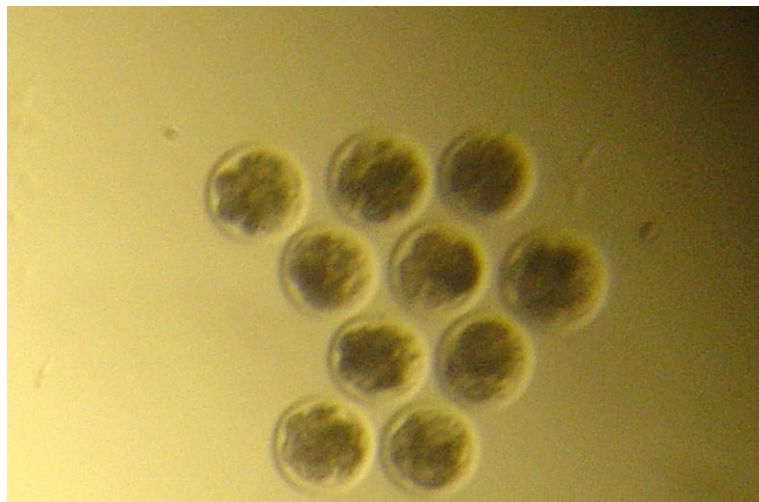


Figura 19 - Fotomicrografia de embriões produzidos por fecundação *in vitro*. Esteriomicroscópio Nikon com aumento de 20x.

Tabela 4 – Valores da média e desvio padrão do número de embriões referentes às contagens efetuadas em todos os 22 animais estudados e nas 20 matrizes pertencentes às raças Nelore, Brahma e Gir em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento).

| Raças | Pré-tratamento | | Pós-tratamento | | Significância |
|----------------------|----------------|---------------|----------------|---------------|--|
| | Média | Desvio padrão | Média | Desvio padrão | |
| Todas as raças | 4,23 | 3,09 | 5,95 | 4,05 | P = 0,0228 $\Delta = -1,72$ IC95%: -3,19 a -0,27 |
| Nelore, Brahma e Gir | 4,45 | 3,15 | 6,25 | 4,09 | P = 0,0285 $\Delta = -1,80$ IC95%: -3,39 a -0,21 |

Δ : média das diferenças entre as fases de pré e pós-tratamento; IC95%: intervalo de confiança de 95% da média das diferenças.

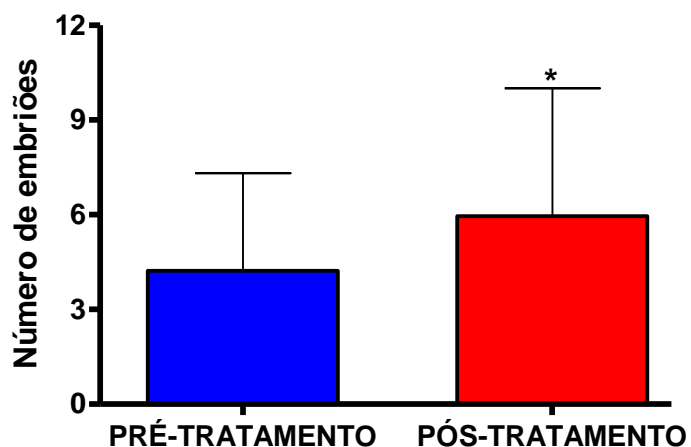


Figura 20 – Produção de embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando todos os animais estudados. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 22 animais em cada período. O teste *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo. Constatou-se que a produção de embriões na fase de pós-tratamento foi significativamente maior (* $p = 0,0228$) que a observada no pré-tratamento.

A resposta na produção de embriões da fase pós-tratamento quando agrupado os dados das raças Nelore, Brahma e Gir (EF2-NBG) foi de 125 estruturas; com acréscimo de 36 embriões totais em relação a fase pré-tratamento da raças Nelore, Brahma e Gir (EF1-NGB). Obtendo média e desvio padrão de $4,45 \pm 3,15$ e $6,25 \pm 4,09$ para EF1-NGB e EF2-NGB respectivamente, com resultado significativo (* $p < 0,03$; $p = 0,0285$) (Figura 21 e Tabela 4).

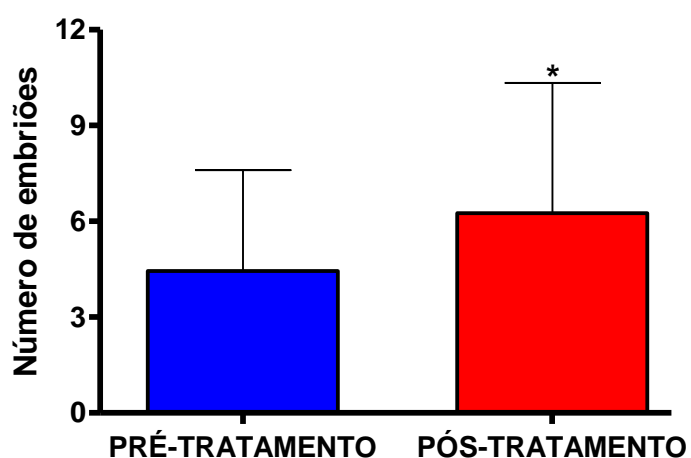


Figura 21 – Produção de embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando conjuntamente as raças Nelore, Brahma e Gir. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 20 animais em cada período. O teste *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo. Constatou-se que a produção de embriões na fase de pós-tratamento foi significativamente maior (* $P = 0,0285$) que a observada no pré-tratamento.

A resposta na produção de embriões da raça Simental na fase pós-tratamento (EF2S) em relação à fase pré-tratamento (EF1S) não demonstrou resultado significativo ($p>0,05$) (Figura 22).

A produção total de embriões da raça Simental foi de quatro estruturas para EF1S e seis para EF2S (Quadro 2), sendo a média com desvio padrão de $2,00 \pm 0,00$ (EF1S); $3,00 \pm 2,83$ (EF2S) respectivamente (Tabela 5 e Figura 22).

A resposta na produção de embriões da raça Nelore na fase pós-tratamento (EF2N) em relação à fase pré-tratamento (EF1N) não demonstrou resultado significativo ($p>0,05$) (Figura 22).

A produção total de embriões da raça Nelore foi de 18 estruturas para EF1N e 36 para EF2N (Quadro 2), sendo a média com desvio padrão de $4,50 \pm 2,65$ (EF1N); $9,00 \pm 2,83$ (EF2N) respectivamente (Tabela 5 e Figura 22).

A resposta na produção de embriões da raça Brahma na fase pós-tratamento (EF2B) em relação à fase pré-tratamento (EF1B) não demonstrou resultado significativo ($p>0,05$) (Figura 22).

A produção total de embriões da raça Nelore foi de 39 estruturas para EF1B e 47 para EF2B (Quadro 2), sendo a média com desvio padrão de $7,80 \pm 4,09$ (EF1B); $9,40 \pm 4,04$ (EF2B) respectivamente (Tabela 5 e Figura 22).

A resposta na produção de embriões da raça Gir na fase pós-tratamento (EF2G) em relação à fase pré-tratamento (EF1G) não demonstrou resultado significativo ($p>0,05$) (Figura 22).

A produção total de embriões da raça Gir foi de 32 estruturas para EF1G e 42 para EF2G (Quadro 2), sendo a média com desvio padrão de $2,91 \pm 1,38$ (EF1G); $3,82 \pm 2,89$ (EF2G) respectivamente (Tabela 5 e Figura 22).

Quadro 2 - Produção de embriões do grupo controle e tratado por produção *in vitro* (PIV) - Número absoluto de PIV, número total e variação numérica de embriões. Demonstração da produção total de embriões por raça (Simental, Nelore, Brahma e Gir) e grupo condensado, dos animais controles e tratados. * Resultados com significância estatística, * $p < 0,05$.

| Raça | Nº de OPU | Total de embriões | Variação de embriões |
|----------------|-----------|-------------------|----------------------|
| Simental | 4 | 10 | 2-5 |
| Nelore | 8 | 54 | 1-13 |
| Brahma | 10 | 86 | 3-15 |
| Gir | 20 | 74 | 1-10 |
| Todas as raças | 42 | 224 | 1-15 |

Tabela 5 – Valores da média e desvio padrão do número de embriões referentes às contagens efetuadas nos animais pertencentes às raças Simental (2), Nelore (4), Brahma (6) e Gir (11) em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento).

| Raça | Pré-tratamento | | Pós-tratamento | | Significância (na mesma raça) |
|-----------------------------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|---|
| | Média | Desvio padrão | Média | Desvio padrão | |
| Simental | 2,00 | 0,00 | 3,00 | 2,83 | P = 0,7048 Δ = -1,00 IC95%: -26,42 a 24,42 |
| Nelore | 4,50 | 2,65 | 9,00 | 2,83 | P = 0,1487 Δ = -4,50 IC95%: -11,91 a 2,91 |
| Brahma | 7,80*† | 4,09 | 9,40‡ | 4,04 | P = 0,3739 Δ = -1,60 IC95%: -6,04 a 2,84 |
| Gir | 2,91 | 1,38 | 3,82 | 2,89 | P = 0,2640 Δ = -0,91 IC95%: -2,62 a 0,80 |
| Significância (entre as raças) | F=5,2380 P=0,0089 | | F=5,4450 P=0,0077 | | |

Δ : média das diferenças entre as fases de pré e pós-tratamento; IC95%: intervalo de confiança de 95% da média das diferenças; *p < 0,05: Brahma *versus* Simental no pré-tratamento; †P < 0,01: Brahma *versus* Gir no pré-tratamento; ‡P < 0,05: Brahma *versus* Simental no pós-tratamento (teste de Tukey).

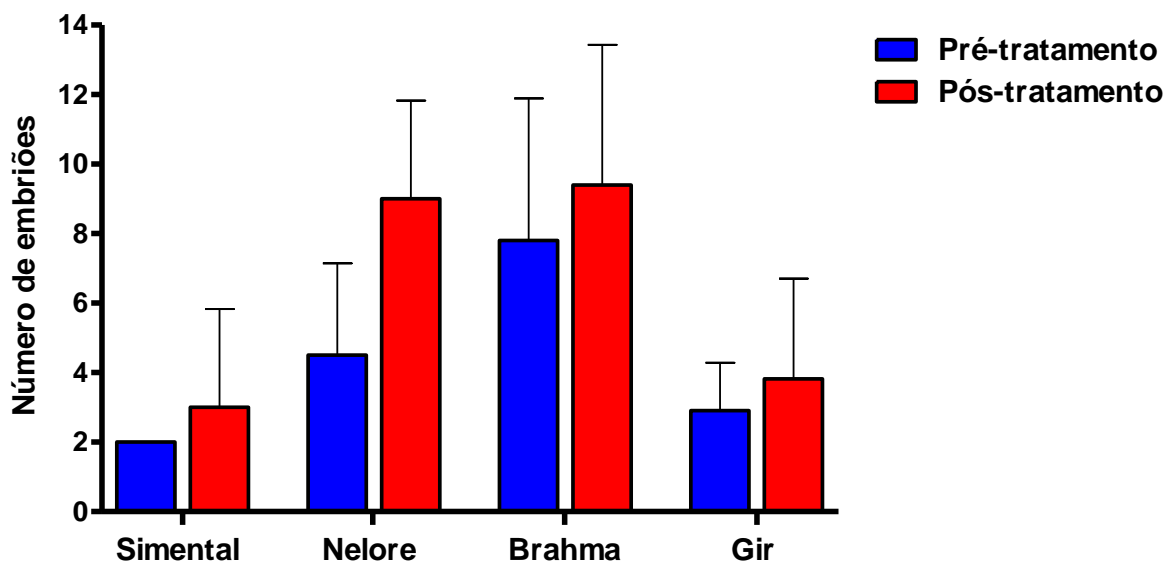


Figura 22 – Produção de embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando as quatro raças individualmente: Simental, Nelore, Brahma e Gir. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às contagens efetuadas em 2 animais da raça Simental, 4 da raça Nelore, 6 da raça Brahma e 11 matrizes da raça Gir. O teste de t para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo na mesma raça. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre as duas fases estudadas em nenhuma das raças.

A comparação entre as raças Simental, Nelore, Brahma e Gir, em relação à produção de embriões, em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento). Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às contagens efetuadas em 2 animais da raça Simental, 4 da raça Nelore, 6 da raça Brahma e 11 matrizes da raça Gir. Comparações entre as quatro raças em cada fase foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre as raças duas a duas. Constatou-se que, no pré-tratamento, a produção de embriões na raça Brahma foi significativamente maior que aquela referente às raças Simental (* $P < 0,05$) e Gir (** $p < 0,01$). Analogamente, no pós-tratamento, a produção de embriões na raça Brahma foi significativamente maior (* $p < 0,05$) que aquela referente à raça Gir (Figura 23).

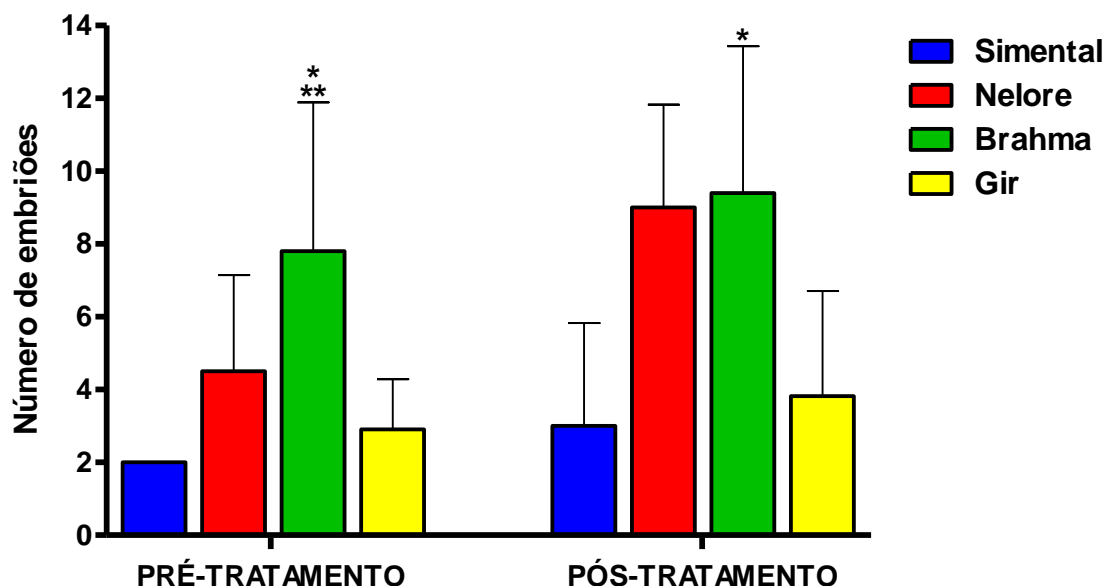


Figura 23 – Comparação entre as raças Simental, Nelore, Brahma e Gir, em relação à produção de embriões, em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento). Dados expressos como média e desvio padrão. Na análise estatística foi usado análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre as raças duas a duas. Constatou-se que, no pré-tratamento, a produção de embriões na raça Brahma foi significamente maior que aquela referente às raças Simental (* $P < 0,05$) e Gir (** $p < 0,01$). Analogamente, no pós-tratamento, a produção de embriões na raça Brahma foi significamente maior (* $p < 0,05$) que aquela referente à raça Gir.

A eficácia do tratamento com as vitaminas A e E calculada em função da produção de embriões para cada raça estudada: Simental, Nelore, Brahma e Gir. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo correspondentes às contagens efetuadas em 2 animais da raça Simental, 4 da raça Nelore, 6 da raça Brahma e 11 matrizes da raça Gir. Comparações entre as quatro raças foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar diferenças entre as raças duas a duas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre as raças estudadas (Tabela 6 e Figura 24).

Tabela 6 – Mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo da eficácia do tratamento com as vitaminas A e E, calculada em função da produção de embriões, para cada raça individualmente e para todos os animais estudados.

| Raça | Mediana | Intervalo interquartil | Mínimo | Máximo |
|--------------------------------|-----------------------|------------------------|---------|--------|
| Simental | 50,00 | -50,00 a 150,00 | -50,00 | 150,00 |
| Nelore | 120,83 | 4,17 a 656,25 | 0,00 | 800,00 |
| Brahma | 25,00 | -14,65 a 104,17 | -18,18 | 175,00 |
| Gir | 0,00 | -50,00 a 50,00 | -100,00 | 233,33 |
| Significância (entre as raças) | KW=1,8533 P=0,6034 | | | |
| Todas as raças | 20,83 | -12,88 a 156,25 | -100,00 | 800,00 |

KW: Estatística de Kruskal-Wallis.

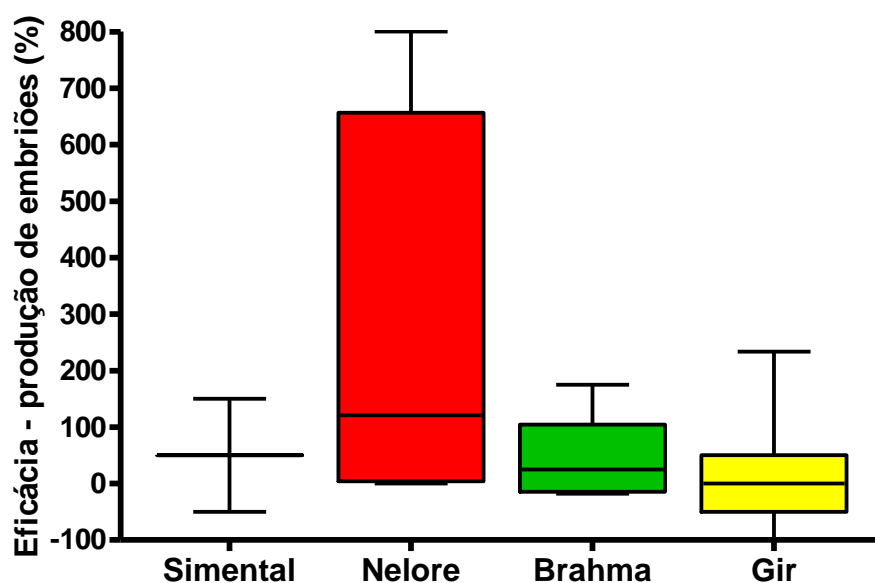


Figura 24 – Eficácia do tratamento com as vitaminas A e E calculada em função da produção de embriões para cada raça estudada: Simental, Nelore, Brahma e Gir. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo. Na análise estatística foi usado o teste de Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas de Dunn. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre as raças estudadas.

A taxa de conversão de oócitos para embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando as quatro raças individualmente: Simental, Nelore, Brahma e Gir. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às contagens efetuadas em 2 animais da raça Simental, 4 da raça Nelore, 6 da raça Brahma e 11 matrizes da raça Gir. O teste de *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo na mesma raça. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significante entre as duas fases estudadas em nenhuma das raças (Tabela 7 e Figura 25 e 26).

Tabela 7 – Valores da média e desvio padrão da taxa de conversão referentes às observações realizadas em todos os 22 animais estudados e nas 20 matrizes pertencentes às raças Nelore, Brahma e Gir em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento).

| Raças | Pré-tratamento | | Pós-tratamento | | Significância |
|----------------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---|
| | Média | Desvio padrão | Média | Desvio padrão | |
| Todas as raças | 0,4414 | 0,1856 | 0,4409 | 0,2509 | P = 0,9926 Δ = 0,0005 IC95%: -0,10 a 0,10 |
| Nelore, Brahma e Gir | 0,4645 | 0,1785 | 0,4310 | 0,2442 | P = 0,4303 Δ = 0,0335 IC95%: -0,05 a 0,12 |

Δ: média das diferenças entre as fases de pré e pós-tratamento; IC95%: intervalo de confiança de 95% da média das diferenças.

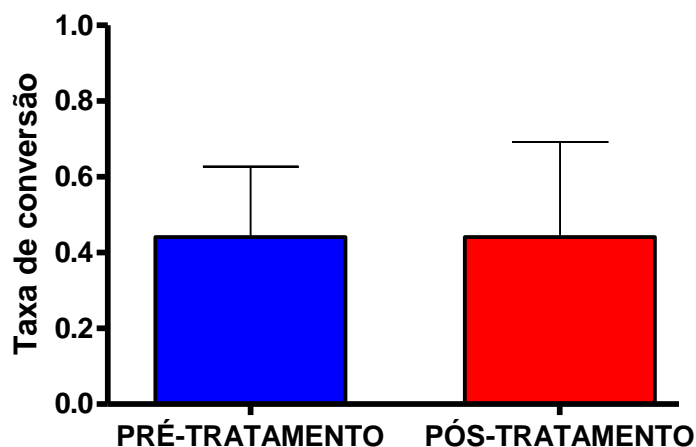


Figura 25 – Taxa de conversão de oócitos para embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando todos os animais estudados. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 22 animais em cada período. O teste *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre as duas fases do estudo.

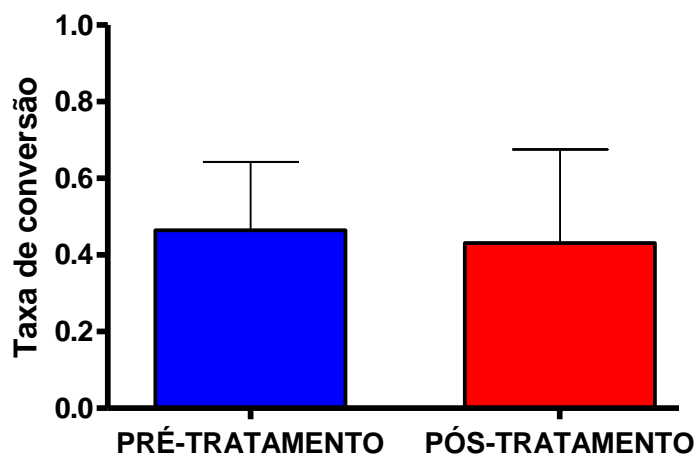


Figura 26 – Taxa de conversão de oócitos para embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando conjuntamente as raças Nelore, Brahma e Gir. Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às medições efetuadas em 20 animais em cada período. O teste *t* para dados emparelhados foi usado para comparar as duas fases do estudo. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre as duas fases do estudo.

A taxa de conversão de oócitos para embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando as quatro raças individualmente: Simental, Nelore, Brahma e Gir. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significante entre as duas fases estudadas em nenhuma das raças (Figura 27). A taxa de conversão para blastocisto foi 21,1% e 60%, para EF1S e EF2S respectivamente. A taxa de conversão de oócito para embrião foi de 37,5% e 36% para EF1N e EF2N, respectivamente. A taxa de conversão de oócito para embrião foi de 69,64% e 67,14% para EF1B e EF2B respectivamente. A taxa de conversão de oócito para embrião foi de 34,04% e 34,14% para EF1G e EF2G respectivamente (Figura 27).

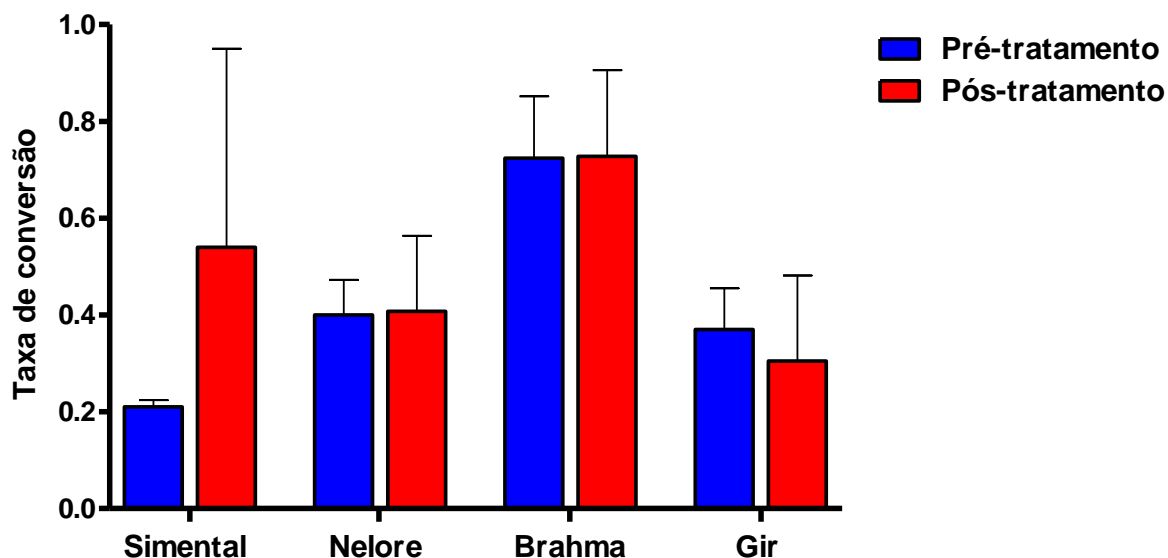


Figura 27 – Taxa de conversão de oócitos para embriões verificada nas fases de pré e pós-tratamento considerando as quatro raças individualmente: Simental, Nelore, Brahma e Gir. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre as duas fases estudadas em nenhuma das raças.

Comparação entre as raças Simental, Nelore, Brahma e Gir, em relação à taxa de conversão de oócitos para embriões, em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento). Dados expressos como média e desvio padrão correspondentes às contagens efetuadas em 2 animais da raça Simental, 4 da raça Nelore, 6 da raça Brahma e 11 matrizes da raça Gir. Comparações entre as quatro raças em cada fase foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre as raças duas a duas. Constatou-se

que, no pré-tratamento, a taxa de conversão verificada na raça Brahma foi significativamente maior ($***P < 0,001$) que aquelas mensuradas nas raças Simental, Nelore e Gir. Similarmente, no pós-tratamento, a taxa de conversão observada na raça Brahma foi significativamente maior ($**p < 0,01$) que a verificada na raça Gir. (Tabela 8 e Figura 28).

Tabela 8 – Valores da média e desvio padrão da taxa de conversão referentes às observações realizadas nos animais pertencentes às raças Simental (2), Nelore (4), Brahma (6) e Gir (11) em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento).

| Raça | Pré-tratamento | | Pós-tratamento | | Significância (na mesma raça) |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------|----------------------|---------------|---|
| | Média | Desvio padrão | Média | Desvio padrão | |
| Simental | 0,2100 | 0,0141 | 0,5400 | 0,4101 | P = 0,4697 $\Delta = -0,3300$ IC95%: -4,14 a 3,48 |
| Nelore | 0,4000 | 0,0726 | 0,4075 | 0,1561 | P = 0,9228 $\Delta = -0,0075$ IC95%: -0,23 a 0,22 |
| Brahma | 0,7240 ^{***} | 0,1280 | 0,7280 ^{**} | 0,1778 | P = 0,9642 $\Delta = -0,0040$ IC95%: -0,24 a 0,23 |
| Gir | 0,3700 | 0,0850 | 0,3045 | 0,1772 | P = 0,3202 $\Delta = 0,0655$ IC95%: -0,07 a 0,20 |
| Significância (entre as raças) | F=22,222 P<0,0001 | | F=5,6402 P=0,0066 | | |

Δ : média das diferenças entre as fases de pré e pós-tratamento; IC95%: intervalo de confiança de 95% da média das diferenças; $***p < 0,001$: Brahma maior que Simental, Nelore e Gir no pré-tratamento; $**p < 0,01$: Brahma *versus* Gir no pós-tratamento (teste de Tukey).

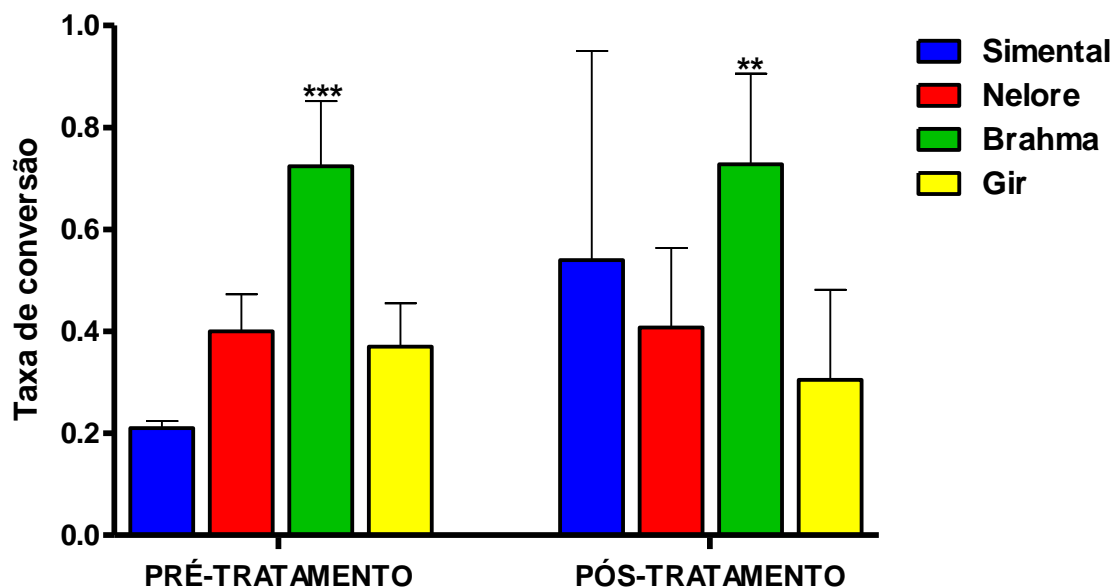


Figura 28 – Comparação entre as raças Simental, Nelore, Brahma e Gir, em relação à taxa de conversão de oócitos para embriões, em cada fase do estudo (pré e pós-tratamento). Dados expressos como média e desvio padrão. Para análise estatística foi usado a análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, com *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$.

A eficácia do tratamento com as vitaminas A e E calculada em função da taxa de conversão de oócitos para embriões para cada raça estudada: Simental, Nelore, Brahma e Gir. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo correspondentes às contagens efetuadas em 2 animais da raça Simental, 4 da raça Nelore, 6 da raça Brahma e 11 matrizes da raça Gir. Comparações entre as quatro raças foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar diferenças entre as raças duas a duas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significante entre as raças estudadas (Tabela 9 Figura 29).

Tabela 9 – Mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo da eficácia do tratamento com as vitaminas A e E, calculada em função da taxa de conversão de oócitos para embriões, para cada raça individualmente e para todos os animais estudados.

| Raça | Mediana | Intervalo interquartil | Mínimo | Máximo |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|---------|--------|
| Simental | 164,32 | 13,64 a 315,00 | 13,64 | 315,00 |
| Nelore | 8,00 | -37,01 a 36,59 | -51,35 | 45,46 |
| Brahma | -3,64 | -19,44 a 25,62 | -25,56 | 33,33 |
| Gir | -2,33 | -42,00 a 24,14 | -100,00 | 51,52 |
| Significância (entre as raças) | KW=2,7367 P=0,4340 | | | |
| Todas as raças | 3,00 | -26,11 a 26,44 | -100,00 | 315,00 |

KW: Estatística de Kruskal-Wallis.

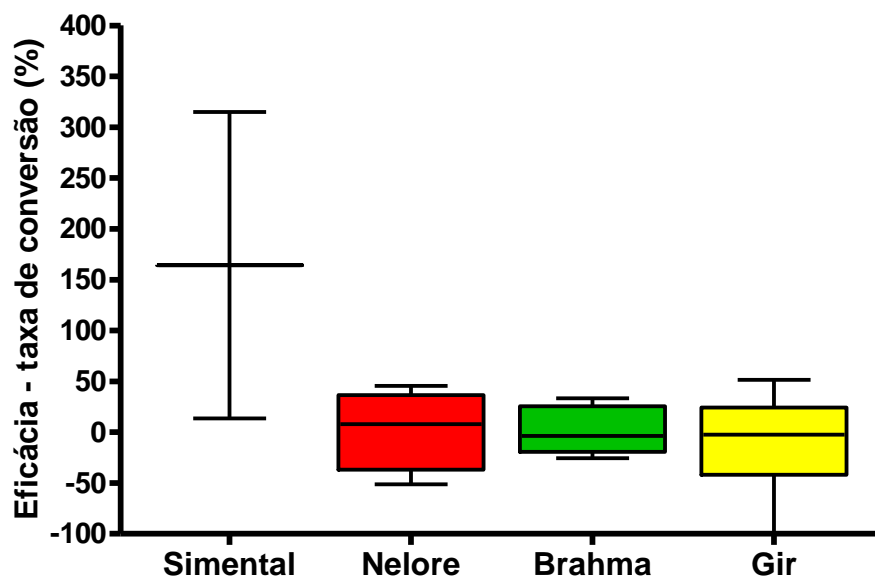


Figura 29 – Eficácia do tratamento com as vitaminas A e E calculada em função da taxa de conversão de oócitos para embriões para cada raça estudada. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo. Para análise estatística foi usado o teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre as raças estudadas.

7 DISCUSSÃO

Analisando os resultados referentes aos experimentos com a suplementação de vitaminas A e E observou-se que houve um efeito significativo na quantidade de oócitos por aspiração na fase pós-tratamento (OF2), demonstrando um acréscimo na produção de 39,63%. Segundo Hidalgo *et al.* (2005), os quais relataram a existência do efeito da vitamina A nos oócitos bovinos durante o crescimento intrafolicular proporcionando maior recrutamento folicular.

A suplementação das vitaminas A e E interferiu no aumento de embriões, demonstrando um acréscimo significativo de 40,86%. O agrupamento dos dados das raças Nelore, Brahama e Gir (*Bos taurus indicus*) demonstrou uma resposta positiva ao tratamento com as vitaminas, bem como na produção de oócitos e embriões.

A produção média de oócitos (CCOs) na fase pós-tratamento(OF2) 13,77 estruturas, sendo superiores aos resultados de 1,9 a 3,1 oócitos em bezerras (MAJERUS *et al.*, 2000) e 10,9 oócitos em vacas (RENESTO, 2004). A menor produção de oócitos na fase pré-tratamento(OF1) (dois CCOs) e na OF2 (quatro CCOs) são inferiores aos seis CCOs relatados por Leivas *et al.* (2003). A maior produção de estruturas na OF1 (20 CCOs) e na OF2 (40 CCOs) é menor e maior respectivamente do que os 23 CCOs dos mesmos pesquisadores.

A OF1 produziu 9,86 oócitos em média, sendo inferior aos 10,9 oócitos/aspiração de Renesto (2004) e superiores aos 1,9 a 3,1 oócitos/aspiração de Majerus *et al.* (2000).

Os resultados na produção de oócitos na OF1 e OF2 da raça Simental; e grupo controle da raça Gir, são superiores aos relatados por Majerus e colaboradores (2000) e inferiores aos de Renesto (2004).

A produção de oócitos na OF1 do Nelore e Brahma; e OF2 Nelore, Brahma e Gir revelaram respostas superiores às descritas por Majerus e colaboradores (2000) e Renesto (2004).

Kruip *et al.* (1994) relataram a grande variação entre as respostas das doadoras de oócitos. Como ocorreu neste experimento, que foi de duas a 40 estruturas.

A variação individual não foi expressiva. Para Adams e Jaiswal (2008) o número de folículos recrutados dentro de cada onda folicular varia amplamente entre os indivíduos, mas é altamente repetido em um mesmo indivíduo juntamente com o padrão de cada uma das ondas.

Observou-se uma variação numérica nas aspirações foliculares nas duas fases (OF1 e OF2), desde dois a 40 oócitos produzidos (dois a 20 na OF1 e quatro a 40 na OF2). Conforme Majerus *et al.* (2000), e Renesto (2004) relataram que podem ocorrer grandes variações numéricas entre as doadoras na produção de oócitos.

Nestes experimentos obteve-se uma produção total de embriões de 224 estruturas, sendo que 93 obtidas na fase pré-tratamento(EF1) que não receberam a aplicação das vitaminas e 131 na fase pós-tratamento(EF2) que receberam as vitaminas, demonstrando um acréscimo de 40,86%, mas sem significância estatística ($p>0,05$). A média numérica geral na produção de embriões foi de 5,09 por produção *in vitro* (PIV), sendo 4,22 e 5,95 para OF1 e OF2 respectivamente.

A produção de embriões pelo da EF1 por PIV foi de 4,22 sendo superior aos 2,73 (LEIVAS *et al.*, 2003) e 1,4 estruturas já descritas na literatura (RENESTO, 2004). Na EF2 (5,95) houve diferença estatística com a aplicação de vitaminas, sendo os resultados superiores aos 4,24 relatados por Cosac Faria *et al.* (2003) e aos demais citados. A média geral de blastocistos também foi elevada, superando as citações bibliográficas.

A produção média de embriões na fase pré-tratamento (EF1) Simental foi superior apenas para os resultados descritos por Renesto (2004). Os resultados da fase pós-tratamento (EF2) Simental e Gir; e fase pós-tratamento Gir(EF2) estão acima do valores observados por Renesto (2004) e Leivas e colaboradores (2003) e abaixo dos de Cosac Faria *et al.* (2003). A resposta na produção de oócitos do EF1 e EF2 do Nelore e Brahma foram superiores aos autores citados anteriormente.

Na raça Simental a resposta de embriões foi de quatro para o grupo controle e seis para o grupo tratado. A maior produção de embriões na EF2 não esteve ligada à resposta positiva no recolhimento de oócitos e sim a um aumento significativo na taxa de conversão de blastocisto (60%), sendo este resultado o mais elevado do experimento. A taxa de conversão de oócito para embrião da fase pré-tratamento foi de

21,05%. A taxa de conversão individual chegou a ser de 83,33%. Resultado este superior em até 50% aos achados por Gonçalves *et al.* (2008) e em 54,2% por Renesto (2004).

A taxa de conversão geral de oócitos para embriões foi de 43,07%, sendo superiores ao intervalo de 30 a 40% relatado por Feugang *et al.* (2009); 25 a 40% por Varago *et al.* (2008); 35% de Gonçalves *et al.* (2008); 27,8 a 29,9% por Pontes *et al.* (2008); 17,2% e 19,4% de Renesto (2004); 30% de Rizos *et al.* (2002) e de 19 a 27% de Majerus *et al.* (2000). A taxa de conversão de oócitos para blastocistos das doadoras que receberam as vitaminas não foi significativamente diferente daquelas do grupo controle. Não houve efeito na variável raça de animal, demonstrando que mesmo com maior disponibilidade numérica de oócitos na população ovariana, não houve baixa na qualidade oocitária. Outro indicativo importante é a confirmação da constância dos procedimentos laboratoriais, considerando que estes podem interferir nos resultados sobre embriões.

Na raça Nelore a resposta de embriões foi de 18 estruturas para EF1 e 36 para EF2, sendo ambos os valores superiores aos 9,6 oócitos na raça Nelore (RENESTO, 2004). A taxa de conversão de oócito para embrião foi de 37,5% e 36% para a fase pré e pós-tratamento, respectivamente.

Besenfelder *et al.* em 1996 já tinham relatado os benefícios do p-caroteno sintético sobre a fertilidade de coelho.

A ação da vitamina A no aumento da produção de oócitos e embriões em cultivo *in vitro* melhorou os resultados na produção de embriões (HIDALGO *et al.*, 2003; BABEIE *et al.*, 2005; NARUSE *et al.*, 2006). Quando feita a suplementação com α -tocoferol em meios de maturação *in vitro* (MIV), com embrião suíno, foi observado que o percentual de blastocisto foi superior nos embriões suplementados em comparação com o grupo controle. Porém, nenhum outro efeito benéfico foi observado com o uso isolado de α -tocoferol. Estes resultados demonstraram que os efeitos da embriotoxicidade do α -tocoferol, em termos de frequência de formação de blastocistos e número de células do blastocisto, dependem da concentração e da suplementação destas vitaminas (HOSSEIN *et al.*, 2006).

Embriões bovinos produzidos *in vivo* em programa de Superovulação (SOV) apresentaram melhora na qualidade sem alterar a produção numérica de embriões após a administração de 1.000.000 UI da vitamina A, não afetando a taxa de ovulação (SHAW *et al.*, 1995; AMARAL *et al.*, 2003).

A maior produção de oócitos e embriões pode ser explicada devido ao efeito da vitamina A administrada nos animais. Bem como, pela maior eficiência na foliculogênese e embriogênese, incluindo seus efeitos sobre a esteroidogênese, no crescimento e maturação folicular (SHAW *et al.*, 1995).

A vitamina A pode estimular uma das enzimas-chaves da esteroidogênese denominada Citocromo P450 de clivagem da cadeia lateral aumentando a viabilidade do embrião bovino (AMARAL *et al.*, 2003). O acréscimo no recolhimento de oócitos no grupo tratado foi devido ao aumento numérico de folículos na onda folicular e consequentemente maior disponibilidade de embriões.

Outra ação importante promovida pelo Vitamina A, que poderia melhorar a qualidade do embrião, seria a formação de junções celulares do tipo *gap* entre as células da granulosa. O β -caroteno pode estimular esta formação entre as células (SALES, 2005). A associação íntima entre células do *cumulus* e oócito é um requisito básico para o crescimento folicular normal e aquisição da competência folicular. As células do *cumulus* estão metabolicamente associadas com o oócito através de projeções celulares que atravessam a zona pelúcida e formam pequenas junções com o citoplasma (*gap*) sendo a única entrada de substâncias ou estímulos no ooplasma, confirmando que a presença dessas células é essencial para a maturação completa do folículo (DODE, 2005).

O β -caroteno pode aumentar a produção da proteína de ligação do retinol (RBP) que, provavelmente age no mecanismo de nutrição dos embriões (SALES, 2005). Para Hidalgo *et al.* (2005) a vitamina A é reguladora do crescimento celular embrionário, morfogênese e diferenciação em muitos tipos de células. Células da granulosa bovina sintetizam a proteína de ligação de retinol (RBP) e proteínas celulares de ligação com retinol (CRBP), e RBP mRNA não foi detectado em nenhum oócito. O ácido retinóico (AR) é o metabólito retinóide mais importante necessário para a embriogênese dos vertebrados.

Babaei *et al.* (2005) relataram evidências de que quando a vitamina A foi administrada de forma sistêmica aumentou o potencial de desenvolvimento de blastocistos em cultura e foi capaz de reduzir os efeitos adversos da vitrificação, pelo menos durante os primeiros dois dias de cultivo em embriões murinos.

A evidência da importância do retinol no desenvolvimento e diferenciação dos blastocistos bovinos *in vitro* foi confirmado com o uso de agonistas para receptores específicos de retinol, quando utilizados melhoraram a qualidade dos embriões *in vitro*, controlando o desenvolvimento e diferenciação do blastocistos (HIDALGO *et al.*, 2007; RODRÍGUEZ *et al.*, 2007).

O aumento numérico na produção de oócitos e embriões na F2 Simental, Nelore, Brahma e Gir sugere ter uma correlação com a ação da vitamina E como potente agente antioxidante. Como o que aconteceu com a suplementação de vitamina E *in vitro* no aumento de blastocistos suínos (WANG *et al.*, 2002; JEONG *et al.*, 2006). A atividade antioxidante de α -tocoferol na prevenção de radicais livres, que iniciam danos teciduais, foi aceito pela maioria dos pesquisadores e acredita-se ser o limpador primário de radicais livres nas células dos mamíferos (JEONG *et al.*, 2006).

O fator que poderia estar promovendo melhoria na quantidade oocitária nas vacas pós-tratamento destes experimentos deve-se ao efeito antioxidante dessas duas vitaminas. Conforme relatado por Sales (2005) para qualidade embrionária *in vivo*, que considera o β -caroteno e o tocoferol como agentes antioxidantes, destruindo radicais livres, em razão de sua estrutura molecular. Considerando que, durante o processo de esteroidogênese ocorre a formação de radicais livres e possível envolvimento no controle da produção de esteróides.

O tratamento de bovinos com as vitaminas A e E neste trabalho de dissertação foi decisivo para a melhoria quantitativa na produção de oócitos e embriões em sistema de produção *in vitro*. A resposta positiva teve ligação com a individualidade e forte correlação com a raça. A produção de embriões não foi influenciada com o uso das vitaminas, apresentando apenas tendência na resposta.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A administração das vitaminas A e E em bovinos, de forma parenteral, aumentou a quantidade de oócitos recuperados por aspiração folicular e produção de embriões *in vitro*;

O agrupamento dos animais por sub-espécie *Bos taurus indicus* (Raças: Nelore, Brahma e Gir), possibilitou comprovar também a eficácia das vitaminas no aumento da recuperação oocitária e produção embrionária;

Os oócitos recuperados nos animais do grupo tratado apresentaram a mesma vitalidade do grupo controle.

9 CONCLUSÃO

O uso das vitaminas A e E é recomendável em bovinos, com a finalidade de aumentar a quantidade de oócitos e produção de embriões *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ABADIA, M. E. N. C. **Transferência de embriões em bovinos: revisão de literatura.** Monografia (Especialização) - Universidade Castelo Branco, Goiânia, 2006.

ADAMS, G. P.; JAISWAL, R. Follicular dynamics in cattle: historical overview and research update. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, suppl. 2, p. 377-396, 2008.

AJMONE-MARSAN, P.; GARCIA J. F. Origin and evolution of domestic cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, suppl. 2, p. 241-256, 2008.

ALONSO, R. V. **Fatores que afetam a viabilidade e a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro* em programa de sexagem comercial.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

ALOSILLA, C.E.; MCDOWELL, JR., L.R.; WILKINSON, N.S.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; MARTIN, F.G.; BLAIR M. Bioavailability of vitamin A sources for cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p.1235-1238, 2006.

ALVES, D. F.; RAUBER, L. P.; RUBIN, F. B.; BERNARDI, M. L.; DEZEN, D.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 4, 2003.

AMARAL, B. C. do; SOUZA, J. C. de; BERTECHINI, A. G.; VIVEIROS, A. T. M.; TEIXEIRA, J. C.; ARANTES, A. F. A. Efeito de diferentes dosagens de vitamina A injetável na produção e qualidade de embriões bovinos da raça Nelore. **Ciência Agrotécnica**, v. 28, n. 3, p. 662-667, 2004.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 1994.

BABAEI, H.; NEMATALLAHI-MAHANI, S. N.; KHERADMAND, A. The effects of Vitamin A administration on the development of vitrified-warmed mouse blastocyst. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 125–133, 2006.

BEM, A. R. de; RUMPF, R.; SOUSA, R. V. de; et al. **Manual sobre transferência de embrião e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN. 1995. 123P.

BESENFELDER, U.; SOLTI, L.; SEREGI, J.; MIILLER, M.; BREM, G. Different roles for b-carotene and vitamin a in the reproduction on rabbits. **Theriogenology**, v. 45, p. 1583-1591, 1996.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Vitamin E and drug metabolism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 737–740, 2003.

BRUM, D. dos S.; LEIVAS, F. G.; BERNARDI, M. L.; MOZZAQUATRO, F. D.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Cultivo de embriões bovinos produzidos in vitro: efeito do número de embriões e da proporção de meio. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 145-151, 2006.

CARVALHO, J. O.; MACHADO, G. M.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. .N. Different percoll volumes, time and force of centrifugation on in vitro production and sex of bovine embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, suppl. 2, p. 515, 2008.

DODE, M. A. **Workshop de Reprodução Animal**. 1. ed. Pelotas: Embrapa, 2006.

DONNAY, I.; VAN LANGENDONCKT, A.; AUQUIER, P.; GRISART, B.; VANSTEENBRUGGE, A.; MASSIP, A.; DESSY, F. Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 47, p.1549-1561, 1997.

FEUGANG, J. M.; CAMARGO-RODRÍGUEZ, O.; MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. **Livestock Science**, v. 121, p. 141–149, 2009.

GILCHRIST, R. B. Oocyte-cumulus cell interactions regulating oocyte quality. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, suppl. 2, p. 269-278, 2008.

GOMEZ, E.; CAAMANO, J.; RODRIGUEZ, A.; DE FRUTOS, C.; FACAL, N.; DIEZ, C. Bovine early embryonic development and vitamin A. **Reproduction in domestic animals**, v. 41, p. 63-71, 2006.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. *In vitro* production of bovine embryos: the state of the art. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SIQUEIRA, L. C., ANTONIAZZI, A. Q. Biotecnologias da reprodução animal produção *in vitro* de embriões bovinos. **CIÊNCIA VETERINÁRIA NOS TRÓPICOS**, v. 11, suppl. 1, p. 135-138, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

HIDALGO, C. O.; DIEZ, C.; DUQUE, P.; FACAL, N.; GOMEZ, E. Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured in vitro with 9-cis-retinoic acid. **Reproduction**, v. 125, n. 3, p. 409-416, 2003.

HIDALGO, C.O.; DÍEZ, C DUQUE, P. PRENDES, J. M. RODRÍGUEZ, A. GOYACHE, F. FERNÁNDEZ, I, FACAL, N, IKEDA, S.ALONSO-MONTES, C. AND GÓMEZ, E. Oocytes recovered from cows treated with retinol become unviable as blastocysts produced *in vitro*. **Reproduction**, n. 129, p. 411-421, 2005.

JEONG, Y. W.; PARK, S. W.; HOSSEIN, M. S.; KIM, S.; KIM, J. H.; LEE, S. H; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Antiapoptotic and embryotrophic effects of α -tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 66, p. 2104–2112, 2006.

KASTELIC, J. **Workshop de Reprodução Animal**. 1. ed. Pelotas: Embrapa, 2006.

KOO, D. B.; KIM, N. H.; LEE, H. T.; CHUNG, K. S. Effects of fetal calf serum, amino acids, vitamins and insulin on blastocoel formation and hatching of *in vivo* and ivm/ivf-derived porcine embryos developing *in vitro*. **Theriogenology**, v. 48, p. 791-802, 1997.

KRUIP, T. H. A. M.; BONI ,R.; WURTH ,Y. A.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERS, M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v. 42, p. 675-684, 1994.

LEIVAS, F. G. **Influência da atmosfera gasosa e da fonte protéica sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* e taxa de prenhez em bovinos**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

LIVIGSTON, T.; EBERHARDT, D.; EDWARDS, J. L.; GODKIN, J. Retinol improves bovine embryonic development *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 83, 2004.

LONERGAN, P. *In vitro*-produced bovine embryos - dealing with problems. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, suppl. 2, p. 355-360, 2008.

LONG, C. R. Laser assisted hatching in bovine *in vitro* produced embryos to improve pregnancy rates. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, suppl. 2, p. 315-318, 2008.

MAJERUS, V.; ROOVER, R. ; DE ETIENNE, D. ; KAIDI, S. ; MASSIP, A. ; DESSY F. ; DONNAY. I. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. **Theriogenology**, v. 52, p. 1169-1179, 1999.

MOTULSKY, H. **Intuitive biostatistics**. Oxford: Oxford University Press, 1995.

NARUSE, K.; KIM, H. R.; SHIN, Y. M.; CHANG, S. M.; LEE, H. R.; PARK, C. S.; JIN, D. I. Low concentrations of MEM vitamins during *in vitro* maturation of porcine oocytes improves subsequent parthenogenetic development. **Theriogenology**, v. 67, p. 407–412, 2007.

OLSO, S. E.; SEIDEL, G. E. Jr. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 248-252, 2000.

PASCHOAL, D. M.; SUDANO, M. J.; RASCADO, T. S.; MACEDO, C. C.; SILVA, A. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Effect of forskolin treatment on *in vitro* production of bovine embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, suppl. 2, p. 503, 2008.

PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; MAJEWSKI, A. C.; McDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Manipulation of Antioxidant Status Fails to Improve Fertility of Lactating Cows or Survival of Heat-Shocked Embryos. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 7, p. 2343-2351, 2003.

PIVATO, I. **Workshop de Reprodução Animal**. 1. ed. Pelotas: Embrapa, 2006.

PONTES, J. H. F.; FERNANDES, C. R.; SILVA, K. C. F.; SANTOS, G. M. G.; STERZA, F. A. M.; MAX, M. C.; SENEDA, M. M. Influence of gas atmosphere on *in vitro* embryo development and pregnancy rate in cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, suppl. 2, p. 530, 2008.

REICHENBACH, H. D. Embryo transfer and cryopreservation in cattle: practical considerations. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17, 2003. **Anais...** Beberibe-CE: SBTE, 2003. p. 28-50.

RENESTO, A. **Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultrasonografia e superovulação na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 229-233, 2007.

SALES, J. N. de S. **Resposta superovulatória e qualidade de embriões de novilhas e vacas holandesas suplementadas com duas doses de β -Caroteno associado ao tocoferol.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SEN, C.K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols in health and disease: The other half of the natural vitamin E family. **Molecular Aspects of Medicine**, v.28, p. 92–728, 2007.

SEN, C.K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences**, v. 78, p. 2088–2098, 2006.

SHAW, D. W.; FARIN, P. W.; WASHBURN, S. P. BRITT, J. H. Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 44, p. 51-58, 1995.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS. *SAS User's Guide*. Cary, North Carolina: Statistical Analysis Systems Institute Inc; 2003.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. Illinois-USA, 1998. 180P.

THERIAULT, A.; CHAO, J.; WANG, Q.; GAPOR, A.; ADELI, K. Tocotrienol: A Review of Its Therapeutic Potential. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 309–319, 1999.

TRABE, M. G.; SERBINOVAT, E. A.; PACKERT, L. Biological Activities of Tocotrienols and Tocopherols. **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. 1999.

TROUT, J. P.; McDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Characteristics of the Estrous Cycle and Antioxidant Status of Lactating Holstein Cows Exposed to Heat Stress. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1244–1250, 1998.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. de A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VELASQUEZ-PEREIRA, J.; ARECHIGA, C. F.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J.; CHENOWETH, P. J.; CALHOUN, M. C.; RISCO, C. A.; BATRA, T. R.; WILLIAMS, S. N. Effects of gossypol from cottonseed meal and dietary vitamin E on the reproductive characteristics of superovulated beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 9, p. 2485-2492, 2002.

VILA, R.A.; ELIAS, F.P.; RENZI, A.; RUFATO, M.A.F.; VIEIRA, M.T.V.; LÔBO, R.B. Influence of the antibiotic in the kinetics of development of bovine. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, suppl. 2, p. 517, 2008.

WADAA, S.; SATOMIA, Y.; MURAKOSHIB, M.; NOGUCHIC, N.; YOSHIKAWAE, T.; NISHINO, H. Tumor suppressive effects of tocotrienol in vivo and in vitro. **Cancer Letters**, v. 229, p. 181–191, 2005.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M .; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress–induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v. 78, n. 6, p. 1272-1277, 2002.

WEISS, W.P. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, 1998

YANO H, OHTSUKA H, MIYAZAWA M, ABIKO S, ANDO T, WATANABE D, MATSUDA K, KAWAMURA S, ARAI T, MORRIS S. Relationship between immune function and serum vitamin A in Japanese black beef cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, suppl. 2, p. 199-202, 2009.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 123, p. 63-75, 2003.

ZINGG, J. Vitamin E: An overview of major research directions. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 400–422, 2007.