

**RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E  
QUALIDADE DE EMBRIÕES DE NOVILHAS  
E VACAS HOLANDESAS SUPLEMENTADAS  
COM DUAS DOSES DE  $\beta$ -CAROTENO  
ASSOCIADO AO TOCOFEROL**

**JOSÉ NÉLIO DE SOUSA SALES**

**2005**

**JOSÉ NÉLIO DE SOUSA SALES**

**RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E QUALIDADE DE EMBRIÕES DE  
NOVILHAS E VACAS HOLANDESAS SUPLEMENTADAS COM DUAS  
DOSES DE  $\beta$ -CAROTENO ASSOCIADO AO TOCOFEROL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. José Camisão de Souza

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Sales, José Nélio de Sousa

Resposta superovulatória e qualidade de embriões de novilhas e vacas holandesas suplementadas com duas doses de  $\beta$ -Caroteno associado ao tocoferol / José Nélio de Sousa Sales. -- Lavras : UFLA, 2005.

69 p. : il.

Orientador: José Camisão de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1.  $\beta$ -Caroteno. 2. Tocoferol. 3. Transferência de embrião. 4. Bovino. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-636.208245

**JOSÉ NÉLIO DE SOUSA SALES**

**RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E QUALIDADE DE EMBRIÕES DE  
NOVILHAS E VACAS HOLANDESAS SUPLEMENTADAS COM DUAS  
DOSES DE  $\beta$ -CAROTENO ASSOCIADO AO TOCOFEROL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Lavras como parte das exigências do Curso de  
Mestrado em Zootecnia, área de concentração em  
Produção Animal, para a obtenção do título de  
“Mestre”.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2005

Profa. Ana Tereza de Mendonça Viveiros UFLA

Prof. Hamilton Carmélio Machado da Silva UFMG

Prof. Marcos Neves Pereira UFLA

Prof. José Camisão de Souza  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, por eu ter a oportunidade  
de estar aqui escrevendo esta  
dissertação.

Aos meus pais, José Maria e Maura,  
que, com muito carinho, amor e  
atenção, mostraram-me o caminho  
da verdade, justiça e paz.

### **DEDICO.**

Aos meus irmãos, Christian, Sabrina  
e Felipe, que muito torceram para  
que eu alcançasse mais este objetivo.

À minha querida namorada, Fabíola,  
por ser paciente, por ajudar na minha  
formação acadêmica e profissional e  
por oferecer muito carinho e  
companheirismo.

### **OFEREÇO.**

**O Senhor é meu pastor nada me faltará.**

(Salmo 23)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me criado e acompanhado por todos estes anos, trazendo para mim pessoas de bom caráter e uma família muito especial.

Ao professor José Camisão de Souza, pela sua inteligência e simplicidade, pela sua busca incansável de passar seus conhecimentos, por ensinar me como ser bom profissional e pesquisador e, além disso, por ser um grande amigo que confiou-me grande parte de seus trabalhos e vida.

À Universidade Federal de Lavras, por fornecer esta opção na minha vida e à CAPES, pelo incentivo financeiro cedido durante o período do mestrado.

A toda a minha família que, de uma forma ou de outra, fez parte da minha vida, ajudando a formar meu caráter.

Aos professores Ana Tereza Mendonça Viveiros, Hamilton Carmélio Machado da Silva e Marcos Neves Pereira, que prontamente aceitaram o convite para fazer parte da banca de defesa e pelas contribuições a elaboração final desta dissertação.

À Vallée S.A., em especial a Sérgio Cirillo, que conseguiu o financiamento para o desenvolvimento do projeto junta a esta empresa genuinamente brasileira.

À Fazenda Vista Alegre III, em especial ao Paulo Paiva e Carlos Humberto por cederem seus animais para coleta de embriões e a todos os funcionários desta fazenda que me auxiliaram na execução desse experimento, em especial ao Vicente, Nerci (Preto) e João Lima que, além da ajuda durante este período, demonstraram amizade e confiança.

Às outras fazendas onde foram coletados alguns animais, em especial Dudu, Flávio, Gui, Carla, Marcos Brandão, Marcos Paulo, Adriano e Alvinho, que permitiram a execução do experimento em suas propriedades.

Aos acadêmicos e amigos Ludmila, Lili, Leandro, Luthesco e Mariana, que me auxiliaram na condução do meu experimento.

A Érika, do LDH da Escola de Veterinária da USP por realizar a análise de progesterona e pela disponibilidade para solucionar dúvidas sobre radioimunoensaio e à querida amiga LÍlian, por conseguir que as análises de progesterona fossem realizadas nesta instituição, além de estar sempre disposta a ajudar seus amigos.

Aos professores da pós-graduação, por fazerem parte dessa nova conquista.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, Keila, Carlos e Pedro, pelo auxílio e informações relevantes ao mestrado.

Aos novos amigos que obtive na pós-graduação e com quem passei momentos agradáveis.

Aos meus verdadeiros e velhos amigos de Lavras, Quirino, Diovanni e Pereira (*in memorian*), por momentos de muita felicidade que passamos juntos.

A todos os amigos que conquistei nesta vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	i
<b>RESUMO</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	3
<b>2.1 Transferência de embriões</b> .....	3
<b>2.1.1 Seleção de doadoras e receptoras</b> .....	3
<b>2.1.2 Sincronização do ciclo estral de doadoras</b> .....	4
<b>2.1.3 Superovulação</b> .....	5
<b>2.1.4 Coleta de embriões</b> .....	6
<b>2.1.5 Qualidade embrionária</b> .....	7
<b>2.2 Antioxidantes, radicais livres e reações de oxidação</b> .....	11
<b>2.3 <math>\beta</math>-caroteno</b> .....	14
<b>2.3.1 Estrutura química e propriedades</b> .....	14
<b>2.3.2 Fontes naturais de carotenóides</b> .....	16
<b>2.3.3 Digestão dos carotenóides</b> .....	17
<b>2.3.4 Absorção e transporte dos carotenóides</b> .....	18
<b>2.3.5 Armazenamento dos carotenóides</b> .....	19
<b>2.3.6 Funções do <math>\beta</math>-caroteno</b> .....	19
<b>2.3.6.1 Antioxidante</b> .....	19
<b>2.3.6.2 Precursor da vitamina A</b> .....	20
<b>2.3.6.3 Resposta imune</b> .....	21
<b>2.3.6.4 Reprodução</b> .....	21
<b>2.3.6.5 Outras funções</b> .....	24
<b>2.4 Vitamina E (Tocoferol)</b> .....	25
<b>2.4.1 Definição</b> .....	25



2.4.2 Estrutura química e propriedades .....	26
2.4.3 Fontes naturais de vitamina E.....	28
2.4.4. Absorção e transporte da vitamina E.....	29
2.4.5 Armazenamento e excreção da vitamina E.....	29
2.4.6 Funções da vitamina E .....	30
2.4.6.1 Coagulação sanguínea .....	30
2.4.6.2 Resistência a doenças.....	30
2.4.6.3 Ação antioxidante .....	31
2.4.6.4 Ações na reprodução .....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	34
3.1 Localização e período experimental.....	34
3.2 Animais.....	34
3.3 Sincronização, superovulação e inseminação artificial .....	34
3.4 Tratamentos .....	36
3.5 Transferência de embriões .....	37
3.5.1 Coleta.....	37
3.5.2. Rastreamento dos embriões no laboratório .....	38
3.6 Coleta de sangue e análise de progesterona.....	39
3.7 Delineamento experimental.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
5 CONCLUSÕES .....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA	albumina sérica bovina
cAMP	adenosinmonofosfato cíclico
CSCCE	enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol
DMPBS	Dulbecco modificado de tampão salina-fosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
FSH	hormônio folículo estimulante
HDL	lipoproteína de densidade alta
IA	inseminação artificial
IM	intramuscular
IQE	índice de qualidade embrionária
LDL	lipoproteína de densidade baixa
LH	hormônio luteinizante
PMSG	gonadotrofina sérica de égua prenhe
THF	tetrahydrofurano
IU	unidade internacional
VIAVP	proporção de embriões viáveis
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

## RESUMO

SALES, José Nélio de Sousa. **Resposta superovulatória e qualidade de embriões de novilhas e vacas holandesas suplementadas com duas doses de  $\beta$ -caroteno associado ao tocoferol.** 2005. 69p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>

Avaliou-se o efeito da injeção intramuscular (IM) de  $\beta$ -caroteno e vitamina E na produção e qualidade de embriões coletados vacas (n=86) e novilhas (n=91) que foram sincronizadas (Crestar®) e superovuladas com 8 aplicações decrescentes de FSH/LH $\beta$  em intervalos de 12 horas. Os animais foram inseminados 12 e 24 horas após a observação do cio e a coleta realizada sete dias após a primeira inseminação. Os animais foram alocados aleatoriamente para um dos três tratamentos: 1) controle, 2) 800mg de  $\beta$ -caroteno e 500mg vitamina E e 3) 1.200mg de  $\beta$ -caroteno e 750mg de vitamina E. As injeções de suplementação foram aplicadas no dia do implante e no início do protocolo superovulatório. A qualidade embrionária foi estimada por um índice ou IQE (Excelentes\*1 + Bons\*2 + Regulares\*3 + Pobres\*4 + Degenerados\*5 + NF\*5)/total de embriões colhidos. Houve efeito de interação tipo de animal (novilha e vaca) vs tratamento para o IQE ( $P=0,01$ ) e para a proporção de embriões viáveis ( $P=0,03$ ), em que a qualidade embrionária foi melhorada em vacas suplementadas com T1200, mas não em novilhas. Os IQE para novilhas e vacas em controle, T800 e T1200 foram 2,64 $\pm$ 0,29 e 3,59 $\pm$ 0,29; 2,52 $\pm$ 0,31 e 3,63 $\pm$ 0,36; 2,91 $\pm$ 0,28 e 2,69 $\pm$ 0,31, respectivamente. A proporção de embriões viáveis para novilhas e vacas nos tratamentos controle, T800 e T1200 foram 70 $\pm$ 7 e 45 $\pm$ 9; 74 $\pm$ 8 e 45 $\pm$ 11; 61 $\pm$ 7,3 e 70 $\pm$ 9, respectivamente. Houve efeito de interação tratamento\*tipo para o total de embriões viáveis ( $P=0,01$ ). A suplementação com  $\beta$ -caroteno e tocoferol aumentou o número de embriões viáveis em vacas (3,50 $\pm$ 1,12; 5,41 $\pm$ 1,38 e 7,50 $\pm$ 1,19 para controle, T800 e T1200, respectivamente) mas diminuiu em novilhas (7,52 $\pm$ 1,16; 5,60 $\pm$ 1,23 e 3,94 $\pm$ 1,12 para Controle, T800 e T1200, respectivamente). A aplicação de  $\beta$ -caroteno associado ao tocoferol melhora a qualidade de embriões de vacas holandesas superovuladas.

---

<sup>1</sup>Comitê orientador: José Camisão de Souza - UFLA (Orientador), Ana Tereza Mendonça Viveiros - UFLA, Hamilton Carmélio Machado da Silva - UFMG e Marcos Neves Pereira - UFLA.

## ABSTRACT

SALES, José Nélio de Sousa. **Superovulatory response and embryo quality of Holstein heifers and cows supplemented with two doses of  $\beta$ -carotene associate with tocopherol.** 2005. 69p. Dissertation (Master in Animal Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>

To investigate the effect of betacarotene and vitamin E on bovine embryo production and quality cows (n=86) and heifers (n=91) were synchronized (Crestar®) and superovulated with 8 decreasing injections of FSH/LHp at 12h intervals. Embryos were flushed seven days after the first AI on induce heat. Animals were allocated randomly to one of three treatments: 1) control, 2) 800mg of  $\beta$ -carotene and 500mg of vitamin E (T800) and 3) 1,200mg of  $\beta$ -carotene and 750mg of vitamin E (T1200). Supplemental injections were given at implantation and first FSH injection. Embryo quality was measured by an index or IQE (Excelent\*1 + Good\*2 + Regular\*3 + Poor\*4 + Degenerate\*5 + NF\*5) / total embryo number. There was an interactive effect between animal type (cow or heifer) and treatment for IQE ( $P=0.01$ ) and for proportion of viable embryos ( $P=0,03$ ), where embryo quality was improved in cows supplemented with T1200 but not in heifers. IQE for heifers and cows in control, T800 and T1200 were,  $2.64\pm 0.29$  and  $3.59\pm 0.29$ ;  $2.52\pm 0.31$  and  $3.63\pm 0.36$ ;  $2.91\pm 0.28$  and  $2.69\pm 0.31$  respectively. The proportion of viable embryos for heifers and cows in control, T800 and T1200 were,  $70\pm 7$  and  $45\pm 9$ ;  $74\pm 8$  and  $45\pm 11$ ;  $61\pm 7.3$  and  $70\pm 9$ , respectively. There was an interactive effect between animal type and treatment for total viable embryos ( $P=0.01$ ). Supplementation with  $\beta$ -carotene and tocopherol increased the number of viable embryo in cows ( $3.50\pm 1.12$ ;  $5.41\pm 1.38$  and  $7.50\pm 1.19$  for control, T800 and T1200, respectively), but decreased in heifers ( $7.52\pm 1.16$ ;  $5.60\pm 1.23$  and  $3.94\pm 1.12$  for control, T800 and T1200, respectively).  $\beta$ -carotene and tocopherol supplementation is an alternative to improve embryo quality in superovulated Holstein cows.

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: José Camisão de Souza - UFLA (Major Professor), Ana Tereza Mendonça Viveiros - UFLA, Hamilton Carmélio Machado da Silva - UFMG and Marcos Neves Pereira - UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

A transferência de embriões vem evoluindo desde sua origem, na década de 1970, quando a coleta era realizada por método cirúrgico e a criopreservação de embriões pouco eficiente, o que obrigava a realização de transferência de embriões a fresco. Atualmente, mais de 100.000 coletas são realizadas por ano no mundo, sendo feitas por método não cirúrgico e mais da metade dos embriões colhidos são congelados.

Existem vários fatores que influenciam o sucesso da transferência de embriões. Os principais são a superovulação, a qualidade do embrião coletado e o estado geral da receptora. Em resposta à superovulação existe grande variabilidade individual que limita sua utilização. Vários estudos da foliculogênese, principalmente com o uso do ultra-som, vêm sendo realizados para diminuir a variabilidade da resposta à superovulação entre as doadoras. Dentre esses estudos, tem-se a formulação de protocolos para sincronizar o início da onda folicular das doadoras com o momento de iniciar aplicação do FSH para promover a superovulação.

A qualidade embrionária é muito importante em programas de transferência de embriões, pois reflete diretamente na taxa de gestação após a inovulação. Existem vários fatores que atuam na qualidade do embrião coletado. Um deles seria o nutricional que ainda é pouco estudado tanto em doadoras quanto em receptoras.

Dentre os fatores nutricionais que atuam na qualidade embrionária, têm-se os antioxidantes, em especial o  $\beta$ -caroteno associado ao tocoferol (vitamina E). A utilização de  $\beta$ -caroteno e tocoferol melhora a eficiência reprodutiva em várias espécies animais. No entanto, os efeitos desses antioxidantes ainda não foram relacionados com a qualidade dos embriões em programas de

transferência. Outro fator que pode atuar na qualidade embrionária é a concentração de progesterona, por aumentar a produção de fatores uterinos responsáveis pela nutrição do embrião no período inicial de seu desenvolvimento.

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da injeção intramuscular (IM) de  $\beta$ -caroteno associado ao tocoferol na produção e qualidade de embriões coletados de doadoras da raça holandesa.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Transferência de embriões**

A transferência de embriões é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras, com a finalidade de completarem o período de gestação. Sua importância básica para a produção animal está na possibilidade da fêmea produzir número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva (Reichenbach et al., 2002).

#### **2.1.1 Seleção de doadoras e receptoras**

Na maioria dos programas de transferência de embriões existem dois critérios amplos para a seleção de doadoras: 1) superioridade genética, que resulta no melhoramento das várias características produtivas como, por exemplo, produção e composição de leite, taxa de crescimento, facilidade de parto e resistência a doenças e 2) probabilidade de produzir grande número de embriões viáveis (Seidel Junior & Seidel, 1991).

Após essa prévia seleção, realiza-se a avaliação do estado geral e reprodutivo para determinar as possíveis alterações que comprometam a resposta do animal ao processo de coleta de embriões. Para doadora no puerpério deve-se observar um período mínimo de 60 dias após o parto para iniciar o programa de transferência. Elas precisam estar ciclando normalmente e devem apresentar histórico de pós-parto normal, sem distúrbios endócrinos e de infecções inespecíficas do trato genital (Seidel Junior & Seidel, 1991; Reichenbach et al., 2002).

As receptoras constituem parte fundamental no programa de transferência de embriões porque precisam conceber e levar a gestação a termo. A aquisição desses animais é de custo elevado e a manutenção é dispendiosa. Novilhas, primíparas e pluríparas que apresentem ciclo estral regular, que tenham parido há mais de 60 dias, em que o puerpério tenha decorrido normalmente e que estejam livres de doenças ou anomalias do trato reprodutivo, podem ser selecionadas como receptoras de embriões (Seidel Junior & Seidel, 1991).

As receptoras devem ter porte compatível com a raça do embrião a ser transferido, para garantir gestação normal e parto livre de auxílio obstétrico, bem como ser capaz de produzir leite suficiente para amamentar e permitir que a cria se desenvolva normalmente. A seleção final da receptora de embriões somente deve ocorrer no dia da transferência, em função dos sinais de estro evidenciados após a sincronização e da avaliação do corpo lúteo (Reichenbach et al., 2002).

### **2.1.2 Sincronização do ciclo estral de doadoras**

Em programas de transferência de embriões, a sincronização de doadoras é indicada quando se pretende concentrar as coletas em um único dia. Esta prática permite a racionalização dos procedimentos e melhor aproveitamento das receptoras disponíveis (Reichenbach et al., 2002). A sincronização do ciclo estral pode ser obtida por meio de uma ou duas injeções IM de prostaglandina. No caso de duas aplicações, elas devem ser feitas em intervalos de 11-14 dias, nos animais que apresentarem ciclo estral regular (Burfening et al., 1978). O ciclo estral de um grupo de doadoras pode também ser sincronizado por tratamento com progestágenos impregnados em dispositivos intravaginais (Macmillan & Peterson, 1993; Mapletoft et al., 2003) ou implantes auriculares (Tregaskes, et al., 1994).



### 2.1.3 Superovulação

Logo após o nascimento, os ovários de fêmeas bovinas contêm milhares de folículos, entretanto, a minoria desenvolve, madura e ovula durante a vida reprodutiva. No início da onda folicular, um grupo de folículos é recrutado para iniciar o desenvolvimento por mecanismo ainda desconhecido, permanecendo o restante em aquiescência (Hafez & Hafez, 2000).

No grupo de folículos que iniciam a emergência da onda, um deles é selecionado, torna-se dominante e continua seu desenvolvimento à frente dos demais. Este folículo começa a produzir grande quantidade de estradiol 17 $\beta$ , inibina e outros fatores hormonais (Bodensteiner et al., 1996; Ginther et al., 1996) que induzem o restante dos folículos, chamados folículos subordinados, à regressão e à atresia (Sunderland et al., 1994).

Aproximadamente 20 a 30 folículos emergem durante cada onda folicular em raças taurinas e cerca de 45 pequenos folículos (<5mm) em novilhas de raças zebuínas. A maioria deles tem potencial para alcançar o estágio pré-ovulatório com estimulação do crescimento e ovulação por administração de gonadotrofinas (Monniaux et al., 1983; Adams, 1994; Buratini Júnior et al., 2000; Barros & Nogueira, 2001).

O aproveitamento mais racional dos folículos que se tornariam atresícos pode ser obtido por meio da superovulação. A superovulação pode ser definida como o método hormonal de estimular diversos folículos terciários a se desenvolverem até o estágio pré-ovulatório, com subsequente ovulação e formação do corpo lúteo. O tratamento superovulatório tem como objetivo suprir a deficiência da concentração de FSH antes que o folículo dominante promova a redução da concentração endógena dessa gonadotrofina (Reichenbach et al., 2002).

Existem alguns tratamentos hormonais para induzir a superovulação. Um deles seria a gonadotrofina sérica de égua prenhe (PMSG ou eCG), administrada uma única vez no início do período superovulatório, associada (Alfurajji et al., 1993) ou não a anti-PMSG (Boland et al., 1978). O outro seria o FSH puro ou associado ao LH. O FSH, extraído de pituitária de suínos, ovinos ou eqüinos, é o mais utilizado em bovinos para promover a superovulação. As aplicações são realizadas durante quatro dias, com duas aplicações intervaladas de 12 horas em doses decrescentes (Donaldson, 1989).

#### **2.1.4 Coleta de embriões**

A coleta é realizada entre o sexto e oitavo dia após a primeira inseminação artificial (IA) e normalmente é feita 12 horas após o início do cio. Nesse período, os embriões encontram-se flutuando em um filme líquido no lúmen da ponta dos cornos uterinos, o que permite sua captação mediante técnica de lavagem dos mesmos (Reichenbach et al., 2002).

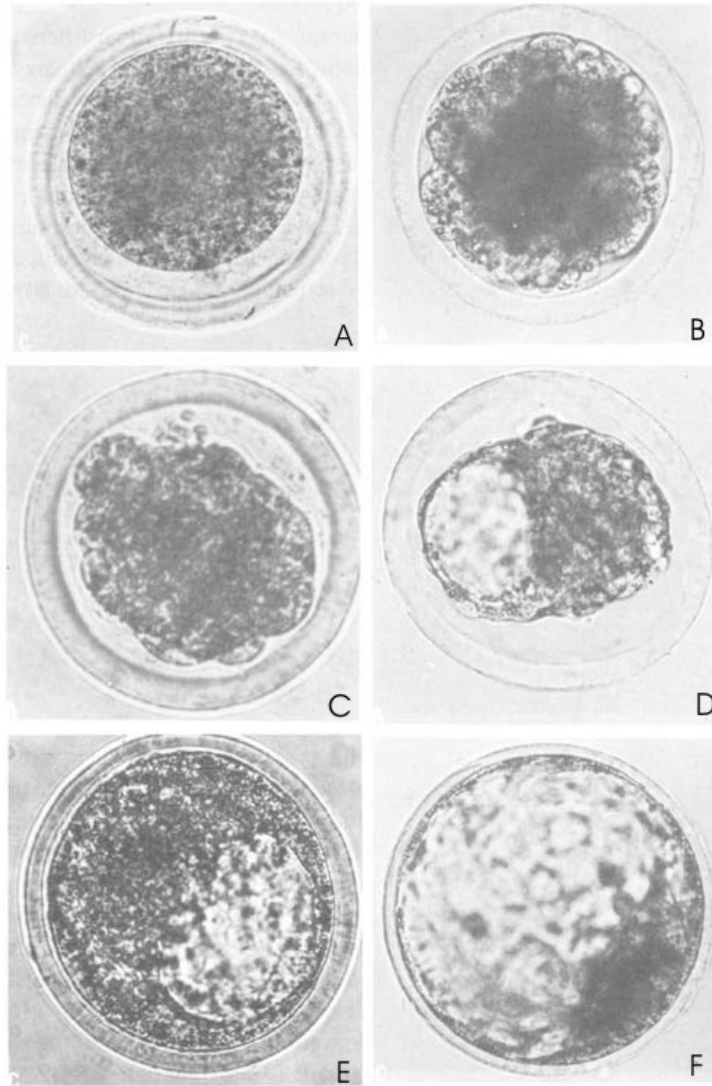
A coleta não cirúrgica pode ser realizada em sistema aberto ou fechado. A lavagem uterina é realizada pela introdução transcervical de uma sonda (Sonda Foley Siliconizada Rusch Gold<sup>®</sup>, Rusch, Kamunting, Malásia) em ambos os sistemas (Reichenbach et al., 2002).

No sistema fechado não existe contato do meio de lavagem com o ambiente exterior. Neste sistema, o meio de lavagem introduzido no corno uterino é recolhido por um sistema composto de dois tubos de plástico flexíveis, sendo um o recipiente contendo o meio de coleta e o outro um filtro para a obtenção dos embriões. Logo após a lavagem do útero, o material é vertido em placa de petri, onde, com o auxílio de um estereomicroscópio, são realizadas a busca e a avaliação dos embriões (Wright, 1981).

### 2.1.5 Qualidade embrionária

A qualidade do embrião é importante para determinar o sucesso da transferência (Abe et al., 2002). Existem vários métodos de avaliação dos embriões, dentre eles a mensuração da atividade enzimática (Schilling et al., 1979, citados por Abe et al., 2002) e o consumo de glicose (Renard et al., 1980). Esses testes são úteis para prever a sobrevivência embrionária após a transferência, mas requerem complexo equipamento e prolongado período de cultura dos embriões, inviabilizando sua utilização no campo. A avaliação morfológica tem sido amplamente usada para determinar a qualidade embrionária, útil para prever uma possível taxa de gestação para determinado grupo de embriões após a transferência (Shea, 1981; Lindner & Wright, 1983).

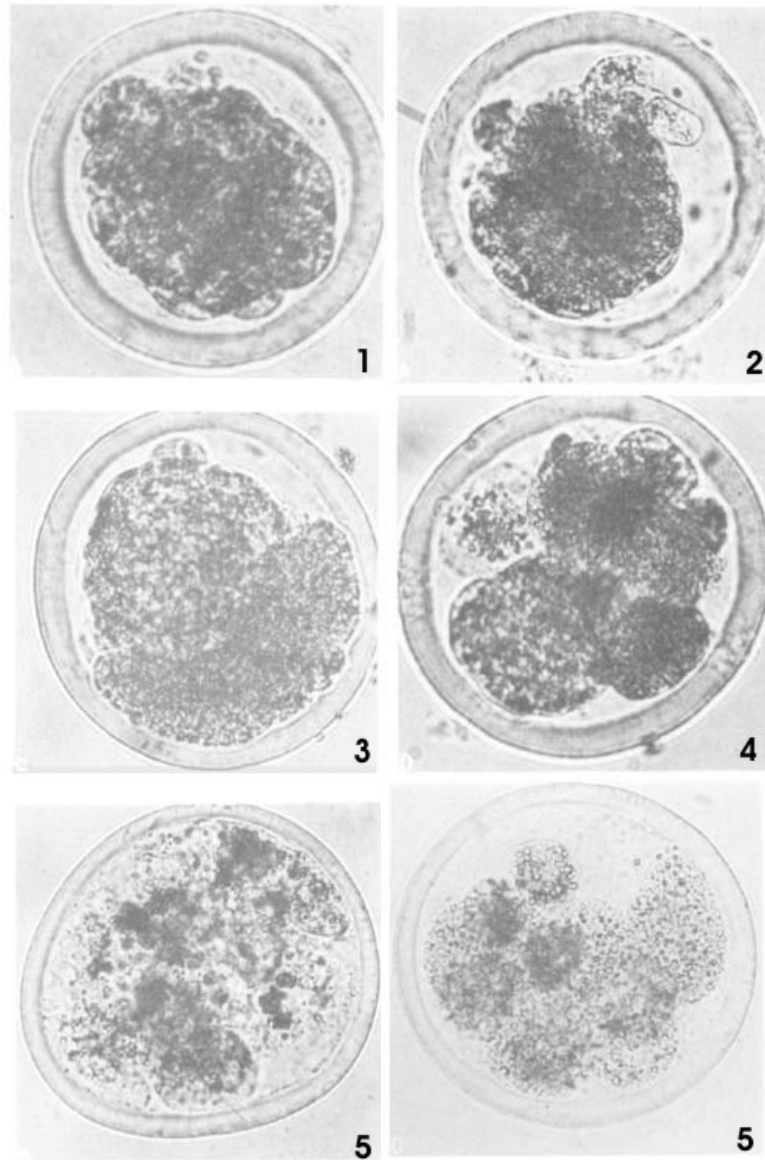
Os embriões foram classificados em cinco estádios de desenvolvimento, segundo Lindner & Wright (1983): **1) mórula** - quando as superfícies dos blastômeros que formam a massa de células central podem ainda ser distinguidas e existe estreito espaço entre a massa de blastômeros e a zona pelúcida; **2) mórula compacta** - quando não existe distinção entre as superfícies dos blastômeros e o espaço entre a massa central e a zona pelúcida torna-se maior; **3) blastocisto inicial** - quando pequena cavidade começa a se formar (blastocelo) e a massa de células interna adquire a forma; **4) blastocisto** - quando o embrião ocupa quase todo o espaço dentro da zona pelúcida, a massa de células internas torna-se mais distinta, mas o diâmetro do embrião, incluindo a zona pelúcida, continua inalterado; **5) blastocisto expandido** - quando o diâmetro do embrião aumenta e a espessura da zona pelúcida se reduz a aproximadamente 1/3 da espessura original. Além desses estádios de desenvolvimento do embrião, podem-se encontrar óvulos não fertilizados. Na Figura 1 estão representados os estádios de desenvolvimento do embrião.



**FIGURA 1** Estádios de desenvolvimento embrionário encontrados em coletas realizadas entre o 6º e o 8º dias após a primeira inseminação artificial. A- óvulo não fecundado, B- mórula, C- mórula compacta, D- blastocisto inicial, E- blastocisto, F- blastocisto expandido (Seidel Junior & Seidel, 1991).

Lindner & Wright (1983) descreveram a avaliação da qualidade de embriões bovinos coletados de vacas superovuladas. Eles identificaram quatro categorias com base nos parâmetros morfológicos, tais como forma, cor, tamanho do espaço perivitelínico, número de blastômeros extrusos e degenerados e número e tamanho de vesículas. A qualidade dos embriões pode ser dividida em: **Grau I** - embriões excelentes, em estágio de desenvolvimento que corresponde ao esperado no dia da coleta, zona pelúcida intacta e esférica, massa de células homogêneas com células de tamanho uniforme, nenhum ou poucos fragmentos de blastômeros no espaço perivitelínico; **Grau II** - embriões bons, em estágio de desenvolvimento que corresponde ao esperado no dia da coleta, pequeno desvio da forma e cor se comparado ao grau I, alguns fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelínico e ou formação de pequenas vesículas nos blastômeros; **Grau III** - embriões regulares, em estágio de desenvolvimento que corresponde ao esperado, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou tamanho, cor e densidade dos blastômeros, maior quantidade de células e restos celulares no espaço perivitelínico, se comparada ao grau II; **Grau IV** - embriões pobres, em estágio de desenvolvimento que não corresponde ao esperado, muitos fragmentos e debris celulares no espaço perivitelínico. Além disso, maiores e mais vesículas na massa celular, claras mudanças degenerativas nos blastômeros, menos da metade da massa celular está intacta. Os embriões que não se enquadraram em nenhum desses graus foram classificados como degenerados.

O termo embriões viáveis designa as estruturas compreendidas entre os graus I e IV e são os que, quando inovulados em receptoras, podem resultar em prenhez. O restante das estruturas, os não viáveis, são os chamados degenerados ou não fertilizados. Na Figura 2 estão apresentados os graus de qualidade. Após a avaliação, os embriões foram transferidos a frescos para as receptoras (inovulação) ou congelados.



**FIGURA 2** Graus de qualidade dos embriões. **1-** mórula de grau I, **2-** mórula de grau II, **3-** mórula grau III, **4-** mórula grau IV, **5-** embriões degenerados (Seidel Junior & Seidel, 1991).

Segundo Abe et al. (2002), a classificação proposta por Lindner & Wright (1983), com base na morfologia, condiz com as alterações ultra-estruturais observadas nos blastômeros. O número de junções do tipo gap foi maior em embriões classificados como excelentes ou bons. As microvilosidades projetadas dos blastômeros estavam menos desenvolvidas em embriões de baixa qualidade e a quantidade de vesículas e gotículas de lipídios foi maior em embriões classificados em grau III ou IV. Células ou fragmentos celulares foram frequentemente encontrados em embriões de baixa qualidade e o complexo de Golgi estava mais desenvolvido em embriões de alta qualidade. Houve diferença ultra-estrutural entre os embriões de grau I e II (alta qualidade) e entre os graus III e IV (baixa qualidade).

## **2.2 Antioxidantes, radicais livres e reações de oxidação**

Antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada ao substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (Sies & Stahl, 1995). Eles podem ser classificados em primários ou secundários, quanto ao modo de ação. Os antioxidantes primários reagem com radicais lipídicos de alta energia, para convertê-los a produtos termodinamicamente mais estáveis. Os antioxidantes secundários, os preventivos, têm função de retardar a iniciação da reação em cadeia (Arora et al., 1998).

Os agentes antioxidantes, que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres, podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos. Os enzimáticos podem ser superóxido desmutase, catalase, enzimas de reparo e glutathione peroxidase. Os não enzimáticos podem ser  $\beta$ -caroteno, tocoferol, vitamina C, flavonóides, glutathione e selênio (Sies, 1993).

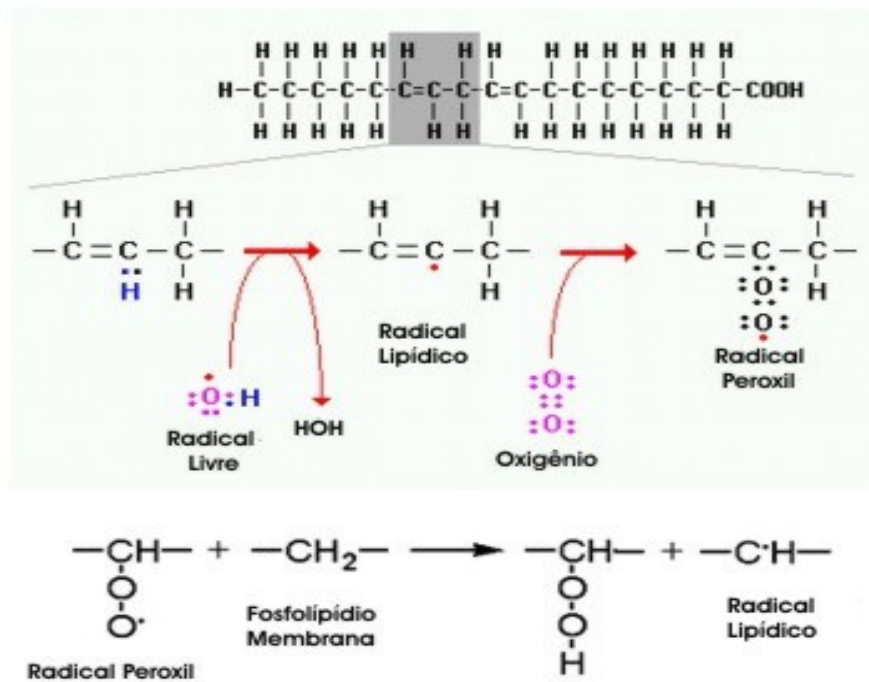
Denomina-se radical livre toda molécula que possui um elétron ímpar em sua órbita externa, fora de seu nível orbital, gravitando em sentido oposto aos outros elétrons. Este elétron livre favorece a recepção de outras moléculas, o que torna os radicais livres extremamente reativos, inclusive com moléculas orgânicas. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (Ashok & Ali, 1999).

A atividade das células do sistema antioxidante e a concentração de vitamina E diminuíram durante o envelhecimento do animal, levando ao aumento gradual dos danos oxidativos nas células (Rani e Panneerselvam, 2001). A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (Pompella, 1997). Segundo Arechiga et al. (1998b), a produção de radicais livres poderia representar uma fonte de infertilidade, em razão do tecido ovariano esteroideogênico, o espermatozóide e o embrião pré-implantação serem sensíveis a danos provocados por esses agentes oxidantes. O oxigênio singleto, molécula reativa de oxigênio gerada por fotossensibilização ( $^1\text{O}_2$ ), o radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e a radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) são alguns exemplos de radicais livres.

A oxidação é o processo pelo qual a substância perde um ou mais elétrons. A substância que recebe o eletro é conhecida como agente oxidante. Nas células de mamíferos, os fosfolípidos contidos nas membranas celulares e membrana de organelas contêm grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados que podem sofrer a ação de agentes oxidantes, como os peróxidos (Metre & Callan, 2001). As insaturações dos ácidos graxos são susceptíveis à ação dos agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, radical superóxido e íons hidroxila). Esses agentes são produzidos durante o metabolismo aeróbico e 3% a 5% do oxigênio consumido são reduzidos a agente oxidante na célula (Chance et al., 1979).



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 lipídico 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 (Porter et al., 1995). Um esquema dessas reações é apresentado na Figura 3.



**FIGURA 3** Representação esquemática da reação em cadeia em fosfolipídios de membrana celular.

Os grupos sulfídricos (-SH) presentes nas membranas também são alvos da oxidação. Eles são encontrados predominantemente nos aminoácidos que contêm enxofre e servem para ligar os fosfolipídios da membrana às proteínas associadas, tais como enzimas, receptores e canais iônicos. A oxidação destes grupos pode resultar na alteração da conformação que, conseqüentemente, muda a função dessas proteínas (Metre & Callan, 2001).

### **2.3 $\beta$ -caroteno**

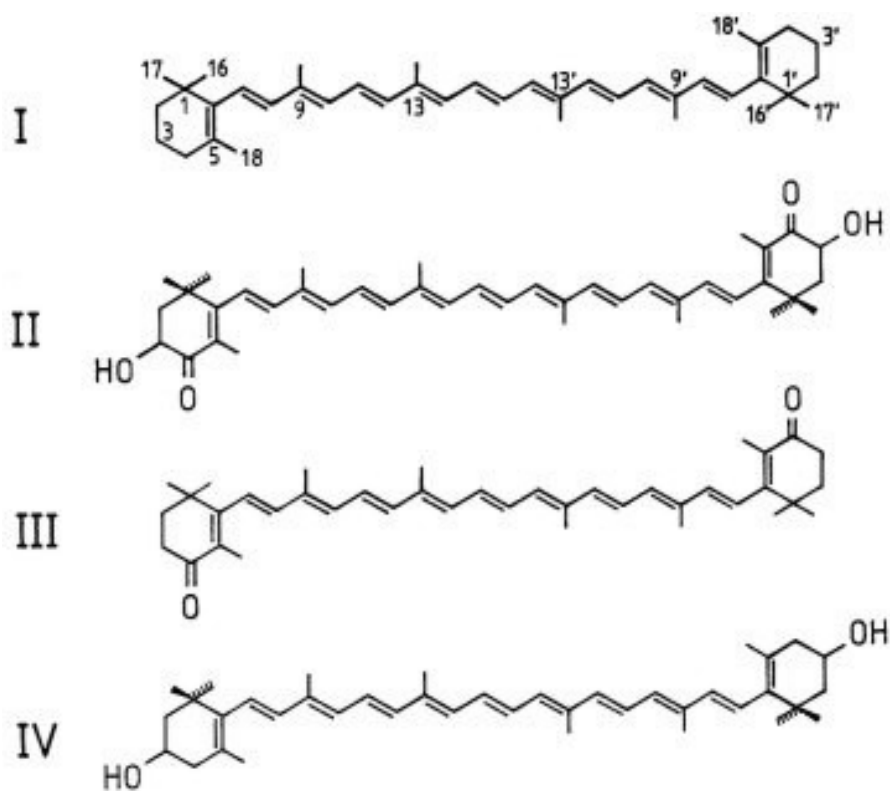
Apesar de existir mais de 600 diferentes carotenóides, apenas 10% são precursores da vitamina A, sendo o  $\beta$ -caroteno a forma mais ativa e disponível na dieta (Bendich & Olson, 1989; Olson, 1989). As plantas não produzem vitamina A, que é encontrada somente no reino animal, mas produzem grande variedade de seu precursor, os carotenóides. Uma unidade internacional (IU) de  $\beta$ -caroteno é definida como a atividade de 0,6 $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno que corresponde a 0,3 $\mu$ g de retinol (vitamina A) (Bendich & Olson, 1989; McDowell, 1989; Olson, 1989).

Carotenóides são pigmentos lipossolúveis produzidos naturalmente pelas plantas e organismos que realizam fotossíntese. Apresenta coloração variada, devido a uma série de ligações duplas conjugadas (Bendich & Olson, 1989).

#### **2.3.1 Estrutura química e propriedades**

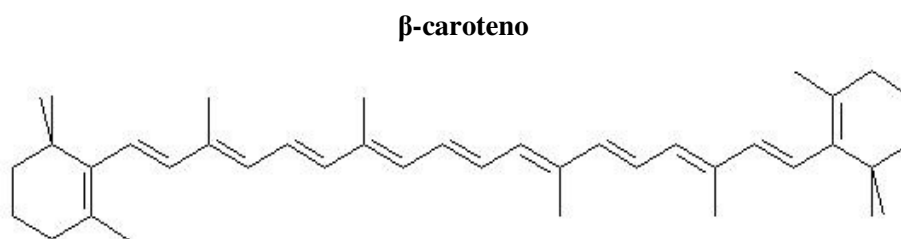
A maioria dos carotenóides pode ser descrita pela fórmula geral  $C_{40}H_{56}O_n$ , em que n varia de 0-6, formado por oito unidades isoprenóides, organizadas de tal maneira que, no centro da molécula, ocorre reversão delas (Castenmiller & West, 1998).

Os hidrocarbonetos ( $n=0$ ) são chamados de carotenóides acíclicos (licopeno) ou derivados cíclicos do licopeno ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ -caroteno) e os carotenóides oxigenados (astaxantina, cantaxantina, zeaxantina, criptoxantina e luteína) são conhecidos como xantofilas (Castenmiller & West, 1998; Osterlie et al., 2000). As estruturas químicas de alguns carotenóides estão representadas na Figura 4.



**FIGURA 4** Estrutura química de alguns carotenóides.  $\beta$ -caroteno (I), astaxantina (II), cantaxantina (III), zeaxantina (IV).

$\beta$ -caroteno (Figura 5) é uma molécula altamente lipofílica, sensível à oxidação, às altas temperaturas e à luz solar, insolúvel em solventes com etanol e acetona e solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO) e tetrahidrofurano (THF). O  $\beta$ -caroteno possui baixo potencial ionizante e ponto de fusão de 180°C (McDowell, 1989).



**FIGURA 5** Estrutura química do  $\beta$ -caroteno.

### 2.3.2 Fontes naturais de carotenóides

Os carotenóides são encontrados em todas as partes verdes de plantas em crescimento. Embora a cor amarela dos carotenóides seja mascarada pela clorofila, todas as partes da planta em crescimento são ricas em carotenóides. Na Tabela 1 apresenta-se a quantidade de  $\beta$ -caroteno em alguns alimentos para animais. Feno de leguminosa é mais rico em carotenóides do que feno de gramíneas. A planta pode perder 50% ou mais do seu valor máximo de carotenóides durante o desenvolvimento (McDowell, 1989).

**TABELA 1** Quantidade de  $\beta$ -caroteno contidos em alguns alimentos em miligramas por quilo (mg/kg).

<b>Fonte</b>	<b>mg/kg</b>
Leguminosa e gramíneas verdes frescas	33-88
Feno de leguminosas (boa coloração verde)	40-59
Feno de leguminosas (sem cor, com traço verdes)	9-18
Feno de gramíneas	9-18
Silagem de milho ou sorgo	4-22

Adaptado de McDowell (1989).

O  $\beta$ -caroteno é uma molécula muito instável. No processo de ensilagem, a concentração de  $\beta$ -caroteno diminui rapidamente e assim continua durante o tempo de armazenamento. A degradação do  $\beta$ -caroteno é promovida por vários fatores, como radiação ultravioleta da luz solar, oxigênio atmosférico (oxidação) e enzimas (lipoxidase), que se tornam ativas pela decomposição das plantas (McDowell, 1989).

### **2.3.3 Digestão dos carotenóides**

Wing (1969) demonstrou que a digestibilidade aparente dos carotenos em várias forragens para a alimentação de gado de leite é, em média, de 78%. As variáveis que influenciam a digestibilidade dos carotenóides incluem mês de colheita, tipo de forragem, espécie e matéria seca da planta. Em geral, a digestibilidade dos carotenóides é maior nos meses quentes e menor nos meses frios. Vários trabalhos indicam que quantidade apreciável de carotenóides pode

ser degradada no rúmen, isto é, 40% a 70% deles são degradados antes de chegar ao intestino (McDowell, 1989).

#### **2.3.4 Absorção e transporte dos carotenóides**

O  $\beta$ -caroteno não é assimilado da mesma forma pelas diversas espécies animais, pois há considerável diferença na habilidade para absorvê-los da dieta. Em algumas espécies, como ratos, suínos, ovinos, caprinos, coelhos e cães, quase todo o caroteno se transforma em vitamina A no intestino. Em humanos, bovinos e eqüinos, a absorção de carotenóides é expressiva (Parker, 1989).

O principal local de absorção de carotenóides é na mucosa do jejuno proximal. Neste local, formam-se micelas de lipídios que servem como carreadores dos carotenóides. Elas entram em contato com as células da mucosa, nas quais os lipídios difundem da micela para a porção lipídica da membrana das microvilosidades (McDowell, 1989). A absorção dos carotenóides ocorre por difusão passiva, similar à do colesterol e dos produtos da lipólise de triglicérides (Hollander & Ruble Júnior, 1978; Parker, 1996). Após a absorção na mucosa intestinal, os carotenóides são transportados via vasos linfáticos pelos quilomicrons até a corrente sanguínea (Parker, 1996).

Huang & Goodman (1965) relataram que, em ratos 3%-6%, dos carotenóides absorvidos passam do intestino para a linfa. A quantidade de caroteno no plasma representa 1% do total encontrado no animal, sendo a maior concentração encontrada no fígado (Schmitz et al., 1991).

Os carotenóides são transportados no plasma de humanos e animais exclusivamente por lipoproteínas. As principais lipoproteínas são de densidade baixa (LDL), densidade muito baixa (VLDL) e densidade alta (HDL). A LDL transporta 58%-73%, a HDL 17%-26% e a VLDL 10%-16% do  $\beta$ -caroteno no sangue. Esse padrão de distribuição é similar ao do colesterol (Parker, 1996).

O  $\beta$ -caroteno, normalmente transportado para os ovários é incorporado aos componentes lipídicos do HDL em bovinos (O'Shaughnessy & Wathes, 1988). Em cães (Weng et al., 2000) e em gatos (Chew et al, 2001), após sua absorção da dieta, é transportado para o corpo lúteo e endométrio uterino.

### **2.3.5 Armazenamento dos carotenóides**

Os carotenóides são armazenados na forma de vitamina A. Mais de 90% permanecem armazenado no fígado e o restante fica armazenado nos pulmões, rins, adrenais e sangue. Pequena quantidade é encontrada nos órgãos e tecidos. Os carotenóides armazenados em tecidos, geralmente permanecem alojados na gordura corporal, evidenciado pela sua coloração amarelo-escuro (McDowell, 1989). Grande quantidade de  $\beta$ -caroteno está nos ovários, principalmente no corpo lúteo, dando a essa estrutura a cor amarelo-brilhante (O'Fallon & Chew, 1984; Haliloglu et al., 2002). Segundo Chew et al. (1984), a concentração de  $\beta$ -caroteno é maior no corpo lúteo ovariano do que em outros tecidos, como fígado e tecido adiposo.

### **2.3.6 Funções do $\beta$ -caroteno**

O  $\beta$ -caroteno, além do papel de precursor de retinol (vitamina A), tem outras funções biológicas, principalmente ligadas à reprodução (Bindas et al., 1984a; Krinsky, 1993).

#### **2.3.6.1 Antioxidante**

Vários autores relatam os efeito antioxidante promovido pelos carotenóides, sendo o  $\beta$ -caroteno o de maior ação. Alguns mostram a capacidade

dos antioxidantes em destruir radicais livres, potentes oxidantes (Krinsky, 1989; Hill et al., 1995; Sies & Stahl, 1995; Everett et al., 1996) e outros relatam sua eficiência em extinguir o oxigênio singlete (DiMascio et al., 1989; Conn et al., 1991; Cantrell et al., 2003).

### **2.3.6.2 Precursor da vitamina A**

Bioconversão é o método pelo qual os carotenóides são convertidos à vitamina A na célula animal. Os carotenóides precursores de vitamina A são convertidos a retinol pela ação da enzima 15-15'-carotenóide dioxigenase. Esse processo ocorre primariamente nos enterócitos, embora a enzima ativada seja encontrada em outros tecidos, como o fígado. Há controvérsias sobre o fato da clivagem ser excêntrica ou central. Na clivagem excêntrica, somente uma molécula de retinal é produzida (Castenmiller & West, 1998). Se ela for central, cada molécula de  $\beta$ -caroteno clivada origina duas moléculas de retinal que podem ser reduzidas a retinol e, então, esterificadas (Mohamed et al., 2001).

Após a bioconversão, os carotenóides passam a ter função indireta mediada pela vitamina A. São várias as funções da vitamina A, dentre elas a da visão (Nelson & Cox, 2000), da resposta imune (Combs Junior, 1992), do crescimento (Ganguly et al., 1980; Ross et al., 2000) e da reprodução (Chew & Archer, 1983; Talavera & Chew, 1988; Chew, 1993; Besenfelder et al., 1996).

Na reprodução, a vitamina A participa da produção de progesterona por meio de estimulação da síntese e ativação da enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol que transforma o colesterol em pregnenolona (Jayaram et al., 1973). Além disso, a vitamina A modula a atividade da enzima  $\theta^5$ - $3\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase que converte pregnenolona em progesterona (Islabão, 1982). Além disso, a vitamina A reduz a incidência de cistos ovarianos em vacas (Schweigert & Zucker, 1988), melhora o desenvolvimento do embrião



e, conseqüentemente, diminui a mortalidade embrionária em suínos (Chew et al., 1982; Brief & Chew, 1985).

### **2.3.6.3 Resposta imune**

Alguns estudos têm demonstrado que os carotenóides podem intensificar a função do sistema imune por meio de sua capacidade de inibir a peroxidação em cadeia e extinção do oxigênio singleto (Bendich, 1991). O  $\beta$ -caroteno eleva a resposta proliferativa de linfócitos T e B, aumenta células T-citotóxicas e estimula secreção de fator de necrose tumoral alfa (Bendich & Shapiro, 1986).

### **2.3.6.4 Reprodução**

Vários pesquisadores têm demonstrado tanto em condições de laboratório (*in vitro*) quanto em animais (*in vivo*) que há uma relação ente o  $\beta$ -caroteno e a fisiologia reprodutiva. O efeito da suplementação com  $\beta$ -caroteno na fertilidade é um tópico muito controverso. Alguns pesquisadores encontraram respostas benéficas com a suplementação com  $\beta$ -caroteno em vacas leiteiras (Bindas et al., 1984a; Ascarrelli et al., 1985; Iwanska & Strusinska, 1997), outros não observaram benefícios (Bindas et al., 1984b; Akordor et al., 1986). Apenas um trabalho observou que a suplementação com  $\beta$ -caroteno teve efeito adverso à fertilidade (Folman et al., 1987). As causas para tal discrepância podem decorrer de variação no número de animais, da quantidade e da duração da suplementação com  $\beta$ -caroteno, do ambiente onde foram realizados os experimentos e do manejo (Arechiga et al., 1998a).

O  $\beta$ -caroteno pode ser necessário para adequada esteroidogênese, possivelmente pela sua ação como antioxidante (Young et al., 1995). Ele pode influenciar a função reprodutiva por aumentar a secreção de progesterona.

Vários trabalhos relatam que o  $\beta$ -caroteno estimula a produção de progesterona, tanto *in vitro* (Talavera & Chew, 1987; Graves-Hoagland et al., 1988; O'Shaughnessy & Wathes, 1988; Arikan & Rodway, 1997) quanto *in vivo* (Weng et al., 2000; Chew et al., 2001).

A ação na esteroidogênese pode ser explicada pelo fato do  $\beta$ -caroteno ser conhecido como agente antioxidante e destruir radicais livres. O processo de esteroidogênese resulta na formação de grande quantidade de radicais livres e a alta concentração de  $\beta$ -caroteno nos ovários e adrenal pode proteger as células de tal dano oxidativo (Arikan & Rodway, 2000). A primeira evidência do efeito antioxidante do  $\beta$ -caroteno na célula luteínica, relatada por Yong et al. (1995), mostrou que a suplementação com  $\beta$ -caroteno na cultura de células luteínicas reduziu a quantidade de ligações entre a enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol e os doadores de elétrons, a andrenodoxina. Esse resultados foram confirmados por Rapoport et al. (1998), quando determinaram as concentrações de  $\beta$ -caroteno e o citocromo esteroidogênico P450 em diferentes estádios de desenvolvimento do corpo lúteo de bovinos, para estimar sua correlação com o perfil esteroidogênico. Para os autores, a correlação foi significativa entre as concentrações de citocromo P450 luteais,  $\beta$ -caroteno e progesterona plasmática.

Há evidências do controle da esteroidogênese por radicais livres, principalmente o radical superóxido. A fosfolipase C do mecanismo de transdução pode estimular a produção de radicais superóxidos que inibem a síntese de progesterona no ovário de ratas (Bilska et al., 1991). Assim, o  $\beta$ -caroteno age dentro da membrana celular dos lipídios, destruindo os radicais livres, impedindo sua ação. Isto pode estar envolvido na habilidade do  $\beta$ -caroteno em manter a síntese de progesterona nas células luteínicas (Arikan & Rodway, 2000). Além disso, o útero secreta um grupo de proteínas que são críticas para o desenvolvimento do embrião e do feto. Em cães, essas proteínas específicas do útero são estimuladas pela progesterona ou requerem

progesterona para sua manutenção (Buhi et al., 1992). Porém, efeito adverso foi observado por Puztai et al. (2000), segundo os quais a extrema hipercarotenemia diminuiu a produção de progesterona nas células da granulosa.

Vitaminas, ácido retinóico, retinal e  $\beta$ -caroteno podem estimular passos da esteroidogênese que são normalmente regulados pelo LH. Estes passos incluem: 1) degradação de proteínas ligantes, 2) indução da síntese da enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (CSCCE), 3) estimulação da atividade da CSCCE, 4) aumento da concentração de cAMP e 5) ativação da proteína quinase C dependente de cAMP (Talavera & Chew, 1988).

Além dessa ação na esteroidogênese, existem vários efeitos benéficos do  $\beta$ -caroteno na reprodução. Durante a gestação, o útero passa por mudanças drásticas para aumentar o sucesso da implantação e sobrevivência do conceito. Durante esse estágio de alta atividade, o útero está, provavelmente, sobre alto grau de estresse oxidativo. Portanto, o transporte de  $\beta$ -caroteno para o endométrio poderia proteger o ambiente uterino contra danos oxidativos, melhorando o local para o desenvolvimento do embrião (Weng et al., 2000). Segundo Chew et al. (2001), o  $\beta$ -caroteno pode proteger o ovário e o ambiente uterino dos danos oxidativos, tornando o ambiente mais favorável para o desenvolvimento do embrião.

Vários estudos relatam o efeito benéfico do  $\beta$ -caroteno na reprodução em diversas espécies. A administração parenteral de  $\beta$ -caroteno em camundongos (Chew & Archer, 1983) e suínos (Brief & Chew, 1985; Kostoglou et al., 2000) diminuiu a mortalidade embrionária e aumentou o tamanho da leitegada ao nascimento. Em vacas de leite, a suplementação com  $\beta$ -caroteno na dieta diminuiu a incidência de retenção de placenta e metrites quando comparadas com vacas não suplementadas ou suplementadas somente com vitamina A (Michal et al., 1994).

Em vacas alimentadas com dietas com baixa concentração de  $\beta$ -caroteno e adequada vitamina A, observaram-se diminuição da taxa de prenhez (Cooke & Combden, 1978), atraso na ovulação, maior incidência de morte embrionária (Wang et al., 1988b) e maior taxa de retenção de placenta (Michal et al., 1990) quando comparada às vacas suplementadas com  $\beta$ -caroteno. A suplementação com  $\beta$ -caroteno diminuiu o número de inseminações por concepção em vacas (Snyder & Stuart, 1981).

Em suínos, injeções de  $\beta$ -caroteno aumentaram a concentração de proteínas uterinas específicas (Chew et al., 1982) e diminuíram a mortalidade embrionária (Brief & Chew, 1985). Essas observações sugerem que o  $\beta$ -caroteno pode ser importante fisiologicamente para suínos. Segundo Murray et al. (1985), glicoproteínas de alto peso molecular foram identificadas no lúmen uterino de gatos domésticos. Esses autores afirmaram que a produção dessas proteínas pode ser estimulada pela ação do  $\beta$ -caroteno. Chew et al. (1982) demonstraram que injeções de  $\beta$ -caroteno em suínos aumentaram a produção de proteínas específicas do útero.

Segundo Peltier et al. (1997), injeções diárias de  $\beta$ -caroteno em éguas durante o pró-estro e estro não afetaram a secreção de estradiol. A administração de  $\beta$ -caroteno também não afetou o tamanho do folículo, evidenciando que este carotenóide não atua sobre as variáveis ligadas à foliculogênese.

#### **2.3.6.5 Outras funções**

Junções do tipo gap fazem ligações entre as células do organismo para formar comunicação sinsicial, permitindo que pequenas moléculas passem de uma célula para outra. O  $\beta$ -caroteno pode estimular a formação de junções do tipo gap entre as células (Zhang et al., 1991; Zhang et al., 1992; Frommel et al., 1994; Bertram & Bortkiewicz, 1995; Stahl et al., 1997). O mecanismo de ação

do  $\beta$ -caroteno parece ser por estimulação da conexina 43, gene compilado para produção de proteínas transmembranas. Seis destas proteínas formam um arranjo hexamérico em volta da porção central hidrofílica. Dois dos arranjos formam a unidade estrutural da junção do tipo gap. O  $\beta$ -caroteno, em concentrações fisiológicas (média de  $10^{-6}$  M), aumenta as junções do tipo gap, permitindo melhor comunicação entre as células (Burri, 1997). A formação dessas junções gap pode ser importante na coordenação da função de células luteínicas (Redmer et al., 1991; Bilaska et al., 1996).

O  $\beta$ -caroteno inibe a ação das lipoxigenases que estão envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico e da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase que atua na biossíntese de colesterol e isoprenóides não esteroidais (Canfield et al., 1992).

## **2.4 Vitamina E (tocoferol)**

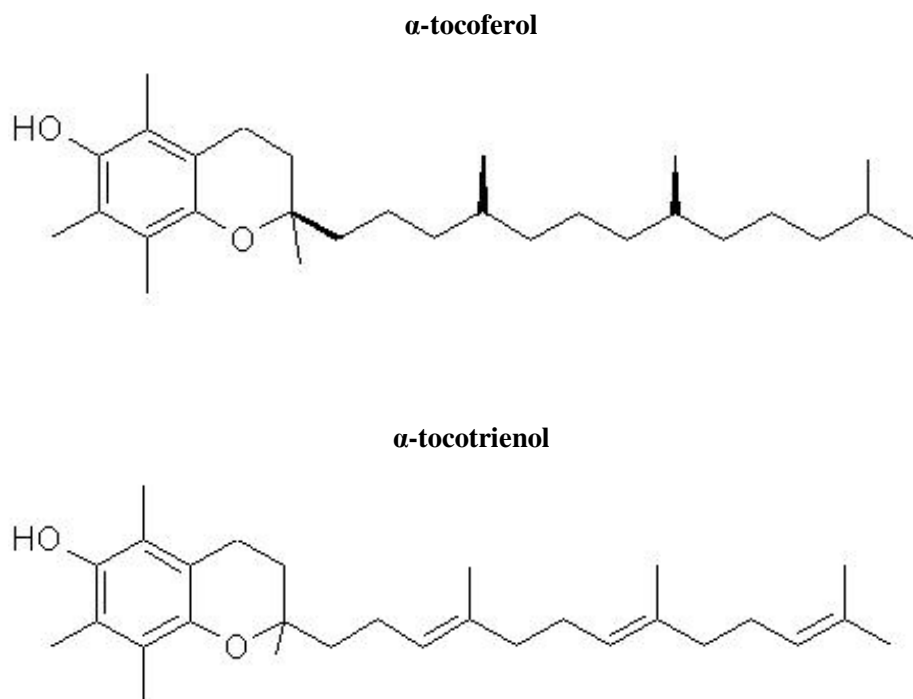
### **2.4.1 Definição**

A vitamina E é um álcool orgânico lipossolúvel isolado inicialmente como  $\alpha$ -tocoferol. Este isômero é o mais biologicamente ativo, representando a maior parte da atividade da vitamina E nos alimentos. A atividade de outros isômeros do  $\alpha$ -tocoferol é limitada (Bregelius & Traber, 1999; Metre & Callan, 2001).

A palavra tocoferol deriva do grego “*tokos*”, que significa parto ou progênie, “*pherein*”, que significa fazer nascer e “*ol*”, que designa álcool. Uma unidade internacional (IU) de vitamina E é definida como a atividade de 1 mg de acetato de  $\alpha$ -tocoferol (Lal Thankur & Srivastava, 1996).

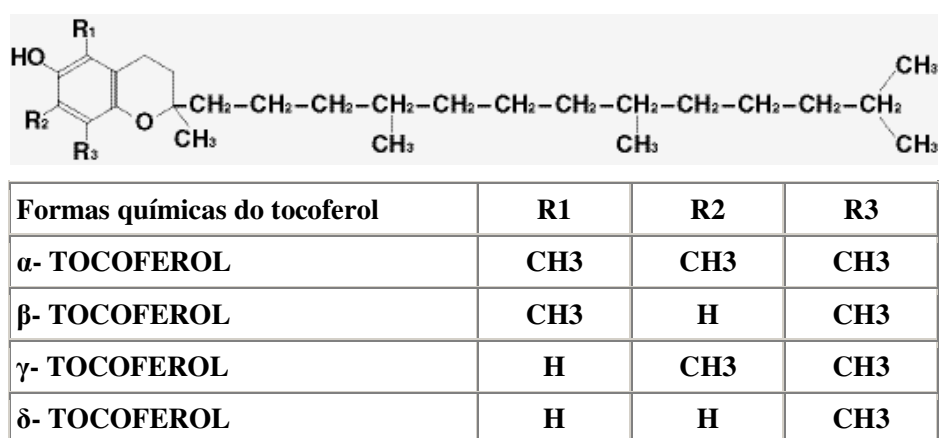
### 2.4.2 Estrutura química e propriedades

A vitamina E está distribuída na natureza como tocoferóis e tocotrienóis. Oito formas químicas de vitamina E são encontradas: quatro tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ ) e quatro tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ ) na natureza (Lal Thakur & Srivastava, 1996). A estrutura química do  $\alpha$ -tocoferol e  $\alpha$ -tocotrienol está representada na Figura 6.



**FIGURA 6** Estrutura química do  $\alpha$ -tocoferol e  $\alpha$ -tocotrienol.

Segundo McDowell (1989), a diferença entre o tocoferol e tocotrienol são as insaturações da cadeia lateral presentes no tocotrienol. Diferenças entre as formas químicas da vitamina E ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) são devido à posição e ao número de grupo metil no anel aromático (Figura 7).



**FIGURA 7** Diferenças estruturais entre as formas de vitamina E, adaptado McDowell (1989).

O  $\alpha$ -tocoferol é um óleo amarelo insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos. Os tocoferóis são extremamente resistentes ao calor, mas prontamente oxidáveis. O  $\alpha$ -tocoferol é um excelente antioxidante natural que protege carotenóides e outros materiais oxidáveis nos alimentos e no corpo (Lal Thakur & Srivastava, 1996).

### 2.4.3 Fontes naturais de vitamina E

Os ruminantes, como outros mamíferos, não sintetizam vitamina E. Por isso, ela precisa ser fornecida ao animal pela dieta. Forragens verdes frescas são as mais confiáveis e abundantes fontes de vitamina E para os ruminantes (Frye et al., 1991; Herdt & Stowe, 1991).

A vitamina E está amplamente distribuída na natureza em óleos vegetais, produtos cereais contendo óleos, ovos, fígado, legumes e, em geral, plantas verdes. Está presente em abundância nos grãos de cereais, particularmente na semente. Existe grande variação da quantidade de vitamina E, que pode variar de 3 a 10 vezes o valor encontrado de  $\alpha$ -tocoferol em um mesmo tipo de alimento. Por exemplo, pode haver diferença sazonal de até 5 vezes na quantidade de  $\alpha$ -tocoferol no leite de vaca (Metre & Callan, 2001).

Os tocoferóis são naturalmente instáveis, por isso, perdas substanciais na atividade da vitamina E ocorrem nos alimentos quando são processados e armazenados. Quando os alimentos são peletizados, a destruição de vitamina E pode ocorrer se a dieta não contiver antioxidantes suficientes para prevenir sua acelerada oxidação em condições de umidade e alta temperatura. Sais de ferro podem destruir completamente a vitamina E e a desidratação artificial ou o processamento de forrageiras e grãos diminuem a disponibilidade de tocoferol (McDowell, 1989). A quantidade de vitamina E nas plantas diminuiu marcadamente com a aproximação da maturidade e a fenação resultou em rápida diminuição da atividade da vitamina E. Feno e silagem são geralmente pobres em vitamina E, por causa do processo de oxidação (Metre & Callan, 2001).

Jukola et al. (1996) observaram que a concentração de vitamina E no soro de novilhas e touros em crescimento é mantida quando a silagem de gramínea de alta qualidade é fornecida. Excessiva suplementação com vitamina A pode acelerar a degradação da vitamina E (Frye et al., 1991).



#### **2.4.4 Absorção e transporte da vitamina E**

A absorção intestinal de lipídios e vitaminas lipossolúveis, como a vitamina E, é dependente da função pancreática, secreção biliar, formação da micela e penetração através da membrana intestinal (Ullrey, 1981). Defeitos em qualquer dessas etapas resultam em danos na absorção (Torres, 1970; Sokol et al., 1983, 1989).

A maioria da vitamina E é absorvida no intestino como álcool livre e pequena quantidade como éster. Os ésteres são largamente hidrolisados na parede intestinal e os álcoois penetram na parede do intestino e são transportados via vasos linfáticos até a circulação geral (McDowell, 1989).

Após a absorção no intestino delgado, a vitamina E é transportada até o fígado onde é armazenada. Nos hepatócitos ela se liga a lipoproteínas de baixa densidade, que a transportam através da corrente sanguínea até os tecidos (Frye et al., 1991).

Segundo Bjorneboe et al. (1986), as lipoproteínas são os veículos de transporte de lipídios no plasma. Esses carreadores são, principalmente, sintetizados no intestino (quilomicrons e HDL) e no fígado (VLDL e HDL) ou são formados no plasma (LDL e HDL). O  $\alpha$ -tocoferol é transportado no sangue associado às lipoproteínas.

#### **2.4.5 Armazenamento e excreção da vitamina E**

A vitamina E é armazenada em todos os tecidos corporais, sendo a maior parte no fígado. No entanto, a quantidade presente no fígado é uma pequena fração do total armazenado no corpo, em contraste com a vitamina A, cujas reservas corporais, 95%, estão no fígado (McDowell, 1989). O baixo estoque de vitamina E no fígado pode ser explicado por sua baixa toxicidade

(Kappus & Diplock, 1992). A concentração de  $\alpha$ -tocoferol na membrana é, aproximadamente, de uma molécula de  $\alpha$ -tocoferol para 1000 moléculas de lipídios de membrana (Kagan et al., 1990).

A vitamina E é excretada na forma livre na bile. A biotransformação do  $\alpha$ -tocoferol nos hepatócitos origina a  $\alpha$ -tocoferil quinona. Este produto é degradado nos rins a ácido  $\alpha$ -tocoferônico, seguido por conjugação e eliminação na urina (Lal Thakur & Srivastava, 1996; Metre & Callan, 2001).

#### **2.4.6 Funções da vitamina E**

A principal função da vitamina E em mamíferos é a função antioxidante, pela ação no controle celular da peroxidação de lipídios, demonstrados pelos efeitos na resposta inflamatória, sistema imune e reprodução (Metre & Callan, 2001).

##### **2.4.6.1 Coagulação sanguínea**

A vitamina E inibe a agregação plaquetária protegendo o ácido araquidônico da peroxidação. Esse ácido é necessário para a formação de prostaglandinas envolvidas na agregação plaquetária (Panganamala & Cornwell, 1982).

##### **2.4.6.2 Resistência a doenças**

Considerável atenção está direcionada no papel da vitamina E na proteção de leucócitos e macrófagos durante a fagocitose. A vitamina E pode ajudar estas células a sobreviverem a produtos tóxicos que são produzidos pelo animal para destruir as bactérias da ingesta. Camundongos alimentados com

dieta deficiente em vitamina E foram incapazes de produzir resposta humoral satisfatória e esta diminuição da reação imune contribuiu para aumentar a susceptibilidade à infecção bacteriana (McDowell, 1989). Bezerros que receberam 125 UI de vitamina E diariamente foram capazes de maximizar suas respostas imunes, comparados com bezerros não suplementados (Reddy et al., 1987).

#### **2.4.6.3 Ação antioxidante**

A vitamina E é o componente vital para a defesa celular contra compostos que causam oxidação das moléculas celulares em mamíferos, agindo como antioxidante (Bendich, 1993; Hogan et al., 1993; Miller et al., 1993; Bregelius & Traber, 1999). A vitamina E pode prevenir a oxidação de várias formas: a) destruindo os agentes oxidantes, b) diminuindo a conversão de agentes oxidantes menos reativos a mais reativos, c) facilitando o reparo de danos causados pelos agentes oxidantes, d) providenciando um ambiente favorável para a atividade de outros antioxidantes (Miller et al., 1993; Zhang & Omaye, 2001).

#### **2.4.6.4 Ações na reprodução**

Desde a década de 1920 já se têm relatos sobre a relação entre a vitamina E e a reprodução. A aplicação de vitamina E preveniu a reabsorção embrionária e a morte fetal em ratos (Evans & Bishop, 1922).

Segundo Das & Chowdhury (1999), dietas com deficiência de vitamina E afetam a fisiologia uterina de ratas em crescimento, levando à significativa diminuição do peso uterino. Esse fato pode estar relacionado à interrupção da comunicação entre o hipotálamo-hipófise-gônadas. Martin & Moore, citados por

Das & Chowdhury (1999), demonstraram que, depois de prolongado período de deficiência de vitamina E, o ciclo estral de ratas tornou-se anormal e impossibilitou que elas ficassem prenhas. Estes efeitos deletérios na reprodução podem ser explicados pela diminuição da concentração de estrógenos em animais com deficiência de vitamina E (Das & Chowdhury, 1999), visto que a vitamina E está concentrada em tecidos produtores de hormônios esteróides, agindo na proteção da atividade esteroidogênica do citocromo P-450 contra a peroxidação de lipídios (Takayanagi et al., 1986; Staats et al., 1988).

Segundo Wang et al. (2002) e Olson & Seidel (2000), a suplementação com vitamina E melhorou o desenvolvimento embrionário “in vitro” após aplicação de vitamina E no meio de cultura. O mesmo pode ser observado “in vivo”, pelo fato de existir grande quantidade de vitamina E nos ovários e fluido folicular (Attaran et al., 2000). Segundo Tao et al. (2004), a suplementação de meio de cultura com vitamina E melhorou a maturação dos ovócitos e o desenvolvimento dos embriões provenientes dessas culturas.

A administração de vitamina E pode aumentar a função neutrofílica (Eicheir et al., 1994; Politis et al., 1995). Talvez o aumento da atividade neutrofílica promova a remoção de microorganismos e auxilie os tecidos uterinos na remodelação e involução. Por isso, muitos autores relatam efeitos benéficos da aplicação de vitamina E na prevenção de doenças do pós-parto. A aplicação de vitamina E acelera a involução uterina em vacas com metrite (Harrison et al., 1984; Erskine et al., 1997) e no pré-parto, diminui a incidência de retenção de membranas fetais, melhorando a reprodução de vacas leiteiras (Trinder et al., 1969; Segerson et al., 1981; Eger et al., 1985; Mueller et al., 1988; Olson, 1996; Erskine et al., 1997; LeBlanc et al., 2002, 2004). A vitamina E melhorou a taxa de fertilização em vacas (Segerson Júnior et al., 1977) e em ovelhas (Segerson & Ganapathy, 1981).

Outra explicação para os efeitos benéficos da vitamina E na reprodução seria a manutenção da fluidez das membranas pela sua ação antioxidante. A maioria das funções de proteção do sistema imune depende da fluidez das membranas celulares que é mantida principalmente pela camada de lipídios. A peroxidação de lipídios diminui a fluidez da membrana, afetando a ação do sistema imune. A perda da fluidez da membrana está relacionada diretamente com a diminuição da habilidade dos linfócitos em responder aos desafios impostos ao sistema imune (Bendich, 1993).

Vários trabalhos relatam os efeitos benéficos promovidos pela associação  $\beta$ -caroteno e tocoferol na performance reprodutiva de várias espécies animais. Mas, os efeitos dos antioxidantes ainda não foram relacionados com a qualidade de embriões bovinos em programas de transferência, quando produzidos *in vivo*. Além do efeito indireto mediado pela vitamina A, muitos trabalhos demonstraram o efeito direto do  $\beta$ -caroteno na reprodução, relacionado a diferentes mecanismos de atuação. Devido ao efeito direto, a utilização do  $\beta$ -caroteno torna-se mais interessante do que a vitamina A. Por essas razões, justifica-se realizar um experimento para avaliar o efeito destas vitaminas na qualidade embrionária.

A hipótese levantada é de que a suplementação parenteral de  $\beta$ -caroteno associado ao tocoferol melhora a qualidade embrionária e aumenta a produção de embriões de doadoras superovuladas da raça holandesa.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Localização e período experimental**

O experimento foi realizado na Fazenda Vista Alegre III, no município de Curvelo que localiza-se no centro-norte de Minas Gerais. Também foram coletados embriões em outras fazendas na região sul de Minas Gerais. O experimento foi conduzido de outubro de 2003 a setembro de 2004.

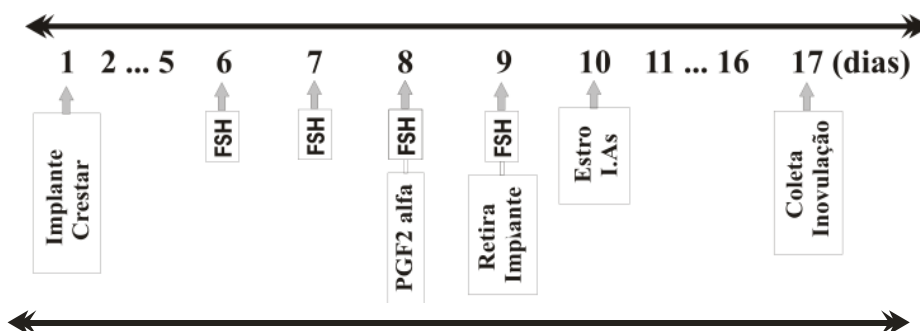
### **3.2 Animais**

Foram utilizados 177 doadoras da raça holandesa, sendo 90 vacas e 87 novilhas com idade média de 38 meses, variando de 24 a 144. Para entrarem no experimento, as doadoras não apresentavam anormalidades ginecológicas detectadas por palpação retal e estavam, no mínimo, com 60 dias de parição e com condição corporal acima 3 (na escala de 1 a 5). Para a análise dos dados foram consideradas somente as doadoras que responderam à superovulação, ou seja, as que obtiveram mais que duas estruturas após a lavagem uterina.

### **3.3 Sincronização, superovulação e inseminação artificial**

No dia 1, após a avaliação ovariana por palpação retal nas doadoras que estavam ciclando, fez-se o implante auricular subcutâneo de 3 mg de norgestomet (CRESTAR<sup>®</sup>, Intervert International B.V., Boxmeer, Holanda), associado à aplicação IM de 6 mg de norgestomet e 10 mg de valerato de estradiol. No dia 6, ocorreu o início da superovulação das doadoras. No protocolo superovulatório aplicaram-se 500 UI (vacas) e 400 UI (novilhas) de

hormônio foliculo estimulante (FSH), originário de extrato pituitário suíno (PLUSET<sup>®</sup>; I.F. Serono, Roma, Itália), distribuído em dosagens decrescentes de 100, 100, 75, 75, 50, 50, 25, 25 UI (vacas) e 80, 80, 60, 60, 40, 40, 20, 20 UI (novilhas) durante quatro dias, em duas aplicações diárias, intervaladas de 12 horas. A luteólise foi induzida com aplicação IM de 500 µg de DL cloprostenol (SINCROSIN<sup>®</sup>, Vallee S.A., Montes Claros, Brasil) 60 horas após a aplicação da primeira dose de FSH. Na sétima aplicação de FSH, retirou-se o implante auricular subcutâneo e no dia 10, realizou-se a observação de cio das doadoras. Os animais que apresentavam sinais de cio foram inseminados 12 e 24 horas após a detecção por técnico experiente (Figura 8). No 17<sup>o</sup> dia, realizou-se a coleta de embriões.

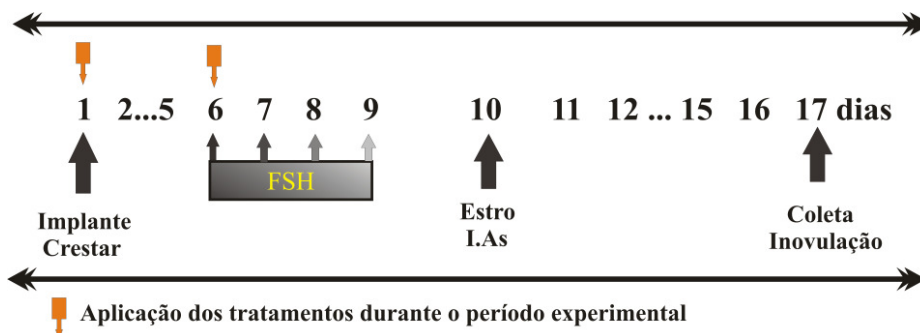


**FIGURA 8** Esquema de sincronização, superovulação e inseminação artificial das doadoras do experimento.

### 3.4 Tratamentos

As doadoras (n=177) receberam os tratamentos (suplementados ou não com  $\beta$ -caroteno e tocoferol) aleatoriamente, pela ordem de entrada no tronco para avaliação reprodutiva, mantendo-se o número equilíbrio por tipo (novilhas e vacas) e produção de leite (vacas). A suplementação por injeção intramuscular ocorreu no momento do implante subcutâneo de norgestomet e no primeiro dia da superovulação (Figura 9):

- ★ Controle = injeção IM de veículo (n=59, 29 vacas e 30 novilhas);
- ★ T800 = 800 mg de  $\beta$ -caroteno e 500 mg tocoferol aplicados por injeção IM (n=59, 28 vacas e 31 novilhas);
- ★ T1200 = 1200 mg de  $\beta$ -caroteno e 750 mg de tocoferol aplicados por injeção IM (n=59, 29 vacas e 30 novilhas).



**FIGURA 9** Esquema de aplicação dos tratamentos durante o período experimental.



A utilização dessas doses teve como base o trabalho realizado por Arechiga et al. (1998b), com a aplicação de 800 mg de  $\beta$ -caroteno ou 500 mg de tocoferol; injeções nessas doses melhoraram a fertilidade de vacas. As aplicações foram realizadas no início do experimento pelo fato do  $\beta$ -caroteno e tocoferol poderem atuar no desenvolvimento dos ovócitos durante o crescimento folicular (Haliloglu et al., 2002). Além disso, observaram que as concentrações séricas de  $\beta$ -caroteno e tocoferol permaneceram elevadas por, no mínimo, 19 dias após a primeira aplicação IM (Arechiga et al., 1998b). Esse fato permite que o  $\beta$ -caroteno e tocoferol atuem no desenvolvimento inicial do embrião (Weng et al., 2000).

Outros autores (Shaw et al., 1995; Amaral, 2003) obtiveram melhora na qualidade embrionária e no número de embriões viáveis quando injetaram vitamina A, em dose única, no início do protocolo superovulatório. Utilizou-se  $\beta$ -caroteno associado ao tocoferol em razão do  $\alpha$ -tocoferol ser excelente antioxidante natural que protege carotenóides no corpo do animal (Weiss et al., 1994; Lal Thakur & Srivastava, 1996).

### **3.5 Transferência de embriões**

#### **3.5.1 Coleta**

As coletas de embriões foram realizadas sete dias após a primeira inseminação, por procedimento não cirúrgico, em sistema fechado (Wright, 1981). O primeiro passo para a realização da coleta não cirúrgica é a palpação dos ovários por via retal para a avaliação da resposta superovulatória, mediante contagem dos corpos lúteos. As doadoras que apresentavam resposta ao FSH, ou seja, mais que dois corpos lúteos, recebiam anestesia epidural, 5 ml de lidocaína (Anestésico L<sup>®</sup>, Eurofarma Laboratórios Ltda, São Paulo, Brasil). A coleta foi realizada pelo método transcervical com o auxílio de sonda (Sonda Foley

Siliconizada Rusch Gold<sup>®</sup>, Rusch, Kamunting, Malásia) contendo balão inflável na sua extremidade distal. Após a limpeza da genitália externa da doadora, esta sonda, com mandril de metal em seu lúmen, foi introduzida até o corpo do útero para a realização da lavagem dos cornos uterinos. Posteriormente, o balão foi inflado com 3 a 7 ml de Dulbecco Modificado Phosphate Buffered Saline (DMPBS-FLUSH, Nutricell, Campinas, Brasil) e, em seguida, retirou-se o mandril do interior da sonda, acoplando-a ao equipo em forma de Y. Esse equipo apresenta duas extremidades, uma para permitir a entrada do meio de cultura no útero da doadora e outra para a sua saída. Na extremidade de entrada encontra-se o meio de coleta (DMPBS) e, na de saída, um filtro coletor de 100 µm (figura 12). Para a coleta, foram utilizados cerca de 1000 ml de DMPBS em temperatura variando de 20°C a 30°C. Ao final da coleta, o filtro foi desacoplado do tubo e levado ao laboratório.

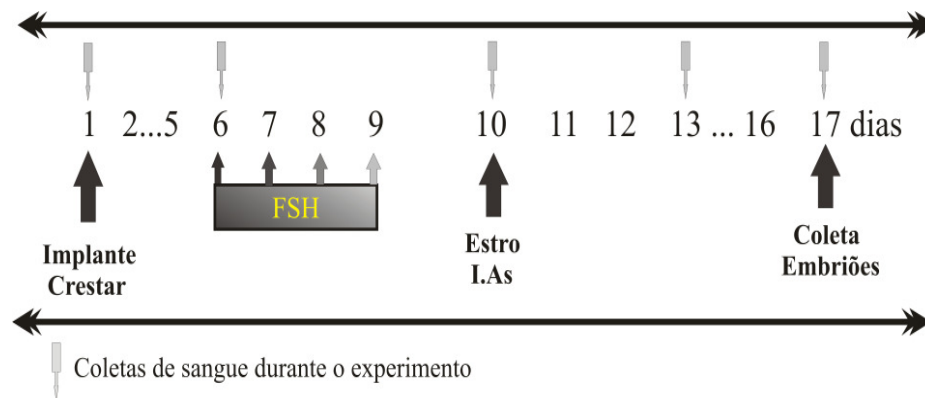
### **3.5.2 Rastreamento dos embriões no laboratório**

No laboratório, o meio contido no filtro foi recolhido em placas de petri com diâmetro de 100 mm. A busca dos embriões foi feita por estereomicroscópio (Bausch & Lomb Sterozoom 4 microscope<sup>®</sup>, Bausch & Lomb, New York, USA) e os encontrados foram transferidos para placas de petri com diâmetro de 35 mm contendo DMPBS acrescido de BSA 0,4% (Bovine Serum Albumin, 200mg/50ml de PBS) com o auxílio de uma micropipeta de vidro (tubo capilar microematócrito). A avaliação dos embriões foi realizada segundo método proposto por Lindner & Wright (1983), mediante consenso de dois avaliadores. Um índice de qualidade embrionária (IQE) foi proposto com base nessa classificação [IQE = (excelentes\*1 + bons\*2 + regulares\*3 + pobres\*4 + (degenerados + não fertilizados)\*5) / total de embriões colhidos]. Valores mais próximos de 1 indicam melhor qualidade. Outra variável, com base

nessa classificação, foi a proporção de embriões viáveis (VIAVP), caracterizada pela soma das estruturas viáveis (excelente + bons + regulares + pobres), dividida pelo total de estruturas recuperadas.

### 3.6 Coleta de sangue e análise de progesterona

Amostras de sangue foram coletadas, de 43 novilhas, por venopunção de vasos coccígeos para determinar a concentração plasmática de progesterona. Segundo Adams et al. (1981) e Thomas et al. (1992), a progesterona aumenta a produção de proteínas útero-específicas que são importantes para a nutrição dos embriões no período de pré-implantação. Foram realizadas cinco coletas de sangue, nos dias 1, 6, 10, 13 e 17, conforme esquema na Figura 10.



**FIGURA 10** Esquema da coleta de sangue de novilhas.

As coletas de sangue nos dias 1 e 6 foram realizadas para dosar a concentração de progesterona antes da aplicação dos tratamentos. Realizou-se a coleta de sangue no dia 10 para comprovar-se que os animais estavam em estro, menos de 1 ng/ml de progesterona (Moffat et al., 1993); as coletas 13 e 17 foram realizadas para avaliar o efeito do  $\beta$ -caroteno e vitamina E na produção de progesterona após a superovulação. Após a coleta, o sangue foi levado ao laboratório, centrifugado (2000 xg) durante 10 minutos para separação do soro e armazenado em freezer a -21°C.

A concentração de progesterona no plasma foi analisada em duplicatas por radioimunoensaio utilizando o Coat-A-Count Progesterone<sup>®</sup> (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA). Os coeficientes de variação intraensaio alto e baixo foram de 2,60% e 1,96%, respectivamente. O Coat-A-Count Progesterone é um radioimunoensaio de fase sólida, no qual a progesterona marcada com o <sup>125</sup>I compete pelos sítios de ligação dos anticorpos por período fixo de tempo com a progesterona da amostra a ser analisada. Pelo fato dos anticorpos estarem imobilizados na parede do tubo de polipropileno, uma simples decantação do sobrenadante é suficiente para terminar a competição e isolar a fração de progesterona radiomarcada ligada ao anticorpo. A leitura da progesterona marcada é realizada em um contador gama que gera um número, o qual é convertido, pela curva de calibração, em medida de progesterona presente na amostra.

### **3.7 Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, mantendo-se o número de animais em equilíbrio por tipo (novilha e vacas). Os animais foram sorteados segundo a ordem de entrada no tronco para avaliação reprodutiva. As variáveis propostas foram IQE, VIAVP, total de estruturas recuperadas e

embriões viáveis e taxa de fecundação analisadas pelo procedimento GENMOD do Statistical Analysis System-SAS<sup>®</sup> (SAS, 1995). As médias do quadrado mínimo foram calculadas pelo procedimento GLM do SAS<sup>®</sup> (SAS, 1995). O seguinte modelo foi utilizado para as variáveis citadas anteriormente:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + T_j + P*T_{ij} + e_{ij}$$

$\mu$  = constante associada a todas as observações;

$P_i$  = efeito de tipo  $i$  ( $i$  = novilha e vaca);

$T_j$  = efeito do tratamento  $j$  ( $j$  = controle, T800 e T1200);

$P*T_{ij}$  = interação entre tipo e tratamento;

$e_{ij}$  = erro experimental associado a  $Y_{ij}$  que, por hipótese, tem distribuição de Poisson, em que a média é igual a variância.

A variável concentração de progesterona foi analisada como medida repetida pelo procedimento MIXED do SAS<sup>®</sup> (SAS, 1995). A estrutura de covariância utilizada foi aquela com maior valor para o critério de informação de Akaike, considerando a estrutura simetria composta (CS). As médias do

quadrado mínimo foram calculadas pelo procedimento GLM do SAS® (SAS, 1995). O modelo abaixo foi utilizado para a variável concentração de progesterona:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + T_j + C*T_{ij} + e_{ij}$$

$\mu$  = constante associada a todas as observações;

$C_i$  = efeito dia da coleta de sangue  $i$  ( $i = 1, 2, 3, 4$  e  $5$ );

$T_j$  = efeito do tratamento  $j$  ( $j =$  controle, T800 e T1200);

$C*T_{ij}$  = interação entre dia da coleta de sangue e tratamento;

$e_{ij}$  = erro experimental associado a  $Y_{ij}$  que, por hipótese, é independente e identicamente distribuído em normal, com média zero e variância  $\sigma^2$ .

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento, foram utilizadas 177 doadoras. Desses animais, somente 132 responderam ao tratamento superovulatório, sendo 65 vacas e 67 novilhas. Retirou-se do experimento por não responderem ao protocolo superovulatório (n=34), 5 novilhas e 6 vacas do controle, 6 novilhas e 8 vacas do T800 e 4 novilhas e 5 vacas do T1200. As outras doadoras (n=11) saíram do experimento em razão de algumas não estarem aptas a serem inseminadas (muco com presença de infecção) ou por problemas ocorridos durante o período experimental, como a perda do implante auricular de progestágeno, o que resultou em diferença no número de animais entre os tratamentos.

Não houve efeito da suplementação de  $\beta$ -caroteno associado ao tocoferol na qualidade embrionária, mas houve efeito de tipo e da interação tipo de animal vs tratamento (Tabela 2). Os embriões coletados de novilhas apresentaram melhor qualidade. A qualidade embrionária melhorou em vacas que receberam a maior dose de  $\beta$ -caroteno e tocoferol (T1200), mas não em novilhas. A proporção de embriões viáveis (VIAVP) também não apresentou efeito de tratamento, mas houve efeito de tipo e da interação tratamento vs tipo (Tabela 2). As novilhas tiveram maior proporção de embriões viáveis que as vacas. As doadoras (vacas) que receberam a maior dose de  $\beta$ -caroteno e tocoferol (T1200) tiveram maior proporção de embriões viáveis que as doadoras (vacas) suplementadas com menor dose (T800) e do controle. Em novilhas também não se observou efeito dos antioxidantes para a variável VIAVP. A diferença na resposta observada entre vacas e novilhas pode ser explicada pelo fato da atividade das células do sistema antioxidante diminuir durante o envelhecimento do animal, levando ao aumento gradual dos danos oxidativos nas células (Rani e Panneerselvam, 2001).

**TABELA 2** -  $\beta$ -caroteno e tocoferol na produção e qualidade de embriões de novilhas e vacas superovuladas da raça holandesa. Dados de doadoras suplementadas com controle (veículo das vitaminas, n=46), T800 (800 mg  $\beta$ -caroteno associado a 500 mg tocoferol, n=40) e T1200 (1200 mg  $\beta$ -caroteno associado a 750 mg tocoferol, n=46). Os números são médias do quadrado mínimo, calculados pelo procedimento GLM do sistema SAS<sup>®</sup> - Statistical Analysis System.

	Novilhas			Vacas			EPM	Tipo	Tipo vs.	
	controle	T800	T1200	controle	T800	T1200			Trat.	Trat.
									<i>P</i>	
IQE	2,63	2,52	2,91	3,59	3,63	2,69	1,21	0,02	0,54	0,01
VIAVP (%)	70,00	74,00	61,00	45,00	45,00	70,00	33,95	0,05	0,64	0,03
Total estruturas	10,17	8,30	7,27	7,45	11,33	10,25	6,47	0,26	0,48	0,07
Total embriões viáveis	7,52	5,60	3,94	3,50	5,41	7,50	4,78	0,78	0,99	0,01
Taxa fecundação (%)	89,86	88,38	78,06	77,70	72,09	80,19	26,73	0,12	0,76	0,37

IQE - Índice de qualidade embrionária. VIAVP - Proporção de embriões viáveis. Tipo - Vaca ou novilha. Trat. - controle, T800. T1200. EPM - Erro Padrão da Média



Vários resultados anteriores, apesar de utilizar-se a vitamina A e não o  $\beta$ -caroteno, mostraram resultados semelhantes, Elmarini et al. (1999) obtiveram melhora na qualidade embrionária em ratas suplementadas com vitamina A. Silveira et al. (1999) observaram incremento na frequência de embriões mais desenvolvidos quando marrãs foram suplementadas com vitamina A. Segundo Shaw et al. (1995), a aplicação de vitamina A melhorou a qualidade embrionária em vacas superovuladas, consistente com resultados encontrados em suínos (Britt et al., 1992; Coffey & Britt, 1993), ratas (Chew & Archer, 1983) e coelhas (Besenfelder et al., 1996). A vitamina E tem efeito benéfico no desenvolvimento embrionário, conforme relataram Olson & Seidel Júnior (1995, 2000).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o efeito do  $\beta$ -caroteno, da vitamina A e do tocoferol no início da embriogênese, incluindo os efeitos na esteroidogênese (Graves-Hoagland et al., 1988), no crescimento e maturação folicular (Schweigert & Zucker, 1988), no embrião (Harney et al., 1990) e na atividade secretora do útero (Chew et al., 1982).

Este efeito benéfico pode ser explicado pelo fato de a vitamina A estimular a ação da enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (Ganguly et al., 1980). Esta enzima transforma o colesterol em pregnenolona que, sob ação da  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase, é transformada em progesterona. Além da vitamina A, segundo Weng et al. (2000), o  $\beta$ -caroteno eleva a concentração de progesterona. A progesterona (Adams et al. 1981; Thomas et al., 1992) e o  $\beta$ -caroteno (Schweigert et al., 2002) podem aumentar a produção da proteína de ligação do retinol (RBP) que, provavelmente, age no mecanismo de nutrição dos embriões. Este estímulo pode ser explicado pelo fato do mRNA para a proteína de ligação do retinol estar presente no concepto e no endométrio de suínos, ovinos e bovinos durante o período de pré-implantação da prenhez e sua expressão ser modulada pela progesterona (Harney et al., 1993; McDowell et al., 1995).

Várias proteínas secretadas pelo útero são importantes para a sobrevivência dos embriões. Durante o período pré-implantação, o conceito depende de proteínas secretadas pelo útero para nutrição e proteção imunológica (Roberts & Bazer, 1988; Bazer et al., 1991). O  $\beta$ -caroteno age na formação da composição do fluído uterino, aumentando a secreção de fatores intra-uterinos de importância para o desenvolvimento inicial do embrião, como o retinol, que é secretado no lúmen uterino por um carreador específico, a proteína carreadora de retinol (Clawintter et al., 1990; Harney et al., 1990).

Outro fator que poderia estar promovendo melhora na qualidade embrionária em vacas seria o efeito antioxidante dessas duas vitaminas. O  $\beta$ -caroteno e o tocoferol são bem conhecidos por agirem como agentes antioxidantes, destruindo radicais livres, em razão de sua estrutura molecular. Durante o processo de esteroidogênese, ocorre a formação de radicais livres. Segundo Scherek & Baeuerle (1991), há evidências do seu envolvimento no controle da produção de esteróides. Em ovários de ratas foi demonstrado que esses agentes oxidantes inibem a síntese de progesterona (Gatzuli et al., 1991). Assim, o  $\beta$ -caroteno, associado ao tocoferol, age nas membranas lipídicas destruindo os radicais livres. Essa ação pode estar envolvida na habilidade deles de manterem adequada síntese de progesterona.

A ação antioxidante do  $\beta$ -caroteno e da vitamina E pode auxiliar na manutenção da qualidade dos embriões ou óvulos no ambiente tubo-uterino e durante o desenvolvimento dos óvulos no folículo (Wang et al., 2002), visto que existe quantidade significativa de vitamina E e  $\beta$ -caroteno nos ovários (Haliloglu et al., 2002) e no fluído folicular (Attaran et al., 2000).

Segundo Arechiga et al. (1994), a vitamina E, *in vitro*, protege os embriões jovens do efeito do choque térmico, um evento citotóxico que, provavelmente, é mediado por radicais livres (Loven, 1988). Este efeito benéfico explica-se pela ação antioxidante da vitamina E, que protege o espermatozóide e

o óvulo do ataque de agentes oxidantes que provocariam danos ao desenvolvimento do embrião.

Outra ação promovida pelo  $\beta$ -caroteno, que poderia melhorar a qualidade do embrião, seria a formação de junções do tipo gap. O  $\beta$ -caroteno pode estimular sua formação entre as células (Zhang et al., 1991; Zhang et al., 1992; Frommel et al., 1994; Bertram & Bortkiewicz, 1995; Stahl et al., 1997). A formação dessas junções gap pode ser importante na coordenação da função de células luteínicas (Redmer et al., 1991; Bilka et al. 1996). Além disso, essas comunicações podem melhorar a distribuição dos nutrientes captados pelo embrião no útero, por meio da passagem entre os blastômeros. Esta ação pode diminuir o número de blastômeros extrusos que estão diretamente relacionados à qualidade do embrião.

O interesse de melhorar a qualidade embrionária mediante a aplicação de  $\beta$ -caroteno e tocoferol é justificado pelo fato da qualidade embrionária estar diretamente correlacionada com a taxa de gestação em programas de transferência de embriões. Embriões de melhor qualidade apresentam incremento na taxa de gestação (Lindner & Wright, 1983; Hasler et al., 1987).

O total de estruturas recuperadas das doadoras que receberam  $\beta$ -caroteno e tocoferol não foi diferente do total das que receberam o tratamento controle e não foi diferente entre vacas e novilhas (Tabela 2). Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Amaral (2003) e Shaw et al. (1995), quando aplicaram vitamina A em vacas. Os resultados sugerem que o  $\beta$ -caroteno e a vitamina E não atuam no número de óvulos recrutados na onda ovulatória e nem na resposta superovulatória.

Não houve diferença significativa no total de embriões viáveis entre os tratamentos e tipo de animal. No entanto, houve efeito de interação tratamento\*tipo, isto é, a suplementação com  $\beta$ -caroteno e tocoferol aumentou o número de embriões viáveis em vacas, mas diminuiu em novilhas (Tabela 2).

Amaral (2003) também encontrou aumento no número de embriões viáveis quando doadoras (vacas) receberam injeção de vitamina A no início do protocolo superovulatório. Os resultados obtidos em vacas podem ser justificados pelos efeitos benéficos promovidos pelas vitaminas na esteroidogênese, na formação de junções do tipo gap e como antioxidante. Em novilhas, explica-se pelo possível efeito embriotóxico provocado pelas altas doses das vitaminas, visto que as novilhas que receberam menor dose tiveram maior número de embriões viáveis. Este efeito tóxico para os embriões foi observado *in vitro* por Wang et al. (2002), quando altas doses de tocoferol promoveram a morte e a redução do desenvolvimento de embriões de camundongo.

A taxa de fecundação das doadoras que receberam  $\beta$ -caroteno e tocoferol não foi significativamente diferente daquelas que receberam o tratamento controle e não houve efeito de tipo de animal para essa variável (Tabela 2). A taxa de fecundação média foi de 81,3%, semelhante à encontrada por Dalton et al. (2000) e inferior à observada por Sartori et al. (2004), que obtiveram taxa de fecundação de 90,9%.

A concentração plasmática média de progesterona não diferiu entre os tratamentos ( $P=0,70$ ). Resultados semelhantes foram encontrado por Wang et al. (1982) em novilhas da raça holandesa suplementadas diariamente com 300 mg de  $\beta$ -caroteno por 6 a 8 semanas e por Peltier et al. (1997), em éguas suplementadas com 400 mg  $\beta$ -caroteno por injeção intramuscular em dose única. O  $\beta$ -caroteno também não alterou a concentração de progesterona em vacas de leite (Wang et al., 1988a; Wang et al., 1988b) e em suínos (Chew et al., 1982; Coffey & Britt, 1993). Esse resultado difere do encontrado em outros trabalhos, em que o  $\beta$ -caroteno teve efeito positivo na produção de progesterona *in vivo* (Weng et al., 2000; Chew et al., 2001) e *in vitro* (Graves-Hoagland et al., 1988; O'Shaughnessy & Wathes, 1988; Talavera & Chew, 1988; Arikian & Rodway,

2000). O resultado pode ser explicado pelo fato da concentração basal de  $\beta$ -caroteno nas novilhas estar elevado tanto em animais tratados quanto em não tratados (controle).

Houve diferença significativa da concentração média de progesterona entre os dias de coleta, tendo a menor média sido obtida na amostra de sangue retirada no dia 10, abaixo de 1 ng/ml de progesterona, e a maior média na amostra de sangue retirada no dia 17 (18,10 ng/ml). A concentração média de progesterona das coletas 1 e 6, foram respectivamente, 4,03 e 1,50 ng/ml. Estes resultados condizem com o previsto antes da execução do experimento, visto que os animais estariam com o progestágeno (norgestomet) até a amostra de sangue retirada no dia 6, o que manteria a concentração de progesterona acima de 1 ng/ml (Moffat et al., 1993). A amostra de sangue retirada no dia 10, no momento em que os animais estavam em estro, fase caracterizada por apresentar concentração de progesterona menor que 1 ng/ml (Christensen et al., 1974; Adeyemo & Health, 1980; Díaz et al., 1986). A média da concentração desse dia de coleta foi 0,13 ng/ml. A maior concentração de progesterona nas amostras de sangue retiradas no dia 13 (7,89 ng/ml) e 17 (18,10 ng/ml) pode ser explicada em função do maior número de corpos lúteos produzidos pela superovulação. O aumento da produção de progesterona também foi observado por Benyei et al. (2004).

## 5 CONCLUSÕES

A aplicação dos antioxidantes  $\beta$ -caroteno e tocoferol foi uma alternativa para melhorar a qualidade de embriões de vacas superovuladas, não sendo indicados para novilhas.

Além disso, o  $\beta$ -caroteno e a vitamina E não atuam na taxa de fecundação (novilhas e vacas) e na produção de progesterona (novilhas).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenology**, Woburn, v.57, n.4, p.1273-1283, Mar. 2002.
- ADAMS, G. P.; Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, Woburn, v.41, n.1, p.19-24, Jan. 1994.
- ADAMS, K. L.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. Progesterone-induced secretion of a retinol-binding protein in the pig uterus. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.62, n.1, p.39-47, May 1981.
- ADEYEMO, O.; HEALTH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, Woburn, v.14, n.6, p.411-420, Dec. 1980.
- AKORDOR, F. Y.; STONE, J. B.; WALTON, J. S.; LESLIE, K. E.; SMITH, J. G. B. Reproductive performance of lactating Holstein cows fed supplemental beta-carotene. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.69, n.8, p.2173-2178, Aug. 1986.
- ALFURAIJI, M. M.; ATKINSON, T.; BROADBENT, P. J.; HUTCHINSON, J. S. M. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.33, n.1/4, p.99-109, Oct. 1993.
- AMARAL, B. C. **Utilização de vitamina A injetável em diferentes concentrações na produção e qualidade de embriões bovinos**. 2003. 48p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ARECHIGA, C. G.; EALY, A. D.; HANSEN, P. J. Efficacy of vitamin E and glutathione for thermoprotection of murine morulae. **Theriogenology**, Woburn, v.41, n.8, p.1545-1553, July 1994.
- ARECHIGA, C. G.; FLORES, S. V.; ORTIZ, O.; CÉRON, J. H.; PORRAS, A.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Effect of injection of  $\beta$ -carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, Woburn, v.50, n.1, p.65-76, July 1998b.

ARECHIGA, C. G.; STAPLES, C. R.; MCDOWELL, L. R.; HANSEN, P. J. Effects of time insemination and supplemental beta-carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.81, n.2 , p.390-402, Feb. 1998a.

ARIKAN, S.; RODWAY, R. G. Effect of cyclodextrin-encapsulated  $\beta$ -carotene on progesterone production by bovine luteal cells. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.64, n.3/4, p.149-160, Dec. 2000.

ARIKAN, S.; RODWAY, R. G. The effect of beta-carotene either in organic solvent or as HDL on progesterone production by bovine luteal cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.109, n.1, p.64-71, Sep. 1997.

ARORA, A.; MURALEEDHARAN, G. N.; STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.24, n.9, p.1355-1363, Sept. 1998.

ASCARELLI, I.; EDELMAN, Z.; ROSENBERG, M.; FOLMAN, Y. Effect of dietary carotene on fertility of high-yielding dairy cows. **Animal Production**, British, v.40, n.3, p.195-207, Apr. 1985.

ASHOK, B. T.; ALI, R. The aging paradox: free radical theory of aging, **Experimental Gerontology**, Oxford, v.34, n.3, p.293-303, June 1999.

ATTARAN, M; PASQUALOTTO, E.; FALCONE, T.; GOLDBERG, J.; MILLER, K.; AGARWAL, A. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on outcome of in vitro fertilization. **International Journal Fertility**, New York, v.45, n.4, p.314-320, May 2000.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Woburn, v.56, n.9, p.1483-1496, Dec. 2001.

BAZER, F. W.; SIMMEN, R. C.; SIMMEN, F. A. Comparative aspects of conceptus signals for maternal recognition of pregnancy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.622, n.1, p.202-211, Jan. 1991.

BENDICH, A. Beta-carotene and immune response. **The Proceedings of the Nutrition Society**, Wallingford, v.50, n.2, p.263-274, Aug. 1991.



- BENDICH, A. Symposium: Antioxidants, immune response and animal function. Physiological role of antioxidants in the immune system. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.76, n.9, p.2789-2794, Sept. 1993.
- BENDICH, A.; OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.3, n.8, p.1927-1932, Aug. 1989.
- BENDICH, A.; SHAPIRO, S. S. Effect of  $\beta$ -carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.116, n.11, p.2254-2262, Nov. 1986.
- BENYEI, B.; KULCSAR, M.; GASPARDY, A.; PECSI, A. Progesterone profiles and oestrous cycle changes following superovulatory treatment of Holstein-Friesian dairy cows in a tropical environment. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v.52, n.4, p.489-499, Apr 2004.
- BERTRAM, J. S.; BORTKIEWICZ, H. Dietary carotenoids inhibit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse and human cells. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1327-1336, Dec. 1995.
- BESENFELDER, U.; SOLTI, L.; SEREGI, J.; MÜLLER, M.; BREM, G. Different roles for B-carotene and vitamin A in the reproduction on rabbits. **Theriogenology**, Woburn, v.45, n.8, p.1583- 1591, June 1996.
- BINDAS, E. M.; GWAZDAUSKAS F. C.; MCGILLIARD M. L.; POLAN, C. E. Progesterone responses to human chorionic gonadotropin in dairy cattle supplemented with b-carotene. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.67, n.12, p.2978-2985, Dec. 1984b.
- BINDAS, E. M.; GWAZDAUSKA, F. C. S.; AIELLO, R. J.; HERBEIN, J. H.; MCGILLIARD, M. L.; POLAN, C. E. Reproductive and metabolic characteristics of dairy cattle supplemented with bcarotene. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.67, n.6, p.1249-1255, June 1984a.
- BILSKA, A. T. G.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Secretion of angiogenic activity and progesterone by ovine luteal cell types in vitro. **Journal Animal Science**, Champaign, v.69, n.5, p.2099-2107, May 1991.

BILSKA, A. T. G.; REYNOLDS, L. P.; KIRSCH, J. D.; REDMER, D. A. Gap junctional intercellular communication of bovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of cyclic adenosine 3,5-monophosphate. **Biology of Reproduction**, Madison, v.54, n.3, p.538-545, Mar. 1996.

BJORNEBOE, A.; BJORNEBOE, G. E.; BODD, E.; HAGEN, B. F.; KVESETH, N.; DREVON, C. A. Transport and distribution of alpha-tocopherol in lymph, serum and liver cells in rats. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.889, n.3, p.310-315, Mar. 1986.

BODENSTEINER, K. J.; WILTBANK, M. C.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, Woburn, v.45, n.2, p.499-512, Jan. 1996.

BOLAND, M. P.; CROSBY, T. F.; GORDON, I. M. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, Woburn, v.10, n.2/3, p.175-180, Aug./Set 1978.

BREGELIUS, F. R.; TRABER, M. G. Vitamin E: Function and metabolism. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.13, n.10, p.1145-1155, July. 1999.

BRIEF, S.; CHEW, B. P. Effects of vitamin A and  $\beta$ -carotene on reproductive performance in gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.60, n.4, p.998-1004, Apr 1985.

BRITT, J. H.; WHALEY, S. L.; HEDGPETH, V. S. Improvement of embryo survival by injection of vitamin A in gilts fed normal or high-energy diets before and after mating. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, Supplement1, p.271, Jan. 1992.

BUHI, W. C.; THATCHER, M. J.; SHILLE, V. M.; ALVAREZ, I. M.; LANNON, A. P.; JOHNSON, J. Synthesis of uterine endometrial proteins during early diestrus in the cyclic and pregnant dog, and after estrogen and progesterone treatment. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 47, p. 326-336, Sep. 1992.

BURATINI JUNIOR, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BÓ, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, Woburn, v.54, n.3, p.421-431, Aug. 2000.

BURFENING, P. J.; ANDERSON, D. C.; KINKIE, R. A.; WILLIAMSAND, J.; FRIEDRICH, R. L. Synchronization of estrus with PGF<sub>2</sub>, in beef cattle. **Journal Animal Science**, Champaign, v.47, n.5, p.999-1003, Nov. 1978.

BURRI, B. J. Betacarotene and human health: a review of current research. **Nutrition Research**, Los Angeles, v.17, n.3, p.547-580, Apr 1997.

CANFIELD, L. M.; FORAGE, J. W.; VALENZUELA, J. G. Carotenoids as cellular antioxidants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Cambridge, v.200, n.4, p.260-265, Sep. 1992.

CANTRELL, A.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G.; RANCAN, F.; BOHM, F. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.412, n.1, p.47-54, Jan. 2003.

CASTERMILLER, J. J. M.; WEST, C. E. Bioavailability and Bioconversion of carotenoids. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.18, n.4/5, p.19-38, Apr 1998.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, Washington, v.59, n.3, p.527-605, July 1979.

CHEW, B. P.; HOLPUCH, D. M.; O'FALLON, J. V. Vitamin A and p-carotene in bovine and porcine plasma, liver, corpora lutea, and follicular fluid. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 7, n.6, p.1316-1322, June 1984.

CHEW, B. P.; ARCHER, R. G. Comparative role of vitamin A and  $\beta$ -carotene on reproduction and neonate survival in rats. **Theriogenology**, Woburn, v.20, n.4, p.459-472, Oct. 1983.

CHEW, B. P. Effects of supplemental  $\beta$ -carotene and vitamin A on reproduction in swine. **Journal Animal Science**, Champaign, v.71, n.1, p.247-252, Jan. 1993.

CHEW, B. P.; RASMUSSEM, H.; PULBOS, M. H.; PRESTON, R. L. Effects of vitamin A and  $\beta$ -carotene on plasma progesterone and uterine protein secretion in gilts. **Theriogenology**, Woburn, v.18, n.6, p.643-654, Dec. 1982.

CHEW, B. P.; WENG, B. B. C.; KIM, H. W.; WONG T. S.; PARK, J. S.; LEPINE, A. J. Uptake of  $\beta$ -carotene by ovarian and uterine tissues and effects on steroidogenesis during the estrous cycle in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.62, n.7, p.1063-1067, July 2001.

CHRISTENSEN, D.S., HOPWOOD, M.L., WILTBANK, J.N. Level of hormones in the serum of cycling beef cows. **Journal Animal Science**, Champaign, v.38, n.3, p.577-583, Mar. 1974.

CLAWITTER, J.; TROUT, W. E.; BURKE, M. G.; ARAGHI, S.; ROBERTS, R. M. A novel family of progesterone-induced, retinol-binding proteins from uterine secretions of the pig. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.265, n.6, p.3248-3255, Feb. 1990.

COFFEY, M. T.; BRITT, J. H. Enhancement of sow reproductive performance by S-carotene or vitamin A. **Journal Animal Science**, Champaign, v.71, n.5, p.1198-1202, May 1993.

COMBS JUNIOR, G. F. **The vitamins**:Fundamental aspects in nutrition and health. 2. ed. New York: Academic, 1992. 526 p.

CONN, P. F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v.11, n.1, p.41-47, Oct. 1991.

COOKE B. C.; COMBDEN, N. A. A study of the relationship between beta-carotene and fertility problems in dairy cows. **Animal Production**, British, v.26, n.2, p.356, Feb. 1978.

DALTON, J. C.; NADIR, S.; BAME, J. H.; NOFTSINGER, M.; SAACKE, R. G. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. **Journal Animal Science**, Champaign, v.78, n.8, p.2081-2085, Aug. 2000.

DAS, P.; CHOWDHURY, M. Vitamin E-deficiency induced changes in ovary and uterus. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hauge, v.198, n.1/2, p.151-156, Aug. 1999.

DIMASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.274, n.2, p.532-538, Nov. 1989.

DÍAZ, T.; MANZO, M.; TROCÓNIZ, J.; BENACCHIO, N.; VERDE, O. Plasma progesterone levels during the estrous cycle of Holstein and Brahman cows, Carora type and cross-bred heifers. **Theriogenology**, Woburn, v.26, n.4, p.419-432, Oct. 1986 .

DONALDSON, L. E. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. **Theriogenology**, Woburn, v.31, n.1, p.183, Jan. 1989.

EGER, S.; DRORI, D.; KADOORI, I.; MILLER, N.; SCHINDLER, H. Effects of selenium and vitamin E on incidence of retained placenta. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.68, n.8, p.2119-2122, Aug. 1985.

EICHER, S. D.; MORRILL, J. L.; BLECHA, F. Vitamin concentration and function of leukocytes from dairy calves supplemented vitamin A, vitamin E, and  $\beta$ -carotene in vitro. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.77, n.2, p.560-565, Feb. 1994.

ELMARINI, A. A.; HOLDAS JUNIOR, H. S.; VEN, E.; IMRIK, P. Effect of vitamin A supplementation on mice embryo production and viability. **Biology of Reproduction**, Madison, v.60, n.6, p.1483-1487, Dec. 1999.

ERSKINE, R. J.; BARTLETT, P. C.; HERDT, T.; GASTON, P. Effects os parenteral administration of vitamin E on health periparturient dairy cows. **Journal American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.211, n.3, p.466-469, Feb. 1997.

EVANS, H.M.; BISHOP, K. S. On the existence og a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. **Science**, Washington, v.56, n.7, p.650-651, July 1922.

EVERETT, S. A.; DENNIS, M. A.; PATEL, K. B.; MADDIX, S.; KUNDU, S. C.; WILSON, R. L. Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl, and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant  $\beta$ -carotene. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.271, n.2, p.3988-3994, Feb. 1996.

FOLMAN, Y.; ASCARELLI, I.; KRAUS, D.; BARASH, H. Adverse effect of b-carotene in diet on fertility of dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.70, n.2, p.357-366, Feb. 1987.

FROMMEL, T. O.; LIETZ, H.; MOBARHAN, S. Expression of mRNA for the gap-junctional protein connexin 43 in human colonic tissue is variable in response to beta-carotene supplementation. **Nutrition Cancer**, Mahwah, v.22, n.3, p.257-265, Mar. 1994.

FRYE, T. M.; WILLIAMS, S. N.; GRAHAM, T. W. Vitamin deficiencies of cattle. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Philadelphia, v.7, n.2, p.217-275, July 1991.

GANGULY, J.; RAO, M.R.S.; MURTHY, S.K.; SARADA, K. Systemic mode of action of vitamin A. **Vitamin and Hormones**. v.38, p.1, 1980.

GATZULI, E.; ATEN, R. F.; BEHRMAN, H. R. Inhibition of gonadotropin action and progesterone synthesis by xanthine oxidase in rat luteal cells. **Endocrinology**, Springfield, v.128, n.5, p.2253-2258, May 1991.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v.55, n.6, p.1187-1194, Dec. 1996.

GRAVES-HOAGLAND, R. L.; HOAGLAND, T. A.; WOODY, C. O. Effect of  $\beta$ -carotene and vitamin A on progesterone production by bovine luteal cells. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.71, n.4, p.1058-1062, Apr 1988.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reproduction in farms animals**. 7. ed. Maryland: Lipcott Williams & Wilkins, 2000. 509p.

HALILOGLU, S.; BASPINAR, N.; SERPEK, B.; ERDEM, H.; BULUT, Z. Vitamin A and betacarotene levels in plasma, corpus luteum and follicular fluid of cyclic and pregnant cattle. **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v.37, n.2 , p.96-99, Apr 2002.

HARNEY, J. P.; MIRANDO, M. A.; SMITH, L. C.; BAZER, F. W. Retinol-binding protein: a major secretory product of the pig conceptus. **Biology of Reproduction**, Madison, v.42, n.3, p.523-532, Mar. 1990.

HARNEY, J. P.; OTT, T. L.; GEISERT, R. D.; BAZER, F. W. Retinol-binding protein gene expression in cyclic and pregnant endometrium of pigs, sheep, and cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v.49, n.5, p.1066-1073, Nov. 1993.

- HARRISON, J. H.; HANCOCK, D. D.; CONRAD, H. R. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.67, n.1, p.123-132, Jan. 1984.
- HASLER, J. F.; MCCAULEY, A. C.; LATHROP, W. F.; FOOTE, R. H. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. **Theriogenology**, Woburn, v.27, n.1, p.139-168, Jan. 1987.
- HERDT, T. H.; STOWE, H. D. Fat-soluble vitamin nutrition for dairy cattle. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, Philadelphia, v.7, n.2, p.391-415, July 1991.
- HILL, T. J.; LAND, E. J.; MCGARVEY, W.; SCHALCH, D. J.; TINKLER, J. H.; TRUSCOTT, T. G. Interactions between Carotenoids and the CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>.bul. Radical. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.117, n.32, p.8322-8326, 1995.
- HOGAN, J. S.; WEISS, W. P.; SMITH, K. L. Role of Vitamin E and Selenium in Host Defense Against Mastitis. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.76, n.9, p.2795-2803, Sep. 1993.
- HOLLANDER, D.; RUBLE JUNIOR, P. E.. Betacarotene intestinal absorption: bile,fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v.235, n.6, p.686-691, Dec. 1978.
- HUANG, H. S.; GOODMAN, D. S. Vitamin A and carotenoids: intestinal absorption and metabolism of <sup>14</sup>C-labeled vitamin A alcohol and β-carotene in the rat. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.240, p.2839-2844, July 1965.
- ISLABÃO, N. **Vitaminas: seu metabolismo no homem e nos animais domésticos**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1982. 201p.
- IWANSKA, S.; STRUSINSKA, D. The effect of β-carotene and vitamins A, D<sub>3</sub> and E on some reproductive parameters in cows. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v.45, n.1, p.95-107, Jan./Feb. 1997.
- JAYARAM, M.; MURTHY, S. K.; GANGULY, J. Effect of vitamin A deprivation on the cholesterol side-chain cleavage enzyme activity of testes and ovaries of rats. **The Biochemical Journal**, London, v.136, n.1, p.221-223, Sep. 1973.

JUKOLA, E.; HAKKARAINEN, J.; SALONIEMI, H.; SANKARI, S. Effect of selenium fertilization on selenium in feedstuffs and selenium, vitamin e, and  $\beta$ -carotene concentrations in blood of cattle. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.79, n.5, p.831-837, May 1996.

KAGAN, V. E.; SERBINOVA, E. A.; BAKALOVA, R. A. Mechanisms of stabilization of biomembranes by alpha-tocopherol. The role of the hydrocarbon chain in the inhibition of lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.40, n.11, p.2403-2413, Dec. 1990.

KAPPUS, H.; DIPLOCK, A. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.13, n.1, p.55-74, July 1992.

KOSTOGLU, P.; KYRIAKIS, S. C.; PAPASTERIADIS, A.; ROUMPIES, N.; ALEXOPOULOS, C.; SAOULIDIS, K.; Effect of  $\beta$ -carotene on health status and performance of sows and their litters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.83, n.3, p.150-157, Apr 2000.

KRINSKY, N. I. Action of carotenoids in biological systems. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.13, p.561-587, 1993.

KRINSKY, N. I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.7, n.6, p.617-635, June 1989.

LAL THANKUR, M.; SRIVASTAVA, U. S. Vitamin-E metabolism and its application. **Nutrition Research**, St Louis, v.16, n.10, p.1767-1809, Oct. 1996.

LEBLANC, S. J.; DUFFIEL, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; TENHANG, J.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. The effect of prepartum injection of vitamin E on health in transition dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.85, n.6, p.1416-1426, June 2002.

LEBLANC, S. J.; HERDT, T. H.; SEYMOUR, W. M.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Peripartum Serum Vitamin E, Retinol, and Beta-Carotene in Dairy Cattle and Their Associations with Disease. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.87, n.3, p.609-619, Mar. 2004.

LINDNER, G. M.; WRIGHT, R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, Woburn, v.20, n.4, p.407-416, Oct. 1983.



LOVEN, D. P. A role for reduce oxygen species in heat- induce cells killing and the induction thermotolerance. **Medical Hypotheses**, Edinburgh, v.26, n.1, p.39-50, Jan. 1988.

MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrus. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.33, n.1/4, p.1-25, Oct. 1993.

MAPLETOFT, R. J.; MARTINEZ, M. F.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, n.14, E. Supplement2, p.E28-E36, Feb. 2003.

MCDOWELL, L. R. **Vitamins in animal nutrition**: comparative aspects to human nutrition. San Diego: Academic, 1989. 486p.

MCDOWELL, K. J.; ADAMS, M. H.; FRANKLIN, K. M.; BAKER, C. B. Changes in equine endometrial retinol-binding protein RNA during the estrous cycle and early pregnancy and with exogenous steroids. **Biology of Reproduction**, Madison, v.52, n.2, p.438-443, Feb. 1995.

METRE, D. C.; CALLAN, R. J. Selenium and vitamin E. **Veterinary Clinics of North America**: food animal practice, Philadelphia, v.17, n.2, p.373-402, July 2001.

MICHAL, J. J.; CHEW, B. P.; WONG, T. S.; HEIRMAN, L. R.; STANDAERT, F. E. Effects of supplemental  $\beta$ -carotene on blood and mammary phagocyte function in peripartum dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.73, Supplement1, p.149, Jan. 1990.

MICHAL, J. J.; HEIRMAN, L. R.; WONG, T. W.; CHEW, B. P.; FRIGG, M.; VOLKER, L. Modulatory effects of dietary beta-carotene on blood and mammary leukocyte function in periparturient dairy cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.77, n.5, p.1408-1421, May 1994.

MILLER, J. K.; SLEBODZINSKA, E. B.; MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants and animal function. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.76, n.9, p.2812-2823, Sept. 1993.

MOFFATT, R. J.; ZOLLERS JUNIOR, W. G.; WELSHONS, W. V.; KIEBORZ, K. R.; GARVERICK, H. A.; SMITH, M. F. Basis of norgestomet action as a progestogen in cattle. **Domestic animal endocrinology**, Auburn, v.10, n.1, p.21-30, Jan. 1993.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, Woburn, v.19, n.1, p.55-81, Jan. 1983.

MOHAMED, N.; HANSHIM, R.; RAHMAN, N. A.; ZAIN, S. M. An insight to the cleavage of  $\beta$ -carotene to vitamin A: a molecular mechanics study. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v.538, n.1/3, p.254-252, Sep. 2001.

MUELLER, F. J.; MILLER, J. K.; RAMSEY, N.; DELOST, R. C.; MADSEN, F. C.; MAYERS, T. D. Effects of vitamin E and excess iron on placental retention in dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.71, Supplement1, p.157, Jan 1988.

MURRAY, M. K.; VERHAGE, H. G.; BUHI, W. C.; JAFFE, R. C. The detection and purification of a catuterine secretory protein that is strogen dependent (CUPED). **Biology of Reproduction**, Madison, v.32, n.5, p.1219-1227, June 1985.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 3. ed. New York: Worth, 2000. 1152 p.

O' FALLON, J. V.; CHEW, B. P. The subcellular distribution of  $\beta$ -carotene in bovine corpus luteum. **Proceeding of Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 177, n. 3, p. 406-411, Dec. 1984.

OLSON, J. A. Vitamin A function of carotenoids: the conversion of  $\beta$ -carotene to vitamin A. **The Journal Nutrition**, Bethesda, v.119, n.1, p.105-108, Jan. 1989.

OLSON, J. D. The role of selenium and vitamin E in mastitis and reproduction of dairy cattle. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v.49, n.6, p.362-364, June 1996.

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

OLSON, S. E.; SEIDEL JÚNIOR, G. E. Vitamin E improves development of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, Woburn, v.43, n.1, p.289, Jan. 1995.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; WATHES, D. C. Bovine luteal cell activity in culture. Maintenance of steroidogenesis by high density lipoprotein containing high or low  $\beta$ -carotene concentrations. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.17, n.3/4, p.165-176, Nov. 1988.

OSTERLEI, M.; BJERKENG, S. J.; JENSEN, L. J.; Plasma appearance and distribution of astaxanthin *E/Z* and *R/S* isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.11, n.10, p.482-490, Oct. 2000.

PANGANAMALA, R. V.; CORNWELL, D. G. The effect of vitamin E on arachidonic acid metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.393, n.1, p.376-393, Jan. 1982.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.10, n.5, p.542-551, Apr 1996.

PARKER, R. W. Carotenoids in human blood and tissues. **The Journal Nutrition**, Bethesda, v.119, n.1, p.101-104, Jan. 1989.

PELTIER, M. M.; PELTIER, M. R.; SHARP, D. C.; OTT, E. A. Effect of  $\beta$ -carotene administration on reproductive function of horse and mares. **Theriogenology**, Woburn, v.48, n.6, p.893-906, Oct. 1997.

POLITIS, I.; HIDIROGLOU, N.; WRITE, J. H.; GILMORE, J. A.; GOREWIT, R. C.; SCHERF, H. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.56, n.2, p.179-184, Feb. 1995.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v.67, n.5, p.289-297, Sept./Oct. 1997.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, Chicago, v.30, n.4, p.277-284, Apr 1995.

- PUSZTAI, A.; AGOTA, G.; BARDOS L. Effect of large dietary doses of  $\beta$ -carotene on plasma retinoid and  $\beta$ -carotene levels and on progesterone production in the granulosa cells of japanese quail. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapeste, v.48, n.1, p.81-87, Jan. 2000.
- RANI, P. J. A.; PANNEERSELVAM, C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. **Experimental Gerontology**, Oxford, v.36, n.10., p.1713-1726, Nov. 2001.
- RAPOPORT, R.; SKLAN, D.; WOLFENSON, D.; ALBALANCY, S. A.; HANUKOGL, L. Anti oxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine oestrous cycle. **Biochemistry Biophysics Acta**, Paris, v.1380, n.1, p.133-140, Mar. 1998.
- REDDY, P. G.; MORRIL, J. L.; FREY, R. A. Vitamin E requirements of dairy calves. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.70, n.1, p.123-129, Jan. 1987.
- REDMER, D. A.; BILSKA, A. T. G.; REYNOLDS; L. P. Contact-dependent intercellular communication of bovine luteal cells in culture. **Endocrinology**, Baltimore, v.129, n.5, p.2757-2766, Nov. 1991.
- REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L. de; LIMA, P. F. de; SANTOS FILHO, A. S. dos; ANDRADE, J. C. de O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. de F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. cap.8, p.127-178.
- RENARD, J. P.; PHILIPPON, A.; MENEZO, Y. In vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.58, n.1, p.161-164, Jan. 1980.
- ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. The functions of uterine secretion. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.82, n.2, p.875-892, Mar. 1988.
- ROSS, S. S.; MCCAFFERY, P. J.; DRAGER, U. C.; DE LUCA, L. Retinoids in embrional development. **Physiological Reviews**, New York, v.80, n.3, p.1021-1054, July 2000.

SARTORI, R.; SOUZA, A. H.; GUENTHER, J. N.; CARAVIELLO, D. Z.; GEIGER, L. N.; SCHENK, J. L.; WILTBANK, M. C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v.1, n.1, p.86-90, oct./dec. 2004.

SAS Institute. **SAS/STAT User's guide**. Version 6.12., 4. ed., Cary, 1995. v.2, 1686p.

SCHERECK, R.; BAEUERLE, P. A. A role for oxygen radicals as second messengers. **Trend Cell Biology**, Cambridge, v.1, n.2/3, p.39-76, Aug.-Sep. 1991.

SCHMITZ, H. H.; POOR, C. L.; WELLMAN, R. B.; ERDMAN JUNIOR, J. W. Concentration of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissues. **The Journal Nutrition**, Bethesda, v.121, n.10, p.1613-1621, Oct. 1991.

SCHWEIGERT, F. J.; ZUCKER, H. Concentrations of vitamin A, beta-carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.82, n.2, p.575-579, Mar. 1988.

SCHWEIGERT, F. J.; KRIEGER, K.; SCHNURRBUSCH, U.; SCHAMS, D.; GROPP, J. Effect of dietary  $\beta$ -carotene on the early embryonic development and uterine fluid composition of gilts. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.86, n.7/8, p.265-272, Aug. 2002.

SEGERSON, E. C.; GANAPATHY, S. N. Fertilization of ova in selenium/vitamin E-treated ewes maintained under two planes of nutrition. **Journal Animal Science**, Champaign, v.51, n.2, p.386-394, Aug. 1981.

SEGERSON, E. C.; RIVIERE, G. J.; DALTON, H. L.; WHITACRE, M. D. Retained placenta of Holstein cows treated with selenium and vitamin E. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.64, n.9, p.1833-1836, Sept. 1981.

SEGERSON JÚNIOR, E. C.; MURRAY, F. A.; MOXON, A. L.; REDMAN, D. R.; CONRAD, H. R. Selenium/vitamin E: role in fertilization of bovine ova. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.60, n.6, p.1001-1005, June. 1977.

SEIDEL JÚNIOR, G. E.; SEIDEL, S. M. **Training manual for embryo transfer in cattle**. Roma: Publications Divisions FAO, 1991. 147p.

SHAW, D. W.; FARIN, P. W.; WASHBURN, S. P.; BRITT, J. H. Effect of retinol palmitate on superovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. **Theriogenology**, Woburn, v.44, n.1, p.51-58, July 1995.

SHEA, B. F. Evaluating the bovine embryo. **Theriogenology**, Woburn, v.15, n.1, p.13-42, Jan. 1981.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315S-1321S, Dec. 1995.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, Feb. 1993.

SILVEIRA, P. R. S.; FERNANDES, L. C. O.; MORES, N.; LIMA, G. J. M. M.; BARIONI JUNIOR, W.; BERTANI, G. R. Efeito da vitamina A sobre o embrião, endométrio e níveis séricos de progesterona em leitoas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.3, n.2, p.180-182, mar./abr. 1999.

SNYDER, W. E.; STUART, R. L. Nutritional role of beta-carotene in bovine fertility. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.64, Supplement1, p.104, Jan. 1981.

SOKOL, R. J.; HEUBI, J. E.; IANNACCONE, S.; BOVE, K; E; BALISTRERI, W. F. Mechanism causing vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.85, n.5, p.1172-1182, Nov. 1983.

SOKOL, R. J.; REARDON, M. C.; ACCURSO, F. J.; STALL, C.; NARKEWICZ, M.; ABMAN, S. H.; HAMMOND, K. B. Fat-soluble-vitamin status during the first year of life in infants with cystic fibrosis identified by screening of newborns. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.50, n.5, p.1064-1071, Nov. 1989.

STAATS, D. A.; LOHR, D. P.; COLBY, H. D. Effects of tocopherol depletion on the regional differences in adrenal microsomal lipid peroxidation and steroid metabolism. **Endocrinology**, Baltimore, v.123, n.8, p.975-980, Aug. 1988.

STAHL, W.; NICOLAI, S.; BRIVIBA, K.; HANUSCH, M.; BROSZEIT, G.; PETERS, M.; MARTIN, H. D.; SIES, H. Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. **Carcinogenesis**, Oxford, v.18, n.1, p.89-92, Jan. 1997.

SUNDERLAND, S. J.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Selection, dominance and atresia of follicles during the estrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.101, n.3, p.547-555, Aug. 1994.

TAKAYANAGI, R.; KATO, K. I.; IBAYASHI, H. Relative inactivation of steroidogenic enzyme activities of in vitro vitamin E-depleted human adrenal microsomes by lipid peroxidation. **Endocrinology**, Baltimore, v.119, v.8, p.464-69, Aug. 1986.

TALAVERA F.; CHEW, B. P. Comparative role of retinol, retinoic acid and  $\beta$ -carotene on progesterone secretion by pig corpus luteum in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.82, n.2, p.611-615, Mar.1988.

TALAVERA, F.; CHEW, B. P. In vitro interaction of lipoproteins with retinol, retinoic acid and  $\beta$ -carotene on progesterone secretion by bovine luteal cells. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.70, Supplement1, p.119, Jan. 1987.

TAO, Y.; ZHOU, B.; XIA, G.; WANG, F.; WU, Z.; FU, M. Exposure to L-ascorbic acid or  $\alpha$ -tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase i to metaphase ii and prevents cumulus cells from fragmentation. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v.39, n.1, p.52-57, Feb. 2004.

THOMAS, P. G. A.; LESLIE, M. V.; HANSEN, P. J. Retinol binding protein is produced by the bovine endometrium and accumulates in uterine secretions in a progesterone-dependent manner, **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.27, n.1, p.55-66, Feb. 1992.

TORRES H. E. G. Obligatory role of bile for the intestinal absorption of vitamin E. **Lipids**, Chicago, v.5, n.4, p.379-384, Apr 1970.

TREGASKES, L. D; BROADBENT, P. J; DOLMAN, D. F; GRIMMER, S. P; FRANKLIN, M. F. Evaluation of Crestar, a synthetic progestogen regime, for synchronising oestrus in maiden heifers used as recipients of embryo transfers **The Veterinary Record**, London, v.134, n.4, p.92-94, Jan. 1994.

TRINDER, N.; WOODHOUSE, C. D.; RENTAN, C. P. Effect of vitamin E and selenium on the incidence of retained placentae in dairy cattle. **The Veterinary Record**, London, v.85, n.20, p.550-553, Nov. 1969.

ULLREY, D. E. Vitamin E for swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.53, n.4, p.1039-1056, Oct. 1981.

WANG, J. Y.; HAFI, C. B.; LARSON, L. L. Effect of supplemental beta-carotene on luteinizing hormone released in response to gonadotropin-releasing hormone challenge in ovariectomized Holstein cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.71, n.2, p.489-504, Feb. 1988a.

WANG, J. Y.; LARSON, L. L.; OWEN, F. G. Effect of beta-carotene supplementation on reproductive performance of dairy heifers. **Theriogenology**, Woburn, v.18, n.4, p.461-473, Oct. 1982.

WANG, J. Y.; OWEN, F. G.; LARSON, L. L. Effect of beta-carotene supplementation on reproductive performance of lactating holstein cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.71, n.1, p.181-186, Jan. 1988b.

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**, New York, v.78, n.6, p.1272-1277, Dec. 2002.

WENG, B. C.; CHEW, B. P.; WONG, T. S.; PARK, J. S.; KIM, H. W.; LEPINE, A. J.  $\beta$ -carotene uptake and changes in ovarian steroids and uterine proteins during the estrous cycle in the canine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.78, n.5, p.1284-1290, May 2000.

WEISS, W. P.; HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; WILLIAMS, S. N. Effect of Dietary Fat and Vitamin E on  $\alpha$ -Tocopherol and  $\beta$ -Carotene in Blood of Peripartum Cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.77, n.5, p.1422-1429, May 1994.

WING, J. M. Effect of source and season on apparent digestibility of carotene in forage by cattle. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.52, n.4, p.479-483, Apr 1969.

WRIGHT, J. M. Non-surgical embryo transfer in cattle: embryo-recipient interactions. **Theriogenology**, Woburn, v.15, n.1, p.43-51, Jan. 1981.



YOUNG, F. M.; LUDERER, W. B.; RODGERS, R. J. The antioxidant  $\beta$ -carotene prevents covalent cross-linking between cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and its electron donor, adrenodoxin, in bovine luteal cells. **Molecular Cellular Endocrinology**, Limerick, v.109, n.1, p.113-118, Mar. 1995.

ZHANG, L.; COONEY, R. V.; BERTRAM, J. S.; Carotenoids up-regulate connexin-43 gene expression independent of their pro-vitamin A or antioxidant properties. **Cancer Research**, Chicago, v.52, n.20, p.5707-5712, Oct. 1992.

ZHANG, L. X.; COONEY, R. V.; BERTRAM, J. S. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10CONTROLE/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. **Carcinogenesis**, Oxford, v.12, n.11, p.2109-2114, Nov. 1991.

ZHANG, P.; OMAYE, S. T.  $\beta$ -Carotene: interactions with  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.12, n.1, p.38-45, Jan. 2001.