

UFRB

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
Bacharelado em Biologia

MÉROLE DE SOUZA FERREIRA

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE COELHAS
(Oryctolagus cuniculus) **SUPLEMENTADAS COM VITAMINA**
E E/OU SELÊNIO POR VIA ORAL

Cruz das Almas

2012

MÉROLE DE SOUZA FERREIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE COELHAS
(*Oryctolagus cuniculus*) SUPLEMENTADAS COM VITAMINA
E E/OU SELÊNIO POR VIA ORAL**

Monografia apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biologia, pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa Pires Barbosa

Cruz das Almas – Bahia

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

F383

Ferreira, Mérole de Souza.

Criopreservação de embriões de coelhas (*Oryctolagus cuniculus*) suplementadas com Vitamina E e/ou selênio por via oral / Mérole de Souza Ferreira. _ Cruz das Almas, BA, 2012.

30f.; il.

Orientador: Larissa Pires Barbosa.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Coelho – Reprodução. 2.Coelho – Alimentação.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 636.9322

MÉROLE DE SOUZA FERREIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE COELHAS
(*Oryctolagus cuniculus*) SUPLEMENTADAS COM
VITAMINA E E/OU SELÊNIO POR VIA ORAL**

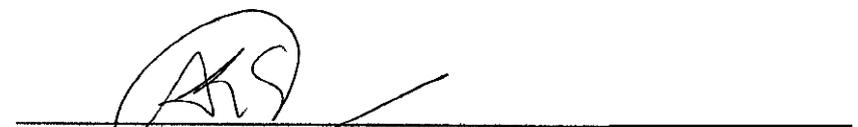
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Aprovada em 22 de novembro de 2012.

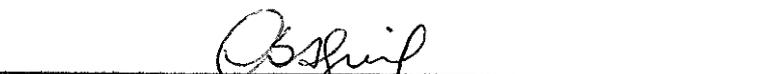
Banca Examinadora



Orientador: Prof^a. Dr^a. Larissa Pires Barbosa
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Examinador 01: Prof^a. Dr^a. Ana Karina da Silva Cavalcante
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Examinador 02: Prof^a. Msc. Cristiane Silva Aguiar
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

*Ao meu Deus por permitir e abençoar
o desenvolvimento deste trabalho.
À minha família por todo amor, carinho,
compreensão e apoio.
Ao meu noivo por toda dedicação, cuidado,
paciência e amor.
À minha orientadora pelo carinho, incentivo,
orientação e apoio incondicional.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter sido meu refúgio e fortaleza, me abençoando com saúde, força e coragem todos os dias. Por ter permitido e abençoado a realização deste trabalho. Muito obrigada meu Criador.

À minha família e meu amor Everson que me apoiou de forma incondicional, por todo amor, incentivo, paciência, compreensão, carinho, orações imprescindíveis para a realização e conclusão desta pesquisa. Muito obrigada, pois entre lágrimas e sorrisos, erros e acertos, vocês foram meu porto seguro.

À minha orientadora, Dr^a Larissa Pires Barbosa, por esses anos de convivência, incentivo, conselhos, carinho, apoio. Por ter se tornado minha mãe científica, exemplo de pessoa e profissional que sempre terei na memória. Por vibrar comigo a cada conquista e mostrar que os erros são grandes aprendizados. Agradeço por ter me guiado durante esses anos e especialmente neste trabalho, tornando-o real.

Ao Professor Msc. Grimaldo Jorge Lemos de Carvalho, responsável pelo setor de Cunicultura da UFRB, por ter permitido e cedido coelhas para a realização deste trabalho.

À cada membro da Família NERA (Núcleo de Estudos em Reprodução Animal), em especial aqueles que participaram ativamente neste trabalho e tornaram-se amigos indispensáveis, como Jaqueline, Renan, Willian, Caline, aos médicos veterinários Carmo, Carol e Rosiléia. Muito obrigada, pois sem vocês não teria sido tão prazeroso, mesmo nos momentos difíceis.

Aos funcionários e amigos do setor de Cunicultura da UFRB, Everaldo, Sr. Zelito, Rick, Vanderley, ao vigilante Sr. Laudi, por terem me ajudado durante toda a fase experimental do projeto, principalmente por toda atenção e compreensão em momentos complicados.

Às Professoras Dr^a Ana Karina da Silva Cavalcante e Msc. Cristiane Silva Aguiar por aceitarem participar da banca de defesa da monografia, contribuindo para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada a todos que participaram direta e indiretamente, pois sem vocês a realização desta pesquisa não teria sido tão prazerosa.

“Eu posso todas as coisas em Deus que me fortalece.”

Bíblia Sagrada

Filipenses 4:13

SUMÁRIO

	Página	
1	INTRODUÇÃO	11
2	JUSTIFICATIVA	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	Fisiologia reprodutiva da coelha	12
3.2	Selênio	13
3.3	Vitamina E	14
3.4	Efeito da Vitamina E e selênio e os processos reprodutivos	15
3.5	Criopreservação de embriões	17
4	OBJETIVOS	19
5	METODOLOGIA	20
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
7	CONCLUSÃO	26
	REFERÊNCIAS	27

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação via oral de vitamina E e/ou selênio no número de embriões e na qualidade embrionária antes e após criopreservação, de coelhas superovuladas. O experimento foi realizado no Setor de Cunicultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Foram utilizadas 24 coelhas adultas da raça Nova Zelândia, distribuídas em quatro grupos (G), compostos por fêmeas superovuladas, sendo G1: sem administração de vitamina E e selênio; G2: com administração de 4,8mg de vitamina E; G3: com administração de 0,006mg de selênio e G4: com administração de 4,8mg de vitamina E e 0,006mg de selênio. O período de suplementação foi de 28 dias antes do tratamento superovulatório. A superovulação foi induzida utilizando-se 40UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) seguida da aplicação de 40UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG), 48 horas após e ambas por via intramuscular (IM), as coberturas foram realizadas logo após a aplicação de hCG. Os animais foram eutanasiados e os embriões coletados 72 horas após a cópula, avaliados e criopreservados. Os dados foram avaliados por ANOVA e foi feito o teste de comparação de médias Tukey com o programa SISVAR. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) para peso do ovário direito, peso do ovário esquerdo, índice gonadosomático (IGS), número de estruturas recuperadas, taxa de recuperação embrionária, número de embriões viáveis, número de embriões degenerados e a qualidade morfológica dos embriões viáveis. Desta forma, conclui-se que a suplementação de 4,8mg de vitamina E e/ou 0,006mg de selênio não influencia na resposta superovulatória e na qualidade embrionária antes e após o processo de criopreservação de embriões de coelhas Nova Zelândia.

Palavras-chave: cunicultura, reprodução, superovulação

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the effect of oral supplementation of vitamin E and/or selenium in the number of embryos and embryo quality before and after cryopreservation of superovulated female rabbits. The experiment was performed at the Cuniculture of Federal University of Bahia in the Reconcavo. A total of 24 adult female rabbits New Zealand, divided into four groups (G), consisting of superovulated females: G1: with administration of vitamin E and selenium; G2: with administration of 4.8mg of vitamin E; G3: with administration of 0.006mg selenium and G4: with administration of 4.8mg of vitamin E and 0,006mg of selenium. The supplementation period was 28 days before the superovulatory treatment. Superovulation was induced using 40UI of equine chorionic gonadotropin (eCG) followed by the application of 40UI of human chorionic gonadotropin (hCG), and 48 hours after both intramuscular (IM), the mating were performed soon after the hCG. The animals were euthanized and embryos collected 72 hours after copulation, evaluated and cryopreserved. The data were evaluated by ANOVA and was made the Tukey comparison test with SISVAR program. There was no significant difference ($P>0.05$) for weight of right ovary, weight of left ovary, gonadosomatic index (GSI), the number of recovered structures, embryo recovery rate, number of embryos, number of embryos degenerated and morphological quality of viable embryos. Thus, it was concluded that supplementation of 4.8mg of vitamin E and/or 0,006mg of selenium does not influence the superovulatory response and embryo quality before and after the process of embryo cryopreservation of New Zealand rabbits.

Keywords: cuniculture, reproduction, superovulation

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Página
Tabela 1. Resposta superovulatória e viabilidade embrionária de coelhas suplementadas com vitamina E e/ou selênio por via oral	24
Tabela 2. Estádio do desenvolvimento embrionário de coelhas suplementadas com vitamina E e/ou selênio por via oral	25
Tabela 3. Qualidade morfológica embrionária antes e após a criopreservação obtidas de coelhas suplementadas com vitamina E e/ou selênio por via oral	25
Figura 1. Suplementação	21
Figura 2. Superovulação	21
Figura 3. Lavagem uterina	22
Figura 4. Embriões	22
Figura 5. (A) Temperatura máxima (°C) e (B) Umidade relativa do ar (%) durante o período de suplementação	23

1 INTRODUÇÃO

O desempenho reprodutivo é influenciado pela nutrição. Segundo Smith; Akinbamijo (2000), tanto a falta quanto o excesso de nutrientes dietéticos são capazes de afetar negativamente o desempenho reprodutivo dos animais. Dentre os nutrientes, proteínas, lipídeos e carboidratos merecem maior atenção. Entretanto, vitaminas e minerais fornecidos inadequadamente na dieta, também podem afetar adversamente a reprodução.

A influência dos nutrientes fornecidos na dieta sobre o desempenho reprodutivo, em fêmeas, pode ser diretamente por meio do fornecimento de nutrientes específicos, que são necessários, por exemplo, para os processos de desenvolvimento do folículo, maturação oocitária, ovulação, fertilização, sobrevivência embrionária e o estabelecimento da gestação; e, indiretamente, atuando sobre as concentrações circulantes dos hormônios e outros metabólitos (ROBINSON et al., 2006).

Dentre os minerais e vitaminas, os efeitos antioxidantes da vitamina E e selênio, são de suma importância para sobrevivência embrionária, pois protege as células contra os insultos oxidativos, resultantes do seu metabolismo normal (ASHWORTH, 1995), sendo este muito maior em células e tecidos manipulados *in vitro*. Segundo Corrêa (2006), vários fatores podem contribuir para aumentar a produção das espécies reativas ao oxigênio, entre eles pode-se destacar: a concentração de oxigênio, o contato com a luz e o excesso de manipulação dos embriões em laboratório. Desta forma, faz-se necessária a utilização de eficientes antioxidantes para aumentar a resistência embrionária frente aos processos de criopreservação.

Nos programas de reprodução, a eficiência da aquisição de embriões com alto valor genético também depende do sucesso de técnicas de estocagem em baixas temperaturas. Sendo assim, a criopreservação tornou-se particularmente importante no desenvolvimento do comércio internacional de embriões, uma vez que somente estruturas congeladas sob determinadas condições podem ser comercializadas (MAPLETOFT; STOOKEY, 1998).

2 JUSTIFICATIVA

Espera-se com a suplementação de vitamina E e/ou selênio, melhorar a qualidade embrionária e o número de embriões viáveis em fêmeas superovuladas, melhorando e potencializando o uso da técnica de transferência de embriões em coelhas e em outras espécies de mamíferos, incluindo a espécie humana. Isso contribuirá para melhorar os resultados dessa biotécnica, potencializando a sua adoção e diluindo os seus custos, com base no maior número de embriões viáveis por coleta.

O principal impacto tecnológico será descobrir mais uma alternativa viável para melhorar os índices obtidos com a técnica de transferência de embriões, fornecendo também dados para que essa alternativa possa ser utilizada para potencializar e melhorar aspectos reprodutivos na espécie humana.

Dessa forma, justifica-se o presente estudo pela importância de determinar os efeitos na utilização da suplementação de vitamina E e/ou selênio nos embriões antes e após criopreservação, avaliando-se tanto o ponto de vista reprodutivo quanto econômico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fisiologia reprodutiva da coelha

A coelha apresenta ovários pequenos em formato oval e útero duplex (com comprimento ao redor de 7 cm), que se liga à vagina por dois canais cervicais (BAKKER; BAUM, 2000). Os primeiros folículos ovarianos aparecem no 13º dia após o nascimento e os primeiros folículos antrais surgem aos 65-70 dias de idade. As coelhas tornam-se aptas à cobertura com 10-12 semanas de idade, mas geralmente ainda não são capazes de ovular. A idade à puberdade varia muito, de acordo com a raça: observa-se maior precocidade sexual nas raças pequenas ou médias (4-6 meses), do que nas raças grandes (5-8 meses) (ROMMERS et al., 2001).

A maioria dos animais ovula espontaneamente, mas na gata, coelha e camela a ovulação é induzida pela estimulação de receptores sensoriais na vagina e na cérvix durante a cópula. Por isso, a coelha é considerada um animal com ovulação

induzida, embora possa ocorrer ovulação espontânea (MORRELL, 1995). A cópula induz um reflexo neuro-endócrino que provoca a liberação de um pico de LH, que induz a ovulação (BAKKER; BAUM, 2000).

Segundo Cailol et al. (1983), um fator importante que influencia a fertilidade é a receptividade da coelha. Ela pode ser medida pela coloração da vulva (um sinal externo de atividade estrogênica) no momento da cobertura. As fêmeas jovens geralmente são cobertas pela primeira vez às 16-17 semanas de idade, embora atinjam a puberdade mais cedo, ao redor de 12 semanas (ROMMERS et al., 2001).

A duração da gestação na coelha é de 31 dias (variando entre 30 e 33 dias). Caso a duração da gestação seja inferior a 29 dias, os filhotes normalmente não são viáveis. Pelo menos quatro corpos lúteos são necessários para a manutenção da gestação nas coelhas brancas da Nova Zelândia (FEUSSNER et al., 1992).

Segundo Lebas et al. (1986) o potencial reprodutivo das coelhas é influenciado por fatores externos, como alimentação, pois em sua pesquisa verificaram que as coelhas alimentadas com ração comercial *ad libitum* atingiram a puberdade 3 semanas mais cedo do que coelhas similares que receberam apenas 75% da quantidade diária desse mesmo alimento.

3.2 Selênio

Descoberto pelo químico sueco J. J. Berzelius, em 1817, o elemento selênio (Se) é um calcogênio do grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro diferentes estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}) (LUCHESE, 2007).

Segundo Gierus (2007), a concentração de selênio em volumosos e concentrados é baixa, e sua ingestão através do conteúdo natural das plantas e componentes da dieta é insuficiente para atender a exigência nutricional deste elemento em qualquer fase durante a vida. Torna-se então indispensável, uma suplementação com misturas minerais contendo selênio.

Há evidências substanciais de que o selênio (Se) é um micronutriente que é essencial para o crescimento e desenvolvimento fetal (DOBZYNSKI, 1998). Níveis reduzidos de selênio, um elemento traço essencial para os seres humanos e animais, nas células e tecidos tem como consequência concentrações menores da enzima antioxidante glutatona peroxidase, resultando em maior suscetibilidade das

células e do organismo aos danos oxidativos induzidos pelas espécies reativas ao oxigênio (SCIESZKA et al., 1997).

A deficiência de selênio causa desordem reprodutiva em todas as espécies de animais estudadas e em ambos os sexos (LUBERDA, 2005). Kamada; Hodate (1998) constataram baixo teor de progesterona plasmática, que reduziu a concepção, aumentou a mortalidade de embriões, de abortos, aumentou retenção de placenta e causou distúrbios no ciclo estral.

Em fêmeas o selênio concentra-se nos ovários e exerce funções metabólicas, como função antioxidante: na formação dos oócitos e na maturação dos folículos que promovem a ovulação, pela ação da enzima glutathione peroxidase, que é vital para a proteção da membrana lipídica dos oócitos, para que não sofra peroxidação pelas espécies reativas ao oxigênio, que causam a ruptura da membrana e danos irreversíveis (CARVALHO et al., 2003).

A participação do selênio na fisiologia do útero é vital, pois a função antioxidante é fundamental para manter o ambiente uterino o mais sadio possível, para a passagem dos espermatozoides, na época do estro, e para receber o embrião e protegê-lo durante toda a gestação (BARBOSA; SOUZA, 2000).

Dentre os microminerais, acredita-se que o selênio atua especificamente na melhora da sobrevivência do embrião. Animais com deficiência de selênio podem ter suprimida a capacidade de defesa contra doenças infecciosas, que poderiam prejudicar a sobrevivência do embrião (ASHWORTH, 1995).

3.3 Vitamina E

Descoberta em 1922 por Evans e Bishop, a vitamina E é o nome genérico dos compostos do tocoferol. Há oito compostos naturais do tocoferol com características antioxidantes (DARCIE et al., 1997).

Os antioxidantes são substâncias que impedem ou reduzem a formação de radicais livres, que são espécies reativas ao oxigênio (EROs), isto ocorre através de uma reação de oxi-redução. Um dos antioxidantes mais utilizados na membrana é a vitamina E, que neutraliza as espécies reativas ao oxigênio, evitando assim dano celular, o qual ocasiona desarranjos metabólicos como, por exemplo, a inibição de atividades enzimáticas (SOUZA; FERREIRA, 2007).

A vitamina E (alfa-tocoferol e derivados), com predominância antioxidante lipossolúvel em células animais, protege as células das espécies reativas ao oxigênio *in vivo* e *in vitro*, e acredita-se ser o sequestrador de radicais livres primários das membranas celulares de mamíferos (SIKKA, 2004).

Os danos oxidativos podem ser inibidos pela ação antioxidante dessa vitamina, juntamente com a glutatona, a vitamina C e os carotenóides, constituindo um dos principais mecanismos da defesa endógena do organismo (RILEY, 1994). Burton et al. (1993) demonstraram que o tocoferol é um excelente estabilizador das espécies reativas ao oxigênio e o mais importante antioxidante lipossolúvel nas células dos mamíferos.

O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é frequentemente mencionado na literatura, mostrando que a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (GEY, 1998).

A vitamina E encontra-se em grande quantidade nos lipídeos, e evidências recentes sugerem que essa vitamina impede ou minimiza os danos provocados pelas espécies reativas ao oxigênio associados com doenças específicas. A vitamina E tem a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelas espécies reativas ao oxigênio nas membranas biológicas (TRABER; PACKER, 1995).

A vitamina E protege da oxidação os ácidos graxos polinsaturados, que são os constituintes primários das membranas celulares e precursores das prostaglandinas (inibindo a peroxidação do ácido araquidônico). Tem uma função coaguladora atuando na agregação das plaquetas e na formação das prostaglandinas. Estudos tem mostrado que os tocoferóis desempenham um papel importante na respiração celular e na síntese de DNA e coenzima Q (FAO, 2007).

3.4 Efeito da Vitamina E e do selênio nos processos reprodutivos

A influência da nutrição sobre o desempenho reprodutivo é um tema que tem gerado muito interesse entre os pesquisadores. Os mecanismos pelo quais, os nutrientes das dietas regulam os parâmetros reprodutivos são complexos, e não totalmente entendidos (ROBINSON, 1996).

Muitos estudos são conduzidos para obtenção de exigências nutricionais para coelhos, porém, com animais em crescimento. A falta de pesquisas de exigências

nutricionais, para animais em reprodução, tem como consequência a ausência de um plano de alimentação para matrizes e reprodutores que permitiria explorar mais racionalmente o potencial produtivo destes animais. As tabelas de exigências nutricionais, atualmente, ainda não trazem dados confiáveis de exigências nutricionais de reprodutores (SCAPINELLO et al., 1997).

Segundo Robinson et al. (2006), a influência da nutrição sobre a fertilidade, em fêmeas, pode ser direta ou indireta sobre os diversos processos reprodutivos.

Torna-se difícil determinar as funções específicas e mecanismos pelos quais a nutrição pode afetar as funções reprodutivas, pois especificamente, não existe nenhum nutriente requerido para a reprodução que não atue sobre outras funções fisiológicas normais do organismo (ROCHE; DISKIN, 1994). São vários os relatos da influência nutricional sobre o desempenho reprodutivo, mostrando a relação íntima entre fertilidade, condição corporal e estado nutricional nas fêmeas de ruminantes. Sabe-se, também, que a prática do “flushing” (incremento nutricional por curtos períodos antes da monta), extensamente utilizada para aumentar fertilidade, especialmente para animais com uma pobre condição corporal, tem sido associada a um aumento do desenvolvimento de folículos ovarianos e diminuição da porcentagem de folículos de atrésicos (ROBINSON, 1996).

Com isso, observa-se que o potencial reprodutivo é influenciado pelos nutrientes que são fornecidos na dieta, em um período curto de tempo ou em longo prazo (SCARAMUZZI; MURRAY, 1994).

Essa influência pode ser observada durante o crescimento folicular, que mesmo sendo controlado principalmente pelas gonadotrofinas e fatores de crescimento, as condições ambientais, ou seja, fatores externos, como a nutrição, podem ter influência sobre o seu desenvolvimento e a qualidade do oócito e, conseqüentemente, a fertilidade (WEBB et al., 2003).

Estudos mostram que o selênio é um antioxidante indireto por ser um microelemento que participa da composição da enzima antioxidante glutatona peroxidase, a qual contribui para a manutenção e estabilidade da membrana celular (SCIESZKA et al., 1997) em conjunto com a vitamina E, que é um antioxidante natural essencial direto (FAO, 2007).

Os efeitos antioxidantes do selênio e vitamina E podem reforçar um ao outro. O selênio age com a vitamina E para proteger as membranas das células e das organelas dos danos causados pelas espécies reativas ao oxigênio (MAHAM;

ESCOTT-STUMP, 1998). Esses efeitos são desejáveis, principalmente quando há manipulação de tecidos *in vitro*, já que esta promove um maior estresse oxidativo nas células.

Segundo Kefer et al. (2009) a vitamina E protege o embrião dos danos que podem ser causados por mudanças bruscas de temperatura e exerce uma função de suma importância na proteção das membranas das células, contra o dano oxidativo, atuando na captura e eliminação de espécies reativas ao oxigênio.

Segundo Hemingway (2003) o selênio também desempenha funções importantes sobre os processos reprodutivos, pois nesse estudo a suplementação com selênio antes do acasalamento aumentou a taxa de concepção em ovelhas por meio do aumento da motilidade espermática e redução da mortalidade embrionária.

Estudos comprovam que o selênio pode reduzir a mortalidade embrionária (HEMINGWAY, 2003), a vitamina E também desempenha uma função importante na maturação e desenvolvimento do oócito, e a insuficiência desta vitamina pode causar maior número de absorção fetal no período embrionário (SONMEZ et al., 2008).

Segundo Kamada; Hodate (1997), a adição de selênio na cultura de células luteais aumenta a concentração média de progesterona. Este efeito foi causado por uma diminuição da enzima lipídeo peroxidase nas células. Desta forma, sugere que o selênio elimina as espécies reativas ao oxigênio dando suporte para o corpo lúteo manter a sua função. Assim como a vitamina E é um antioxidante importante na proteção das células contra danos oxidativos induzidos pelas espécies reativas ao oxigênio (CHOW, 1991).

A importância de proteger os embriões do estresse oxidativo *in vitro* está sendo cada vez mais conhecida, pois quando os oócitos e embriões são removidos de seu ambiente natural para realização de técnicas de reprodução assistida, o sistema de defesa natural fica ineficaz (WANG et al., 2002). Com isso, torna-se viável uma suplementação com vitamina E e selênio para avaliar seus efeitos antioxidantes sobre a qualidade embrionária de coelhas.

3.5 Criopreservação de embriões

O processo de criopreservação é de suma importância para o comércio internacional de embriões, já que para estes serem comercializados precisam ser armazenados em baixas temperaturas. (MAPLETOFT; STOOKEY, 1998).

A criopreservação de embriões é amplamente utilizada na área de biotecnologia de animais domésticos permitindo o armazenamento de materiais biológicos por tempo indeterminado sem que estes percam a sua atividade funcional e sem que ocorra alteração genética. Os dois métodos de criopreservação mais amplamente utilizados são o congelamento tradicional e a vitrificação (BERTHELOT et al., 2003).

O método convencional, no qual se utiliza baixas concentrações de crioprotetores com lenta permeabilidade e refrigeração controlada por equipamento de congelamento programável, é o mais utilizado para criopreservação da maioria dos embriões de mamíferos (VAJTA; NAGY, 2006).

Segundo Lopez-Bejar et al. (1994), o sucesso no processo de criopreservação da célula depende da velocidade do congelamento e da composição da solução onde as células são congeladas. Inicialmente, a água extracelular congela, no momento em que a célula se aproxima do ponto de congelamento, removendo o líquido extracelular, fato que acarreta um aumento de osmolaridade. Com esse desequilíbrio osmótico, a água é retirada da célula para o compartimento extracelular, ocasionando uma diminuição do volume celular. Uma adequada desidratação celular depende da velocidade do congelamento de forma a não provocar uma lise da célula. Se o congelamento for muito lento, o equilíbrio permanecerá constante e a célula ficará exposta ao crioprotetor e ao estresse osmótico por tempo prolongado, fato que poderá acarretar a morte celular. Ao contrário, no caso de congelamento muito rápido, a desidratação será insuficiente e causará a formação de gelo intracelular ocasionando a lise da célula na ocasião do descongelamento.

São adicionados crioprotetores ao meio de criopreservação visando o aumento da viscosidade da solução e maior equilíbrio osmótico entre solução e material biológico. Estas substâncias têm baixo peso molecular e são usadas com o intuito de impedir injúrias às células referentes à formação de cristais de gelo e ao choque osmótico. Para não acarretar danos as células, mesmo com uma velocidade de descongelamento controlada, há necessidade da utilização de crioprotetores. O emprego dos crioprotetores tem como objetivo melhorar a taxa de sobrevivência das

células durante o processo de congelamento e descongelamento. (VAJTA; NAGY, 2006).

Os crioprotetores podem permanecer no interior da célula ou fora dela, são divididos então em duas categorias: permeáveis e não permeáveis. Os primeiros correspondem a pequenas moléculas que penetram pela membrana celular, formam pontes de hidrogênio com moléculas de água intracelulares e diminuem a temperatura de congelação, prevenindo a formação dos cristais de gelo. Como exemplos, têm-se o propilenoglicol, glicerol, etilenoglicol, dimetilssulfóxido (DMSO), entre outros. Os crioprotetores não permeáveis permanecem no meio extracelular, retirando a água livre e levando à desidratação do espaço intracelular por efeito osmótico (VAJTA; NAGY, 2006).

As funções desempenhadas pelos crioprotetores são complexas, contudo, admite-se que uma das principais seria diminuir o ponto de congelamento da solução (VAN DER ELST et al., 1995).

Frequentemente, os crioprotetores são tóxicos para as células. Estudos com criopreservação de embriões mostram que sua susceptibilidade a crioinjúrias varia de acordo com o estágio de desenvolvimento, espécie e origem do embrião, também relatam a interferência do tipo e da concentração do crioprotetor, relacionando-os à embriotoxicidade e permeabilidade celular (BARIL et al., 2001).

Devido à produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROs), o processo de criopreservação pode afetar a estrutura e o metabolismo celular comprometendo a sobrevivência celular pós-descongelação. Na tentativa de minimizar e/ou eliminar os possíveis danos provocados pela produção de EROs durante a criopreservação, alguns autores têm testado a adição de agentes antioxidantes ao meio de congelação (TIRELLI et al., 2005).

4 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação via oral de vitamina E e/ou selênio no número e na qualidade de embriões antes e após criopreservação, de coelhas superovuladas.

Objetivos específicos

Avaliar o efeito da suplementação via oral com vitamina E e/ou selênio no número de estruturas recuperadas, na qualidade morfológica dos embriões viáveis, na resistência frente ao processo de criopreservação de embriões de coelhas superovuladas.

5 METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Setor de Cunicultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em Cruz das Almas – BA, no período de março à julho de 2012. Foram utilizadas 24 coelhas (*Oryctolagus cuniculus*) pluríparas da raça Nova Zelândia. Os animais foram alojados em gaiolas suspensas de arame galvanizado, providas de bebedouros e comedouros, recebendo água, rami (*Boehmeria nivea*) e ração comercial *ad libitum*.

As fêmeas foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, em quatro grupos (G) com 6 repetições cada, sendo G1: composto por fêmeas superovuladas sem suplementação com vitamina E e selênio, G2: composto por fêmeas superovuladas com suplementação de 4,8mg de vitamina E (LOWE, 1998), G3: composto por fêmeas superovuladas com suplementação de 0,006mg de selênio, segundo dose sugerida para reprodução pelo Manual de formulação de ração e suplementos para coelhos (MACHADO et. al., 2011) e G4: composto por fêmeas superovuladas com suplementação de 4,8mg de vitamina E e 0,006mg de selênio.

A suplementação foi feita via oral, diariamente, por um período de 28 dias, antes do tratamento superovulatório, sempre às 6 horas da manhã. A administração foi feita com o auxílio de uma seringa desprovida de agulha, os animais do grupo controle receberam água via oral, com o objetivo de serem submetidos ao mesmo grau de manipulação dos animais tratados (Figura 1).

O protocolo superovulatório consistiu da aplicação de uma única dose de 40 Unidades Internacionais (UI) de gonadotrofina coriônica equina (eCG), via intramuscular, seguida da aplicação intramuscular de 40UI de gonadotrofina

coriônica humana (hCG) (Figura 2), 48h após, e logo em seguida as coelhas foram submetidas à cobertura natural, utilizando uma proporção macho:fêmea de 1:1.



Figura 1. Suplementação.



Figura 2. Superovulação.

Para coleta dos embriões, os animais foram pesados e eutanasiados 72 horas após as coberturas, utilizando 1,5mL de ketamina, 0,6mL de xilazina e 0,6mL de acepromazina por via IM, seguindo-se a aplicação de 1,7mL de cloreto de potássio por via IV, segundo o Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV). Após eutanásia dos animais foi retirado o aparelho genital, com pesagem dos ovários, para posterior cálculo do índice gonadossomático. Os ovários foram levados ao estereomicroscópio, para contagem do número de folículos e de corpos lúteos presentes.

Os cornos uterinos foram lavados com meio Dulbecco modificado (PBS), aquecido a 37°C e enriquecido com BSA 0,4%. O mesmo foi introduzido com o auxílio de um escalpe número 08. Foram realizadas duas lavagens por corno uterino com, aproximadamente, 10 mL de meio/lavagem/corno. Os cornos uterinos foram levemente massageados e o efluente foi recolhido em placas de Petri quadriculadas (Figura 3).

Após este procedimento, os embriões foram identificados e classificados com o auxílio de um estereomicroscópio (10X a 40X), quanto ao estágio de desenvolvimento e quanto ao aspecto morfológico (Figura 4), segundo a classificação proposta pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1999). Foi calculada a taxa de recuperação embrionária: $[(\text{número de estruturas coletadas}/\text{número de corpos lúteos totais}) \times 100]$, segundo Boiti et al. (1996).



Figura 3. Lavagem uterina.

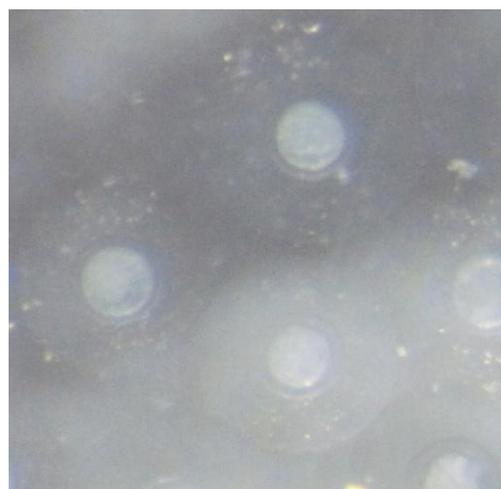


Figura 4. Embriões.

Após avaliação morfológica, os embriões denominados de Grau I e II foram lavados utilizando meio de manutenção Holding®, passando-se por cinco lavagens sucessivas. Utilizando-se o método convencional de envase em palhetas francesas de 0,25 mL, os embriões foram levados para o meio de criopreservação, contendo 1,4 M de etilenoglicol, em duas passagens seriadas, de no máximo 15 minutos e envasados. Após aquecer as extremidades das palhetas selando-as, estas foram encaminhadas para máquina de congelação TK300, utilizando uma curva saindo da temperatura ambiente até -6°C , com permanência nessa temperatura durante 10 minutos para realização da cristalização, com uma segunda rampa com velocidade de $0,5^{\circ}\text{C}$ por minuto até alcançar a temperatura de -32°C , estabilização por 5 minutos e depois mergulhados em nitrogênio líquido.

Após criopreservação os embriões foram descongelados em banho-maria à temperatura de 37°C por 30 segundos, transferidos para o meio de manutenção Holding® e avaliados novamente quanto a qualidade morfológica, segundo as normas preconizadas pela IETS (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1999).

Foram realizadas mensurações bioclimáticas diariamente durante o período de suplementação (Figura 5), utilizando termômetro digital de ambiente (Supermedy®, São Paulo, SP, Brasil) e termo-higro-anemômetro luxímetro digital modelo THAL-300®.

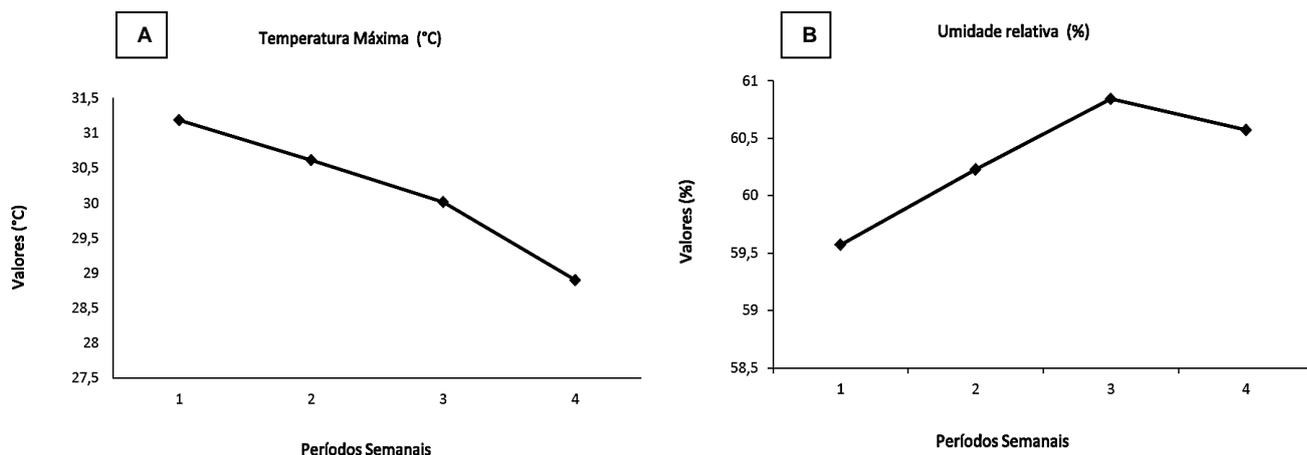


Figura 5. (A) Temperatura máxima (°C) e (B) Umidade relativa do ar (%) durante o período de suplementação.

Os dados foram avaliados por ANOVA e foi feito o teste de comparação de médias Tukey com o programa SISVAR versão 5.1 1999 - 2007.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para peso do ovário direito, peso do ovário esquerdo e índice gonadossomático (IGS), isso mostra que o percentual de massa corporal alocado nos ovários foi similar entre os quatro grupos (Tabela 1). O IGS corresponde à proporção do peso corporal alocada em ambos os ovários, sendo um dado que corrobora para a observação da influencia da vitamina E e do selênio sobre o aparelho genital das fêmeas. Nos quatro grupos o valor médio encontrado para o IGS foi de 0,02%.

Para resposta superovulatória não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos, por meio das avaliações do número total de folículos, de corpos lúteos, de estruturas totais recuperadas, taxa de recuperação embrionária, do número de embriões viáveis e do número de embriões degenerados (Tabela 1).

O número médio de folículos encontrado nos ovários das coelhas superovuladas foi de 18,77; 23,93 corpos lúteos totais e taxa de recuperação média de 55,23%, enquanto Andreazzi et al. (2006), em seu trabalho observaram uma

média de 2,0 folículos no ovário direito e 3,1 no ovário esquerdo; 11,7 corpos lúteos no ovário direito e 11,6 no ovário esquerdo, e a taxa de recuperação de 38%, para coelhas Nova Zelândia que também foram superovuladas com 40 UI de eCG.

Os valores médios de estruturas totais, embriões viáveis e embriões degenerados encontrados para os quatro grupos foi de 13,1; 12,39; 0,74 respectivamente, foram superiores as médias apresentadas pela pesquisa de Andreazzi et al. (2006) que encontraram valores médios de 8,9; 7,8 para estruturas totais e embriões viáveis, respectivamente e inferior ao valor médio encontrado para embriões degenerados que foi de 0,8.

Tabela 1. Resposta superovulatória e viabilidade embrionária de coelhas suplementadas com vitamina E e/ou selênio por via oral

Parâmetro	G1	G2	G3	G4
Peso OD (g)	0,24±0,10	0,24±0,13	0,21±0,12	0,21±0,07
Peso OE (g)	0,22±0,11	0,26±0,13	0,18±0,12	0,24±0,09
IGS (%)	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01
Número de folículos	24,17±11,57	17,17±4,45	10,07±4,44	23,67±12,29
Número de CL	31,17±13,41	23,83±5,34	16,39±5,77	24,33±10,56
Taxa de recuperação (%)	61,64±29,88	51,57±29,54	56,37±24,37	51,34±31,43
Número de estruturas recuperadas	16,17±4,12	12,83±8,40	10,73±4,87	12,67±10,11
Número de embriões viáveis	15,50±4,68	12,50±8,53	9,92±6,65	11,67±9,27
Número de embriões degenerados	0,67±1,21	0,33±0,82	0,97±2,24	1,00±1,55

G1= sem suplementação de vitamina E e selênio; G2= com suplementação de 4,8mg de vitamina E; G3= com suplementação de 0,006mg de selênio; G4= com suplementação de 4,8mg de vitamina E e 0,006mg de selênio.

OD= ovário direito, OE= ovário esquerdo, IGS= índice gonadossomático, CL = corpo lúteo.

Foi encontrada diferença significativa ($P < 0,05$) para classificação morfológica embrionária, sendo que o grupo 1 (fêmeas superovuladas sem administração de vitamina E e selênio) apresentou um valor médio de 13,33±5,01 mórulas, valor este superior aos apresentados para os demais grupos, sendo estes 4,00±3,85, 2,81±2,61, 2,67±2,94, para os grupos 2, 3 e 4, respectivamente (Tabela 2). Isso mostra que as fêmeas que receberam suplementação de vitamina E (G2), de selênio (G3) e de vitamina E e selênio (G4) apresentaram embriões com estágio de

desenvolvimento diferenciado se comparado as coelhas do grupo controle (G1). Não houve diferença significativa ($P>0,05$), para os valores encontrados para mórula compacta, blastocisto, blastocisto inicial e blastocisto expandido (Tabela 2).

Tabela 2. Estádio do desenvolvimento embrionário de coelhas suplementadas com vitamina E e/ou selênio por via oral

Parâmetro	G1	G2	G3	G4
Mórula	13,33±5,01a	4,00±3,85b	2,81±2,61b	2,67±2,94b
Mórula compacta	2,00±2,10	6,50±7,69	5,61±4,87	7,83±8,40
Blastocisto	0,00±0,00	0,83±2,04	1,34±1,79	0,50±1,22
Blastocisto inicial	0,17±0,41	0,33±0,82	0,80±0,84	0,67±1,21
Blastocisto expandido	0,00±0,00	0,83±2,04	0,51±0,45	0,00±0,00

G1= sem suplementação de vitamina E e selênio; G2= com suplementação de 4,8mg de vitamina E; G3= com suplementação de 0,006mg de selênio; G4= com suplementação de 4,8mg de vitamina E e 0,006mg de selênio

Médias seguidas por letras diferentes em uma mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Não foi encontrada diferença significativa ($P>0,05$) nos valores apresentados quanto ao aspecto morfológico, segundo a classificação proposta pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1999) para embriões grau I, II e III antes e após o processo de criopreservação (Tabela 3).

Tabela 3. Qualidade morfológica embrionária antes e após a criopreservação obtidas de coelhas suplementadas com vitamina E e/ou selênio por via oral

Antes da criopreservação	G1	G2	G3	G4
Embriões Grau I	8,67±4,68	11,33±9,40	7,90±4,98	7,17±5,27
Embriões Grau II	4,00±3,29	1,00±1,26	2,04±2,86	3,00±3,22
Embriões Grau III	2,83±3,06	0,17±0,41	0,40±0,55	1,50±2,81
Após a criopreservação	G1	G2	G3	G4
Embriões Grau I	4,17±3,37	3,33±3,67	4,25±3,10	4,00±5,52
Embriões Grau II	5,33±4,41	3,33±2,07	4,00±3,16	3,80±4,92
Embriões Grau III	4,33±3,61	2,83±2,32	2,25±2,63	2,40±2,88
Embriões degenerados	2,17±2,23	3,00±3,22	2,2±4,50	3,80±4,15

G1= sem suplementação de vitamina E e selênio; G2= com suplementação de 4,8mg de vitamina E; G3= com suplementação de 0,006mg de selênio; G4= com suplementação de 4,8mg de vitamina E e 0,006mg de selênio.

Esperava-se que a suplementação com selênio, que é um micromineral antioxidante, que atua especificamente na melhora da sobrevivência embrionária (ASHWORTH, 1995); e/ou da vitamina E, antioxidante lipossolúvel que protege as células das espécies reativas ao oxigênio *in vivo* e *in vitro*, e acredita-se ser o sequestrador destas nas membranas celulares de mamíferos (SIKKA, 2004); houvesse uma melhora na resistência dos embriões frente ao processo de manipulação e criopreservação.

O selênio age com a vitamina E para proteger as membranas e organelas celulares de danos oxidativos (MAHAM; ESCOTT-STUMP, 1998). Contudo, as dosagens utilizadas ainda não são padronizadas e definidas para as diversas espécies animais, para avaliar seus efeitos nos processos reprodutivos, sendo assim, a vitamina E e o selênio, nas doses de 4,8 mg e 0,006mg, respectivamente, não influencia na qualidade embrionária de coelhas Nova Zelândia, nas condições deste trabalho.

Não foram encontrados, na literatura, dados a respeito da administração, via oral, de vitamina E e selênio e seus resultados sobre os parâmetros reprodutivos, incluindo resposta superovulatória e qualidade embrionária antes e após o processo de criopreservação em coelhas.

7 CONCLUSÃO

Desta forma, conclui-se que a suplementação de 4,8mg de vitamina E e/ou 0,006mg de selênio, durante 28 dias antes do processo superovulatório, não influenciou na resposta superovulatória e na qualidade embrionária antes e após o processo de criopreservação de embriões de coelhas Nova Zelândia.

REFERÊNCIAS

- ANDREAZZI, M.A.; RIGOLON, L.P.; CAVALIERI, F.L.B.; SCAPINELLO, C.; MORAES, G.V.; FARIA, H.G. Superovulação em coelhas alimentadas com ração, contendo diferentes fontes de óleos vegetais. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. v.28, p.295-300, 2006.
- ASHWORTH, C. J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Liv. Prod. Sci, Foulun, Denmark*, v. 4, p. 99 – 105, 1995.
- BAKKER, J.; BAUM, M.J. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.21, p.220-262, 2000.
- BARBOSA, P. A.; SOUZA, G. M. **Influência dos principais microminerais na reprodução de bovinos**. Belo Horizonte, MG. 2000. Disponível em: <<http://rehagro.com.br/corte/>>. Acesso em: 20 ago. 2012.
- BARIL, G.; TRALDI, AL.; COGNIÉ, Y.; LEBEOUF, B.; BECKERS, J.F.; MERMILLOD, P. **Successful direct transfer of vitrified sheep embryos**. *Theriogenology*, 2001.
- BERTHELOT, M.; P. CIAIS, P.; FRIEDLINGSTEIN, J-L.; DUFRESNE, AND P. MONFRAY. How uncertainties in future climate change predictions translate into future terrestrial carbon fluxes. *Global Change Biology*, 2003.
- BOITI, C. et al. Effect of postpartum progesterone levels on receptivity ovarian response, embryo quality and development in rabbits. *In: WORLD CONGRESS OF ANIMAL FEEDING*, 6., 1996, Toulouse. *Proceedings...* Toulouse: ACAF. p. 45-49, 1996.
- BURTON G. W - **Antioxidants mechanisms of vitamin E and β - Carotene**. From basic science to medicine. Poli G, Albano E, Dianzana UM (eds). Switzerland. Birkhäuser Verlag Basel, 1993.
- CAILLOL, M.; DAUPHIN-VILLEMANT, C.; MARTINET, L. Oestrous behaviour and circulating progesterone and oestrogen levels during pseudopregnancy in the domestic rabbit. *J. Reprod Fertil*;69:179-186, 1983.
- CARVALHO, F. A. N.; BARBOSA, F. A.; McDOWELL, L. R. **Nutrição de bovinos a pasto**. Belo Horizonte: Papelform, 438p, 2003.
- CHOW, C. K. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, v.11, p.215-232, 1991.
- CORRÊA, G. A. Tensão de oxigênio durante o cultivo in vitro de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo. Dissertação de Mestrado Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, 61 p.

- DARCIE, S.; SANTOS, E.; D.VINAGRE, R.; VAZ, F. A. C. **Revisões e Ensaio Reviews and Essays**. Vitaminas lipossolúveis no suporte nutricional do recém-nascido pré-termo de muito baixo peso. *Pediatria (São Paulo)*, 19, p. 195-206, 1997.
- DOBRZYNSKI, W.; TRAFIKOWSKA, U; TRAFIKOWSKA, A.; PILECKI, A.; SZYMANSKI, W.; ZACHARA, B. A. Decreased selenium concentration in maternal and cord blood in preterm compared with term delivery. *Analyst*, 7:93-123; 1998.
- FAO. **Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados**: Manual de capacitação. Roma, Itália, 2007.
- FEUSSNER I, KINDL H. **A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization**. *FEBS Letters*. 298:223–225; 1992.
- GEY, K.F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. *Biofactors, Oxford*, v.7, n.1/ 2, p.113-174, 1998.
- GIERUS, M. Fontes quelatadas e inquelatadas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. *Ciência Rural*, v. 37, n. 4, p. 1212-1220, 2007.
- HEMINGWAY, R. G. **The Influences of Dietary Intakes and Supplementation With Selenium and Vitamin E on Reproduction Diseases and Reproduction Diseases and Reproductive Efficiency in Cattle and Sheep**. *Vet. Res. Commun.*, v. 27, p.159-174, 2003.
- IETS – International Embryo Transfer Society. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3 ed. Sovay, Illinois: International Embryo Transfer Society, Inc. 1998., 180 p. Traduzida de: International Embryo Transfer Society, 1998.
- KAMADA, H., HODATE, K. Effect of Dietary Selenium Supplementation on the Plasma Progesterone Concentration in cows, *J. Vet. Med. Sci.* v. 60, p. 133-135, 1997.
- KEFER, J.C.; AGARWAL, A.; SABANEHGH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility, *Int. J. Androl.*, v. 16, p. 449-457, 2009.
- LEBAS F., COUDERT P., ROUVIER, R. De Rochambeau H. Reproduction In: **The rabbit husbandry, health and production** FAO, Rome;Chapter 3, 1986.
- LOPEZ-BEJAR, M.; LOPEZ-GATIUS, F.; CAMON, J.; RUTLLANT, J.; LABERNIA, J. Development in vitro of rabbit embryos after freezing by two-step or ultra-rapid cooling methods. *Zentralbl Veterinarmed*, v. 41, p. 780-790, 1994.
- LOWE, J.A. Fibre digestion. In C. Blas; J. Wiseman (Eds), *The nutrition of the Rabbit*. (309-331). Wallingford: CABI Publishing, 1998.
- LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol.*, Olsztyn, Poland, v. 5, n. 1, p. 5 – 17, 2005.

- LUCHESE, C. Efeito do cádmio sobre a enzima $\delta\delta\delta$ -aminolevulinato desidratase de pulmão de ratos in vitro: interação com agentes quelantes e antioxidantes. Dissertação de Mestrado Santa Maria, RS, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria, 60 p., 2007.
- MACHADO, L. C.; FERREIRA, W. M.; SCAPINELLO, C.; PADILHA, M. T. S.; EULER, A. C. C. **Manual de formulação de ração e suplementos para coelhos**. Bambuí : Ed. do Autor. 24 f, 2011.
- MAHAM, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Krause: Alimentos, **Nutrição & Dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Editora Roca, 1998.
- MAPLETOFT R. J., STOOKEY J. M. Procedimentos sanitários gerais e considerações de bem estar associados com a produção in vivo de embriões. In: **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed. Champaign, IL: IETS.1998, 180p.
- MORRELL, J.M. Artificial insemination in rabbits. **Br. Vet. J.**151:477-487; 1995.
- RILEY, P.A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 65, n.1, p. 27-33, 1994.
- ROBINSON JJ. Nutrition and reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 25–34, 1996.
- ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; MITCHELL, L.M.; MCEVOY, T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, p. 259–276, 2006.
- ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. Hormonal regulation of reproduction and interactions with nutrition in female ruminants. In: **Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology**, September 1994, Willengen, Germany, 1994.
- ROMMERS, J. M., B. KEMP, R. MEIJERHOF, AND J. P. T. M. NOORDHUIZEN. The effect of litter size before weaning on subsequent body development, feed intake, and reproductive performance of young rabbit does. **J. Anim. Sci.** 79:1973–1982, 2001.
- SCAPINELLO, C.; MORAES, G. V.; SOUZA, M. L. R.; ANDREAZZI, M. A.; ANTUNES, E. B. Influência de diferentes níveis de metionina+cistina sobre a produção de sêmen de coelhos nova zelândia branco. **Revista Unimar**, 19, 1997.
- SCARAMUZZI R. J.; MURRAY J. F. The nutrient requirements for the optimum production of gametes in assisted reproduction in ruminant animals. **X° Réunion A.E.T.E.** 1069-10 September 1994 - Lion (France), 85-103, 1994.
- SCIESZKA, M.; DANCH, A.; MACHALSKI, M.; DROZDZ, M. Plasma selenium concentration in patients with stomach and colon cancer in the Upper Silesia. **Neoplasma Bratislava**, v. 44, n. 6, p. 395-397, 1997.

SIKKA S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **J Androl**, v.25, p.5-18, 2004.

SONMEZ, M.; BOZKURT, T.; TURK, G.; GUR, S.; KIZIL, M.; YUCE, A. The effect of vitamin E treatment during preovulatory period on reproductive performance of goats following estrus synchronization using intravaginal sponges. **Anim. Reprod. Sci.** v. 10. p. 1016, 2008.

SOUZA, J. D. S; FERREIRA, W. M. O papel da vitamina E na nutrição e reprodução animal- meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 4, n° 3, p. 456-461, Maio/Junho 2007. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/045V4N3P456_461_MAI2007.pdf/>. Acesso em: 20 ago. 2012.

SMITH, O. B.; AKINBAMIJO, O. O. Micronutrients and reproduction in farm animals. **Animal Reproduction Science**, p. 540-560, 2000.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS)**. 3. ed. 1999.

TIRELLI M., BASINI G., GRASSELLI F., BIANCO F. & TAMANINI C. Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 28, p. 17-33, 2005.

TRABER, M. G.; PACKER, L. Vitamin E - beyond antioxidant function. **Journal of Clinical Nutrition** 62,1501–1509, 1995.

VAJTA G, NAGY Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v. 12, p. 779-796, 2006.

VAN DER ELST, J.; CAMUS, M.; VAN DEN ABBEEL, E.; MAES, R.; DEVROEY, P; VAN STEIRTEGHEM, A.C. - Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1,2-propanediol protocols. **Fertil. Steril.**, v. 63, p. 92-100, 1995.

VAN NIEKERK, F. E. et al. The effect of selenium supplementation during the early post-mating period on embryonic survival in sheep. **J. of the South African Vet. Assoc.**, v. 67, n. 4, p. 209-213, 1996.

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. **Fertil. Steril.**, v. 78, n. 6, p. 1272-1277, 2002.

WEBB, R., NICHOLAS, B., GONG, J.G., CAMPBELL, B.K., GUTIERREZ, C.G., GARVERICK, H.A., ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction** v. 61, p. 71–90, 2003.