

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ASPIRAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN*  
*VITRO* DE VACAS JERSEY SUPLEMENTADAS COM SELÊNIO

Autor: Jefferson Ruela de Azevedo  
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Janeiro – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ASPIRAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO* DE VACAS JERSEY SUPLEMENTADAS COM SELÊNIO

Autor: Jefferson Ruela de Azevedo  
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
janeiro – 2008

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida;

Aos meus pais e irmãos, João Nelson, Rita, Marjorie e João Nelson Jr.;

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes;

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Luis Paulo Rigolon;

Ao Prof. Dr. Fabio Luis Bim Cavalieri;

Ao Biotec e ao Cesumar, por ter contribuído com o Laboratório de Produção *in vitro* de Embriões;

Aos colegas Marcio Tiburcio, Isabele, Milena, Thaís e Marcela;

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e CCA;

À Fazenda Experimental de Iguatemi, em especial ao Coordenador Amauri e ao Vicente Faleiros, que viabilizou o experimento;

À Thais, que esteve presente em todos os momentos, ajudando, aprendendo, ensinando;

Ao amigo Gustavo de Arruda Bezerra;

Ao amigo e Prof. Dr. Selwin Arlington Headley;

À Potensal, por ter cedido o sal mineral com diferentes teores de Se;

Aos professores que contribuíram para meu crescimento acadêmico.

## BIOGRAFIA

Jefferson Ruela de Azevedo, filho de João Nelson de Azevedo e Rita de Cássia Ruela de Azevedo, nascido na cidade de Londrina – PR, em 26 de agosto de 1978. Graduou-se em Medicina Veterinária em 2004, pelo Centro Universitário de Maringá (Cesumar). Atualmente, é aluno do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá e trabalha na área de Biotecnologia da Reprodução.

## ÍNDICE

|  | Página |
|--|--------|
| LISTA DE TABELAS .....   | v      |
| RESUMO .....   | vi     |
| ABSTRACT .....   | viii   |
| I - INTRODUÇÃO .....   | 1      |
| 1.1. Introdução Geral .....  | 1      |
| II – ASPIRAÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i> DE VACAS JERSEY SUPLEMENTADAS COM SELÊNIO NA DIETA..... | 8      |
| Resumo .....   | 8      |
| Abstract .....   | 9      |
| Introdução .....   | 10     |
| Material e Métodos .....   | 12     |
| Locais e animais .....   | 12     |
| Tratamentos e alimentação .....  | 12     |
| Colheita de oócitos e produção <i>in vitro</i> .....   | 14     |
| Amostragens de sangue, líquido folicular e alimentos para análise de Selênio .....                                       | 15     |
| Delineamento .....   | 15     |
| Resultados e Discussão .....   | 17     |
| Conclusões .....   | 21     |
| Referências .....  | 22     |

## LISTA DE TABELAS

|   | Página |
|---|--------|
| TABELA 1. Alimentos fornecidos diariamente, em kg, durante o período experimental .....   | 13     |
| TABELA 2. Composição bromatológica do concentrado utilizado .....   | 13     |
| TABELA 3. Composição química do sal mineral utilizado .....   | 13     |
| TABELA 4. Resultado médio estimado por aspiração folicular de vacas Jersey (n=5) suplementadas com 3,2 mg / dia / animal e 9,6 mg / dia / animal de selênio e o desvio-padrão .....   | 17     |
| TABELA 5. Resultado médio estimado da produção <i>in vitro</i> de embriões, por aspiração folicular de vacas Jersey (n=5) suplementadas com 3,2 mg / dia / animal e 9,6 mg / dia / animal de selênio e o desvio-padrão .....                            | 19     |
| TABELA 6. Resultado médio da análise de concentração de selênio no plasma no início e no final do experimento e no líquido folicular de vacas Jersey suplementadas com 3,2 mg / dia / animal e 9,6 mg / dia / animal de selênio, durante 119 dias ..... | 20     |
| TABELA 7. Concentração inicial e final média de selênio no soro de vacas Jersey suplementadas com 9,6 mg / dia / animal de selênio durante 119 dias.....  | 20     |

## RESUMO

O trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a influência do selênio (Se) adicional na dieta de doadoras de oócitos e na produção de embriões *in vitro*. Dez vacas Jersey foram divididas, aleatoriamente, em grupos controle (GC) e tratamento (GT), recebendo a mesma dieta, diferindo apenas na concentração de Se contida no sal mineral. O GC recebeu 3,2 mg de Se / vaca / dia e o GT 9,6 mg de Se / vaca / dia. Decorridos 20 dias do início do tratamento, foi realizada a primeira aspiração folicular guiada por ultra-sonografia (AF), que foi desprezada. Em continuidade a esta, foram realizadas mais cinco AFs, com intervalo médio de 15 dias. Os oócitos foram classificados em qualidade I, II, III, expandido, desnudo, atrésico ou degenerado. A produção *in vitro* de embriões foi realizada no laboratório Biotec – Cesumar, conforme rotina padrão e avaliados no sétimo dia após a fecundação *in vitro*. Durante os 119 dias de experimento, os animais apresentaram ganho de peso médio de  $49,9 \pm 13,47$  kg / vaca. A média de oócitos totais ( $35,11 \pm 2,65$ ) e a média de oócitos qualidade I ( $11,61 \pm 1,58$ ) colhidos foram maiores no GT ( $P < 0,05$ ) em comparação com o GC ( $23,10 \pm 2,16$  e  $4,75 \pm 0,97$ , respectivamente). A quantidade de oócitos desnudo foi inferior ( $3,24 \pm 0,87$ ) no GT ( $P < 0,05$ ), mas o número de estruturas atrésicas ( $10,68 \pm 1,62$ ) e inviáveis totais ( $11,23 \pm 1,65$ ) foi superior no GT ( $P < 0,05$ ). A produção *in vitro* de embriões totais e blastocistos expandidos foi superior ( $21,98 \pm 2,37$  e  $10,95 \pm 1,64$ , respectivamente) no GT ( $P < 0,05$ ) em relação ao GC ( $13,12 \pm 1,59$  e  $6,64 \pm 1,15$ ). A quantidade de blastocisto inicial e blastocisto não diferiu entre os dois grupos ( $P > 0,05$ ). Assim, conclui-se que a maior adição de Se à dieta resultou em maior produção de oócitos, maior quantidade de oócitos de grau I e maior produção de embriões no

processo de fecundação *in vitro*, recomendando a utilização de 9,6 mg de Se / dia / vaca doadoras de oócitos.

**Palavras-chave:** biotecnologia, glutatona, radicais livres, reprodução, ultra-som



## ABSTRACT

The study was carried out to evaluate the influence of the additional selenium (Se) in oocytes donors' diet and in the *in vitro* embryos production. Ten Jersey cows were divided, randomly, in control groups (CG) and treatment (TR), receiving the same diet that only differed by the Se concentration in mineral salt. The CG received 3.2 mg of Se/cow/day and TR received 9.6 mg/cow/day. After 20 days from the treatment beginning, it was done the first follicular aspiration driven by ultrasound (US) that was discarded. Following this, it was done more five US with an average of 15 days. The oocytes were then classified in I, II and III quality, expanded, naked, atresic or degenerated. The *in vitro* embryos production was done in the BIOTEC – CESUMAR laboratory, according to standard routine and then evaluated in the seventh day after *in vitro* fertilization. During the experimental period (119 days) the animals had an average weight gain of  $49.9 \pm 13.47$  kg/cow. The average of total oocytes ( $35.11 \pm 2.65$ ) and quality I oocytes ( $11.61 \pm 1.58$ ) were higher in the TR ( $P < 0.05$ ) than CG ( $23.10 \pm 2.16$  and  $4.75 \pm 0.97$ , respectively). The amount of naked oocytes was lower ( $3.24 \pm 0.87$ ) in the TR ( $P < 0.05$ ) while the atresic structure number ( $10.68 \pm 1.62$ ) and total unviable ( $11.23 \pm 1.65$ ) were higher ( $P < 0.05$ ). The total production of *in vitro* embryos and expanded blastocyst were higher ( $21.98 \pm 2.37$  and  $10.95 \pm 1.64$ , respectively) in TR ( $P < 0.05$ ), when compared with CG ( $13.12 \pm 1.59$  and  $6.64 \pm 1.15$ ). The amount of initial blastocyst and blastocyst did not differ between the two groups ( $P > 0.05$ ). In accordance to the conditions in which the study was developed it is possible to conclude that the higher Se addition to diet resulted in higher oocytes production, higher quantity

of degree I oocytes I and higher embryos production in the process of *in vitro* fertilization, recommending the use of 9.6 mg of Se/ day per cows donor of oocytes.

**key words:** biotechnology, glutathione, reproduction, free radicals, ultrasound

## I - INTRODUÇÃO

O Selênio (Se) foi descoberto em 1817 por John Jacob Berzelius e, por analogia ao telúrio, que deriva *tellus*, que quer dizer terra, o Se recebeu esse nome que deriva de *selene* (grego), que quer dizer lua (ORTOLANI, 2002). No entanto, FRANK (1934), citado por ORTOLANI (2002), foi quem relacionou o Se com função biológica, ao constatar um tipo de claudicação, em eqüinos, resultante da intoxicação por Se. SCHWARZ & FOLTZ (1957) descreveram, pela primeira vez, a necrose hepática, em ratos, e a miopatia, em ovinos, causada pela deficiência de Se.

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados para avaliar o comportamento de Se em sistemas biológicos, como GILARDI et al. (2004), que testaram o Se em meio de cultivo de embriões produzidos *in vitro*, PASCHOAL et al. (2005), que pesquisaram a incidência de mastite em vacas suplementadas com Se e vitamina E, e ALVAREZ & MORAES (2006), que avaliaram a morfologia espermática, em coelhos, suplementados com Se e vitamina C.

O Se é um elemento que apresenta estreita margem entre os níveis de exigência e tóxicos (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999). As exigências para vacas leiteiras variam de 0,1 a 0,3 mg.kg<sup>-1</sup> de matéria seca (MS) (ARC, 1980; NRC, 2001) e para bovinos de corte 0,1 mg.kg<sup>-1</sup> de MS (NRC, 1983). Teores acima de 2 mg.kg<sup>-1</sup> na MS podem ser tóxicos, porém, em ruminantes, a atividade microbiana do rúmen influencia a forma com que o Se chega ao intestino delgado para absorção, diminuindo o risco de intoxicação (FISHER et al., 1980; MAUS et al., 1980; CRISTALDI et al., 2005).

Em ruminantes, a suplementação de Se pode ser feita na forma orgânica ou inorgânica, porém, dependendo da fonte, o Se apresenta diferenças (GIERUS, 2007). Esse autor atribuiu essa diferença ao metabolismo inicial das fontes, destacando o

selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) e selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) como formas inorgânicas, e selênio metionina ou selênio cisteína como formas orgânicas análogas dos aminoácidos sulfurados.

A forma orgânica de Se está presente como um produto direto da incorporação de Se em proteínas em substituição ao enxofre, o que difere das metaloproteínas ou quelatos, nos quais ocorre simplesmente uma complexação com grupos funcionais das proteínas (SUZUKI, 2005).

De acordo com o NRC (2001), vários estudos mostraram redução na prevalência de retenção de placenta, metrite, ovários císticos e edema de úbere quando vacas leiteiras foram suplementadas com Se durante a gestação ou a manifestação de fragilidade de sustentação das pernas, tremores musculares e decúbito em casos de deficiência. A deficiência de Se na dieta também interfere no metabolismo dos hormônios da tireóide, elevando a proporção  $T_4:T_3$ , pois ocorre diminuição da enzima deiodotironina-5-deiodinase, que é responsável pela deiodinação da tiroxina (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999).

FOUCRAS et al. (1996) relacionaram a deficiência de Se com a doença do músculo branco, enfermidades metabólicas, infertilidade e imunossupressão. Os sinais clínicos da deficiência de Se não são específicos, dificultando o diagnóstico clínico da doença, exceto no caso da doença do músculo branco (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999).

Na ausência de Se, além da diminuição da atividade da glutatona, o perfil sanguíneo mostra aumento da atividade das enzimas indicadoras de dano muscular, principalmente a creatina quinase (CPK) e a alanina aminotransferase (AST) (GONZÁLES, 2000).

A restrição grave de Se, em ruminantes, manifesta-se por meio da diminuição do crescimento e distrofia muscular nutricional em cordeiros e bezerros de crescimento rápido (GONZÁLES, 2000). Esse autor, destacou que tais ocorrências, levam à ocorrência de morte súbita causada por lesões no miocárdio e pode ser observado edema, principalmente no mesentério, pulmão e tecido subcutâneo.

SANTIAGO (1986a) observou diminuição de retenção de placenta em vacas da raça Charolesa que receberam, com 240/260 dias de gestação, 1 mL de selênio-tocoferol / 100 kg. Santiago (1986b), em outro trabalho, observou no Rio Grande do Sul aumento no índice de fecundação, diminuição do número de inseminações por concepção e do intervalo de parto e fecundação, em que um dos grupos de vacas da raça Charolesa

recebeu selênio-tocoferol (1 mL / 100kg) 30 dias pré-parto e outro que recebeu 30 dias pré-parto e 60 dias pós-parto.

ZANETTI et al. (1998) concluíram que a suplementação oral com 5 mg de Se no último mês de gestação aumentou significativamente o nível sérico do mineral em vacas leiteiras, reduzindo a incidência de mastite subclínica diagnosticada pelo California Mastite Teste (CMT), além dos bezerros, filhos de vacas suplementadas, apresentarem níveis séricos de Se 66% superiores aos de bezerros filhos de vacas não suplementadas.

PASCHOAL et al. (2003a; 2003b) verificaram que a suplementação diária com 5 mg de selênio, iniciada 30 dias antes do parto, diminuiu em 38% a prevalência de mastite clínica nas primeiras 12 semanas de lactação. Em contrapartida, COSTA et al. (1997) não observaram diferença significativa entre o grupo tratado com 0,1 mg de Se / kg de MS e o grupo-controle (sem suplementação) quanto à incidência de mastite clínica (diagnosticada pela prova de Tamis), mastite subclínica (diagnosticada pelo CMT) e infecções intramamárias.

HURLEY & DOANE (1989) afirmaram que o Se pode estar associado à produção de prostaglandinas e que existe acúmulo de Se nos placentomas, ovários, pituitária e glândulas adrenais, sugerindo que haja exigências específicas nestes tecidos. Afirmaram também que pode reduzir a retenção de placenta e incrementar a performance reprodutiva, visto que há indícios que a glutathione peroxidase protege a membrana dos oócitos contra danos oxidativos.

O Se faz parte da enzima glutathione peroxidase, que tem a função de inativar os radicais livres derivados do oxigênio, em consequência do metabolismo (CEBALLOS et al., 1999), evitando o dano oxidativo celular (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999).

A presença de Se na estrutura da enzima permite que exista uma alta relação entre a concentração sanguínea e tissular de Se com a atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px), pois a função metabólica conhecida do Se é formar parte da estrutura da enzima (CEBALLOS et al., 1999; LUBERDA et al., 2005). Em bovinos, a correlação da atividade enzimática nos eritrócitos e a concentração sanguínea de Se é alta (VAM SAUN et al., 1989). De acordo com HAFEMAN et al. (1974), a atividade da GSH-Px, nos tecidos de ratos, cai drasticamente em animais recebendo dietas deficientes em Se e aumenta quando ocorre reposição de Se. No entanto, os componentes celulares do sangue contêm a maior proporção de Se e, desta forma, a correlação entre a atividade da enzima e a concentração plasmática de Se é baixa (SCHOLZ & HUTCHINSON, 1979).

A GSH-Px tem importante papel na maturação de oócitos (LUBERDA, 2005). O processo de maturação citoplasmática de oócitos envolve muitos eventos moleculares, incluindo a síntese de componentes bioquímicos, fosforilação de proteínas e ativação de vias metabólicas específicas (EPPIG, 1996; KRISHER & BAVISTER, 1998), eventos que são pré-requisitos para a fertilização normal e desenvolvimento embrionário. A síntese intracelular de glutathione é um ponto crítico para a maturação citoplasmática do oócito (EPPIG, 1996). A função da GSH-Px no oócito é relatada como propriedades antioxidantes e protetora contra radicais livres com atividade tóxica (LUBERDA, 2005).

A produção de embriões *in vitro* (PIV) vêm se estabelecendo em estudos da fisiologia da maturação e fecundação de oócitos, capacitação espermática, cultivo de embriões, clonagem, transferência de genes, microinjeção, sexagem, congelamento e descongelamento de oócitos e embriões (COELHO et al., 1998).

Oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento, são os primeiros requisitos para o sucesso da produção *in vitro* de embriões (SENEDA et al., 2001). Assim, realizou-se o presente estudo com o objetivo de verificar a influência da adição de selênio na dieta de vacas Jersey sobre a aspiração de ovócitos e produção de embriões *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ARC - Agricultural Research Council. **The nutrient requirements of ruminant livestock**. London: UK, 1980. 351p.
- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina c sobre o sêmen. **SaBios: Revista da Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 1, n. 1 p. 42-51, 2006.
- CEBALLOS, A. et al. Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 12, p. 2.331-2.338, dez. 1999.
- COELHO, L. A. et al. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 120-122, 1998.
- COSTA, E.O. et al. Influência da suplementação de selênio na incidência de mastite. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 169-172, 1997.
- CRISTALDI, L. A. et al. Tolerance of inorganic selenium in wether sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 56, p. 205-213, 2005.
- EPPIG, J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmatic maturation in eutherian mammals. **Reproduction Fertility and Development**, v. 8 p. 485-489, 1996.
- FISHER, L. J. et al. The effect of added dietary selenium on the selenium content of milk, urine and feces. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 60, p. 79-86, 1980.
- FOUCRAS, G. et al. La dystrophie musculaire nutritionnelle chez les ruminants. **Le Point Veterinaire**, v. 27, n. 172, p. 33-38, 1996.
- GIERUS, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1.212-1.220, 2007
- GILARDI, S. G. T. et al. Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 5, p. 623-627, 2004.
- GONZÁLES, F. H. D. **Indicadores sanguíneos do metabolismo mineral em ruminantes**. In: GONZÁLES, F. H. D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H. O.; RIBEIRO, L. A. **Perfil Metabólico em Ruminantes: Seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Gráfica da UFRGS, 2000. p. 31-35.
- HAFEMAN, D. G. et al. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, p. 104-580, 1974.

HURLEY, W. L. DOANE, R. M. Recent Developments in the role of Vitamins and Minerals in Reproduction. **Journal of Dairy Science**, Champaign v. 72, p. 784-804, 1989.

KRISHER, R. L. BAVISTER, B. D. Response of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, New York, v. 49, p. 103-114, 1998.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, Krakow, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

MAUS, R. W. et al. Relationship of dietary selenium in plasma and milk from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, p. 532-537, 1980.

NRC – National Research Council, Subcomitê on Selenium. **Selenium nutrition**, Washington, DC: National Academic Press, 1983.

NRC, National Research Council. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7 ed. Washington, DC: National Academic Press, 2001.

ORTOLANI, E. L. **Macro e microelementos**. In SPINOS, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 648-649.

PASCHOAL, J. J. et al. Mastite clínica em vacas leiteiras suplementadas com selênio e vitamina E. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 1.043-1.046, 2005.

PASCHOAL, J. J. et al. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 32, p. 2.032-2.039, 2003a.

PASCHOAL, J. J. et al. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a prevalência de mastite clínica em vacas da raça holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, p. 249-255, 2003b.

PRDhealth.Selenium.<[http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/sel\\_sel\\_0232.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/sel_sel_0232.shtml)>. 8 p. Disponível em: 26/12/2007.

SANTIAGO, C. M. Estudo da influência do uso da emulsão de selênio-tocoferol nas vacas de corte em gestação no Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 31, p. 23-25, 1986a.

SANTIAGO, C. M. Estudo do efeito da emulsão de selênio-tocoferol na fecundidade de vacas de corte no Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 32, p. 13-15, 1986b.

SCHOLZ, R. W et al. Distribution of glutathione peroxidase activity and selenium in the blood of dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, Schamburg, v. 40, n. 2, p. 245-249, 1979.



SENEDA, M. M. et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 67, p. 37-43, 2001.

SHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of American Chemical Society**, v. 79, p. 3.292-3.293, 1957.

SUZUKI, K. T. Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. **Journal of Health Science**, v. 51, p. 107-114, 2005.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. Mineral nutrition of livestock. 3 ed. London: CAB Internacional, 1999.

VAM SAUN, R. J. et al. Maternal and fetal selenium concentrations and their interrelationships in dairy cattle. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 119, p. 1.128-1.137, 1989.

ZANETTI, M. A. et al. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E em bovinos leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 27, p. 405-408, 1998.

## **II – Aspiração de oócitos e produção de embriões *in vitro* de vacas Jersey suplementadas com selênio na dieta**

### **RESUMO**

O estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do selênio (Se) adicional na dieta de vacas Jersey na aspiração de oócitos e produção de embriões *in vitro*. Dez vacas da raça Jersey foram divididas, aleatoriamente, em dois grupos, em que um deles recebeu 3,2 e o outro 9,6 mg de Se por vaca por dia adicionado ao concentrado. Foram realizadas seis aspirações foliculares, com intervalo médio de 15 dias, aproveitando apenas as 5 últimas. Os oócitos foram transportados para o laboratório, classificados e realizados os procedimentos padrões de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*. A quantidade de oócitos viáveis totais e qualidade I foi superior no grupo que recebeu 9,6 mg de Se ( $P < 0,05$ ) e a quantidade de oócitos desnudos foi inferior neste grupo ( $P < 0,05$ ). No entanto, a quantidade de estruturas inviáveis foi superior nesse grupo. Não se observou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na concentração de Se no soro e no líquido folicular entre os grupos. Assim, recomenda-se o fornecimento de 100 g de sal mineralizado, contendo 96 mg de Se / kg, adicionados à dieta, pois resultou em maior produção de oócitos, maior quantidade de oócitos de grau I e maior produção de embriões no processo de fecundação *in vitro*.

**Palavras-chave:** biotecnologia, glutathiona, radicais livres, reprodução, ultra-som

## **II- Oocytes aspiration and *in vitro* embryos production of Jersey cows supplemented with selenium in the diet**

### **ABSTRACT**

The study was carried out to evaluate the effects of the additional selenium (Se) in Jersey cows' diet in the oocytes aspiration and production of embryos *in vitro*. Ten Jersey cows were divided, randomly, in two groups, where one of them received 3.2 and the other 9.6 mg of Se per cows per day added to the concentrate. Six follicular aspirations were carried out, with an average of 15 days, using only the last 5 ones. The oocytes were transported to the laboratory, classified, and then they were submitted to the standards proceedings of maturing, fecundation and *in vitro* cultivation. The total quantity of viable oocytes and quality I were higher in the group that received 9.6 mg of Se ( $P < 0.05$ ) and the quantity of naked oocytes was lower in this group ( $P < 0.05$ ). However, the quantity of unviable structures were superior in this group. There was not observed significant difference ( $P > 0.05$ ) of Se concentration in the serum and in the follicular liquid between the two groups. In accordance to the conditions in which the study was developed it is possible to recommend the supply of 100 g of mineralized salt, containing 96 mg of Se/ kg added to diet, since it turned in higher oocytes production, higher quantity of degree I oocytes I and higher embryos production in the process of *in vitro* fertilization.

**key words:** biotechnology, free radicals, glutathione, reproduction, ultrasound

## Introdução

O Selênio (Se) foi descoberto em 1817 por John Jacob Berzelius e por analogia ao telúrio, que deriva *tellus*, que quer dizer terra, o Se recebeu esse nome que deriva de *selene* (grego) que quer dizer lua (ORTOLANI, 2002; PDR HEALTH, 2005). No entanto, somente FRANK (1934), citado por ORTOLANI (2002), relacionou o Se com função biológica ao constatar que um tipo de claudicação, em eqüinos, resultante da intoxicação por Se. SHWARZ & FOLTZ (1957) descreveram, pela primeira vez, a necrose hepática em ratos e a miopatia em ovinos, causada pela deficiência de Se.

Os microminerais são importantes para as diferentes funções do organismo e, assim, a produção (MCDOWELL, 1992; BOLAND, 2003), incluindo-se a atividade reprodutiva (BOLAND, 2003), devendo o Se estar nas dietas de animais domésticos em concentrações de 0,1 a 0,3 ppm (NRC, 1983).

O Se faz parte da enzima glutatona peroxidase (GSH-Px), que tem a função de inativar os radicais livres derivados do oxigênio, em consequência do metabolismo (CEBALLOS et al., 1999; LUBERDA, 2005) e a concentração sanguínea de Se apresenta relação de 0,74 a 0,97 com a atividade da GSH-Px (WITTEWER et al., 2002).

A GSH-Px atua na proteção das células contra os danos causados por espécies de oxigênio reativo e pela redução de peróxidos de hidrogênio, bem como favorece a síntese de hormônios derivados do ácido araquidônico, do metabolismo de compostos estranhos ao organismo e no transporte de alguns aminoácidos nos rins (SANDHOLM, 1980; PDRHEALPH, 2007; BARBOSA et al., 2005).

Os radicais livres causam danos à membrana celular, reduzindo a qualidade dos gametas (LUBERDA, 2005). Oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento, são os primeiros requisitos para o sucesso da produção *in vitro* de embriões (SENEDA et al., 2001; PASCHOAL & GRADELA, 2007).

As células estão continuamente produzindo radicais livres e espécies reativas de oxigênio como parte do processo metabólico. Tais espécies são capazes de gerar estresse oxidativo em consequência de suas propriedades oxidantes (PUNTEL, 2006). De acordo com NORDBERG & ARNER (2001), em condições fisiológicas, o O<sub>2</sub> sofre uma redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando em formação de água. Durante esta reação, são formados reativos intermediários como os radicais

superóxido ( $O_2^-$ ), hidroperoxila ( $HO_2$ ) e hidroxila ( $OH$ ) e o não radical peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

O radical superóxido é um radical livre formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente na membrana mitocondrial através da cadeia respiratória. É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar em membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido.

O radical hidroxila é considerado o mais reativo em sistemas biológicos e é formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais ( $Fe^{++}$  ou  $Cu^{++}$ ), denominada de reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é extremamente nocivo, pois tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (NORDBERG & ARNER, 2001). Estes são neutralizados por um sistema de defesa antioxidante que pode ser enzimático (a catalase, a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase) ou não-enzimático (as vitaminas A, E e C, flavonóides, ubiquinonas e a glutathione reduzida - GSH) (ALEXI et al., 1998; GIANNI et al., 2004).

HURLEY & DOANE (1989) afirmaram que o Se pode estar associado à produção de prostaglandinas e que existe acúmulo de Se nos placentomas, ovários, pituitária e glândulas adrenais, sugerindo que haja exigências específicas nestes tecidos. Salientaram também que pode reduzir a retenção de placenta e incrementar a performance reprodutiva visto que há indícios de que a GSH-Px protege a membrana dos oócitos contra danos oxidativos, o que coincide, em parte, com as observações de LUBERDA (2005).

SANTIAGO (1986a) observou diminuição de retenção de placenta em vacas da raça charolesa que receberam, com 240/260 dias de gestação, 1 mL de selênio-tocoferol / 100 kg. SANTIAGO (1986b), em outro trabalho, observou, no Rio Grande do Sul, aumento no índice de fecundação, diminuição do número de inseminações por concepção e do intervalo de parto e fecundação, em que um dos grupos de vacas da raça charolesa recebeu selênio-tocoferol (1 mL / 100kg) 30 dias pré-parto e outro que recebeu 30 dias pré-parto e 60 dias pós-parto

Já foram identificadas 10 selenoproteínas, dentre as quais a GSH-Px, cujas funções ainda não são claras (ARTHUR et al., 1990). Dentre as selenoproteínas, a diiodinase, que converte tiroxina ( $T_4$ ) em triiodotironina ( $T_3$ ) e, em um caso de deficiência de Se, pode elevar o TSH e, por conseqüência, a deficiência de  $T_4$  e  $T_3$  (ARTHUR,

1993; OMS, 1998), o que poderia prejudicar o desenvolvimento animal (OBLITAS et al., 2000).

De acordo com EPIG (1996) e KRISHER & BAVISTER (1998), a GSH-Px tem se revelado importante no processo de maturação de oócitos, envolvendo a síntese de componentes bioquímicos, fosforilação de proteínas e a ativação de caminhos metabólicos específicos.

Apesar dos avanços ocorridos nos últimos anos na produção de embriões *in vitro*, vários aspectos precisam ser esclarecidos e, dentre eles, está a competência dos gametas (PASCHOAL & GRADELA, 2007). Assim, para tentar contribuir neste processo, realizou-se este estudo com o objetivo de verificar a influência da adição dietética de Se, além daquela prevista para a produção animal, na produção e qualidade de oócitos, bem como na produção de embriões *in vitro*.

## **Material e Métodos**

### **Locais e animais**

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, localizada na latitude de 23° 25' S; 51° 57' O e 550 metros de altitude e no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (BIOTEC) do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR), na mesma cidade. Dez vacas da raça Jersey, primíparas, idade média de 3 anos, com peso inicial médio de 240,6 kg, oriundas do mesmo grupo genético, foram divididas, aleatoriamente, em grupos controle (GC) e tratamento (GT).

### **Tratamentos e alimentação**

Os animais receberam silagem de milho de planta inteira (Tabela 1), concentrado (Tabelas 1 e 2), 100 g de sal mineralizado (Potensal®) / vaca / dia e tiveram acesso à pastagem de grama estrela (*Cynodon* spp.). O tratamento dos dois grupos diferiu apenas na concentração de selênio contida no sal mineral (Tabelas 1 e 3), em que GC recebeu o sal que continha 32 mg de Se / Kg (3,2 mg de Se / vaca / dia) e o GT, 96 mg de Se / Kg (9,6 mg Se / vaca / dia).

Tabela 1. Alimentos fornecidos diariamente, em kg, durante o período experimental.

| Parâmetro                                  | GC    | GT    |
|--|-------|-------|
| Silagem de Milho (MS)                      | 2,684 | 2,684 |
| Concentrado (MS)                           | 2,251 | 2,251 |
| Sal Mineralizado contendo 32 mg de Se / kg | 0,100 | -     |
| Sal Mineralizado contendo 96 mg de Se / kg | -     | 0,100 |

<sup>1</sup> MS - Matéria Seca; GC - Grupo Controle; GT - Grupo Tratamento

Foi considerado dia zero (D-0) quando os animais começaram a receber os tratamentos e, nesta data, os animais foram vermifugados com Ivermectina 1% (Supramec®, Schering-Plough).

Tabela 2. Composição bromatológica do concentrado utilizado.

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Matéria Seca (%)                  | 90,05 |
| Proteína Bruta (%)                | 16,00 |
| Proteína Degradável no Rúmen (%)  | 13,80 |
| Fibra Bruta (%)                   | 9,80  |
| Extrato Etéreo (%)                | 2,00  |
| Fibra em Detergente Neutro (%)    | 30,00 |
| Nitrogênio Não Protéico (%)       | 3,90  |
| Nutrientes Digestíveis Totais (%) | 70,00 |
| Matéria Mineral (%)               | 10,00 |
| Cálcio (%)                        | 1,00  |
| Fósforo (%)                       | 0,45  |

Os animais foram pesados no D-0 (início) e no D-119 (final), além de mais quatro pesagens intermediárias, conforme a rotina da fazenda, tendo as mesmas sido realizadas pela manhã, antes que os animais recebessem alimentação.

Tabela 3. Composição química do sal mineral<sup>1</sup> utilizado.

| Elementos          | GC   | GT   |
|--------------------|------|------|
| Cálcio (g / kg)    | 184  | 184  |
| Fósforo (g / kg)   | 85   | 85   |
| Enxofre (g / kg)   | 24   | 24   |
| Magnésio (g / kg)  | 24   | 24   |
| Sódio (g / kg)     | 103  | 103  |
| Cobalto (mg / kg)  | 100  | 100  |
| Cobre (mg / kg)    | 1300 | 1300 |
| Ferro (mg / kg)    | 3500 | 3500 |
| Iodo (mg / kg)     | 100  | 100  |
| Manganês (mg / kg) | 1800 | 1800 |
| Selênio (mg / kg)  | 32   | 96   |
| Zinco (mg / kg)    | 5000 | 5000 |
| Cromo (mg / kg)    | 20   | 20   |
| Flúor (mg / kg)    | 850  | 850  |

<sup>1</sup> Sal mineral produzido por POTENSAL®

### **Colheita de oócitos e produção de embriões *in vitro***

Decorridos 20 dias de tratamento, foi realizada a primeira aspiração folicular (AF) guiado por ultra-sonografia transvaginal, a qual foi desprezada. Em continuidade, foram realizadas mais cinco aspirações, com intervalo médio de 15 dias, visando avaliar os oócitos. As aspirações foliculares foram realizadas utilizando ultrassom Aloka SSD-500, equipado com transdutor setorial intravaginal de 5 MHz e dispositivo-guia com agulha WTA 20G para punção folicular conectado a bomba de vácuo Cook, com pressão de 40 a 50 mm de Hg. Foram aspirados os folículos que apresentavam tamanho de 3 a 9 mm de diâmetro (PERRY, 2007).

Uma vez colhidos, os oócitos foram transportados para o BIOTEC, dentro de garrafa térmica, em meio de maturação (MIV-T Nutricell®) a 36°C. No Biotec, os oócitos foram classificados de acordo com Lonergan (1992) em grau I, II, III, expandido, desnudo e atrésico, sendo considerados viáveis os graus I, II, III, desnudo e expandido ou inviáveis, degenerados ou atrésicos.

Os oócitos classificados como viáveis foram lavados em meio de maturação (MIV-T Nutricell®) e transferidos para duas placas de Petri de 35 x 15 mm, uma contendo 7 gotas e outra contendo 3 gotas de 90 µL de meio de maturação, em que cada gota recebeu os oócitos de uma vaca, os quais foram cobertos por óleo mineral (Sigma®), testados para cultivo de embriões e, então, foram incubados por 22 a 24 horas a 38°C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. Após a maturação, os oócitos foram lavados e transferidos para placa de fecundação contendo meio de Fecundação (Nutricell®), acrescido de Heparina (Sigma Chemical®) e PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina).

Na fecundação *in vitro* (FIV) foi utilizado sêmen de touro Jersey, previamente testado na FIV. Os espermatozóides foram selecionados por meio de gradiente Percoll, num tubo cônico de 15 mL com dois gradientes, sendo 90% e 45%. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 36°C por um minuto e depositado sobre o tubo contendo os dois gradientes Percoll e centrifugado a 600 g força por 10 minutos. Após a centrifugação, o pellet formado foi retirado e diluído para atingir uma concentração de  $2 \times 10^6$  espermatozóides / mL, utilizando-se 10 µL desta diluição, por gota, para efetuar a FIV.



Após a adição do sêmen, a placa de FIV permaneceu a 38°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, em ar e umidade saturada por 18 a 22 horas. Concluído a FIV, as estruturas foram novamente lavadas e transferidas para a placa de cultivo, contendo o meio de cultivo (SOF Nutricell®) e incubados a 38°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, em ar e umidade saturada.

A primeira avaliação foi realizada 48 horas após a fecundação (dia 2) e a segunda, no dia 7, e os embriões classificados em mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido, segundo LEIBFRIED & FIRST (1979).

### **Amostragens de sangue, líquido folicular e alimentos para análise de Selênio**

Foram colhidos 10 mL de sangue, com agulhas de 40 x 12 mm da veia jugular (10mL), no D-0 e outra no D-119, para avaliar selênio no soro. As amostras de pastagem, silagem e concentrado também foram obtidas nas mesmas datas da colheita de sangue. Uma semana após a última AF, foi obtida amostragem de líquido folicular para avaliar Se, tendo os animais recebidos os tratamentos até esta data. O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm (1.600 g força) por 15 minutos e o soro foi colocado em Eppendorf de 2 mL e congelado a menos 18°C até a realização das análises pelo Laboratório Green Lab de Porto Alegre – RS. As amostras de líquido folicular também foram congeladas a menos 18°C em tubos Eppendorf e as amostras de alimentos foram embaladas e mantidas em freezer a menos 18°C até serem enviadas ao laboratório.

### **Delineamento**

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado, com análise de variância e teste de médias para comparação dos tratamentos, utilizando-se o Modelo Bayesiano para variáveis discretas. Preservando as características e pressuposições clássicas, considerou-se que as variáveis aleatórias discretas (qualidade e tipo de oócitos e embriões) do grupo controle ( $Y_{iC}$ ) e grupo tratamento ( $Y_{jT}$ ) apresentam distribuição Poisson com parâmetro  $\theta$ , onde:

$$Y_{iC} \sim \text{Poisson}(\theta_C), i = 1, 2, \dots, n_C;$$

$$Y_{jT} \sim \text{Poisson}(\theta_T), j = 1, 2, \dots, n_T.$$

### **Distribuições *a priori* para os parâmetros $\theta$**

Para  $\theta_C$  e  $\theta_T$ , considerou-se como distribuição *a priori* a distribuição Gamma não-informativa, com parâmetros “a” e “b”, onde:

$\theta_C \equiv \theta_T \sim \text{Gamma}(a, b)$ , sendo  $a = b = 10^{+3}$ .

### **Modelo Bayesiano para variáveis contínuas**

Preservando as características e pressuposições clássicas, considerou-se que as variáveis aleatórias contínuas (quantidade de selênio no soro sanguíneo e no líquido folicular) do grupo controle ( $Y_{iC}$ ) e grupo tratamento ( $Y_{jT}$ ) tem distribuição Normal com média  $\mu$  e variância  $\sigma^2$ , onde:

$Y_{iC} \sim \text{Normal}(\mu_C, \sigma_C^2)$ ,  $i = 1, 2, \dots, n_C$ ;

$Y_{jT} \sim \text{Normal}(\mu_T, \sigma_T^2)$ ,  $j = 1, 2, \dots, n_T$ .

### **Estrutura hierárquica - Distribuições *a priori* para os parâmetros $\mu$ e $\sigma^2$**

Para cada  $\mu_C$  e  $\mu_T$ , considerou-se como distribuição *a priori* a distribuição Normal não-informativa com parâmetros “c” e “d”, enquanto para cada  $\sigma_C^2$  e  $\sigma_T^2$ , considerou-se como distribuição *a priori* a distribuição Gamma não-informativa com parâmetros “e” e “f”, onde:

$\mu_C \equiv \mu_T \sim \text{Normal}(c, d)$ , sendo os hiperparâmetros  $c = 0$  e  $d = 10^{+6}$ ;

$\sigma_C^2 \equiv \sigma_T^2 \sim \text{Gamma}(e, f)$ , sendo os hiperparâmetros  $e = f = 10^{+3}$ .

As distribuições *a posteriori* para os parâmetros de interesse foram obtidas por meio do software WinBUGS (SPIEGELHALTER et al., 1996), utilizado para a obtenção das estimativas amostrais.

Foram geradas 10.000 amostras, sendo descartadas as primeiras 1.000 amostras. As amostras finais foram tomadas em saltos iguais a 10, produzindo amostras de tamanho 900 para cada parâmetro de interesse.

A monitoração da convergência das cadeias geradas pelo amostrador de Gibbs foi feita por meio de análise gráfica e por meio da utilização dos testes de diagnóstico de Geweke (1992) e de HEIDELBERGER & WELCH (1983), disponíveis no CODA (*Convergence Diagnosis and Output Analysis*) (SPIEGELHALTER et al., 1996), implementado no programa R (*R Development Core Team, 2007*).

O sumário *a posteriori* das estimativas (média, desvio-padrão e mediana *a posteriori*) dos parâmetros de interesse e para a diferença entre os parâmetros dos grupos comparados, com seus respectivos intervalos de credibilidade (percentís  $P_{2.5\%}$ - $P_{97.5\%}$ ) em nível de 95%, é apresentado nas Tabelas do texto. Para intervalos onde o “zero” não pertence ao  $\text{ICr}(95\%) = [P_{2.5\%} ; P_{97.5\%}]$ , há diferença significativa entre os grupos analisados.

### Resultados e Discussão

Durante os 119 dias de experimento, os animais apresentaram ganho de peso médio de  $49,9 \pm 13,47$  kg, com peso final médio de  $298 \pm 18,2$  kg para os animais do GC e  $283 \pm 8,57$  kg para o GT. Os animais receberam as mesmas quantidades diárias de silagem, concentrado e sal mineralizado durante o experimento.

Os resultados sobre a produção de oócitos totais e a classificação de acordo com a qualidade são apresentados na Tabela 4. O número total de oócitos colhidos e o número de estruturas graus I e III foram maiores nas fêmeas que receberam 9,6 mg diárias de Se ( $P < 0,05$ ), mas o número de oócitos desnudos foi inferior ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, o número total de oócitos inviáveis e o número de oócitos atrésicos foram mais elevados nos animais tratados com 9,6 mg diários de Se ( $P < 0,05$ ), assim como o número de oócitos atrésicos ( $P < 0,05$ ).

Tabela 4. Resultado médio estimado por aspiração folicular de vacas Jersey (n=5) suplementadas com 3,2 mg / dia / animal e 9,6 mg / dia / animal de selênio e o desvio-padrão.

| Parâmetro                  | 3,2 mg Se / dia / animal | 9,6 mg Se / dia / animal |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Total de Oócitos Viáveis   | $23,10 \pm 2,16$         | $35,11 \pm 2,65^*$       |
| Grau I                     | $4,75 \pm 0,97$          | $11,61 \pm 1,58^*$       |
| Grau II                    | $4,57 \pm 0,98$          | $7,17 \pm 1,32$          |
| Grau III                   | $8,90 \pm 1,32$          | $16,40 \pm 2,10^*$       |
| Desnudos                   | $6,22 \pm 1,18^*$        | $3,24 \pm 0,87^*$        |
| Expandidos                 | $2,33 \pm 0,89$          | $3,69 \pm 1,16$          |
| Total de Oócitos Inviáveis | $5,48 \pm 1,16$          | $11,23 \pm 1,65^*$       |
| Atrésicos                  | $4,49 \pm 1,08$          | $10,68 \pm 1,62^*$       |
| Degenerados                | $1,32 \pm 0,66$          | $0,99 \pm 0,71$          |

\* ( $P < 0,05$ ), comparando-se os resultados na mesma linha.

Pelas observações obtidas, notou-se que os animais apresentaram ganho de peso compatível com a atividade de fornecer oócitos, pois houve ganho de peso, destacando que o desempenho dos animais não deve ter interferido na produção de oócitos, como mencionou BOLAND (2003), em que vacas que perdem peso no pós-parto não apresentam boa ovulogênese. Então, os efeitos observados podem ser atribuídos aos tratamentos.

De acordo com os dados contidos na Tabela 4, verificou-se que os animais que receberam 9,6 mg de Se/dia apresentaram considerável melhora na produção de oócitos quando comparados com os animais que receberam 3,2 mg de Se/dia ( $P < 0,05$ ), sendo

este último valor considerado normal para a produção animal (NRC, 1983). Isto pode permitir levantar a hipótese de que a atividade reprodutiva requer teores de Se mais elevados a fim de que os animais possam expressar o potencial máximo, o que está de acordo com as observações de WITTWER et al. (2002), ao encontrarem correlação de 0,74 a 0,97 do nível de Se com enzima Glutathione Peroxidase (GSH-Px).

Algumas hipóteses podem ser atribuídas em favor do tratamento com maior teor de Se, como a possibilidade da manutenção constante de níveis sanguíneos percentuais elevados de Se (Tabelas 6 e 7) contribuindo para melhorar o crescimento, a maturação e a competência dos oócitos. Fatores assim foram destacados por PAVLOK et al. (2005), Gosden *et al.* (1997) e Perry (2007), em que observaram melhor competência dos oócitos obtidos dos folículos com mais de 2 mm de diâmetro, pois os obtidos de folículos com diâmetro inferior não foram capazes de sobreviver além do estágio de clivagem de oito células. Assim, a formação de mais GSH-Px (WITTWER et al., 2002) pode ter favorecido a foliculogênese e ter crescido folículos mais homogêneos e maiores do que os animais tratados com 3,2 mg de Se. Outra hipótese que pode ser abordada é a propriedade antioxidante do Se, combatendo os radicais livres resultantes de átomos ou de moléculas que apresentam um ou mais elétrons desapareados (STRYER, 1996), elementos altamente tóxicos e deletérios às células e tecidos em geral (RODRIGUEZ et al., 2004; LUBERDA, 2005).

Então, quando há desequilíbrio entre radicais livres (oxidantes) e os antioxidantes (defensores) que favorecem os oxidantes, surge o estresse oxidativo, havendo o ataque dos oxidantes às células, produzindo resíduos celulares ou a morte das células (RODRIGUEZ et al., 2004). Diante disso, como o tratamento dos animais com 9,6 mg de Se por dia, manteve-se teores percentuais sanguíneos elevados de Se (Tabelas 6 e 7) e, como ele faz parte do processo de síntese das peroxidases como a GSH-Px, que se localiza no citosol e nas mitocôndrias, certamente tais animais continham valores elevados de GSH-Px (WITTWER et al., 2002) em comparação com aqueles que receberam 3,2 mg de Se. Este fato pode ter gerado maior proteção dos oócitos contra os oxidantes, em especial o radical hidróxido (OH<sup>•</sup>), acrescentando que foram observados bons valores de Se no líquido folicular, o que pode indicar a importância do Se na foliculogênese. Destaca-se também a predominância de oócitos de grau I, os quais contêm as estruturas que os envolvem perfeitas, fator que proporciona maior competência aos oócitos, devendo-se esperar maior índice de produção de embriões *in vitro*, pois de acordo com GOLSDEN et al. (1997) e SENEDA et al. (2001), as camadas

que envolvem os oócitos são importantes para a nutrição e a regulação das atividades dos oócitos.

É possível notar que os oócitos inviáveis, em especial os degenerados e atresícos, foram maiores ( $P < 0,05$ ) no tratamento com 9,6 mg de Se em relação aos tratados com 3,2 mg, fato esperado, pois houve maior produção total de oócitos e maior produção de grau I.

Na nutrição de vacas doadoras de oócitos ou destinadas à reprodução, uma parte importante, em ruminantes, se deve aos microminerais como o Se, que é responsável pela formação de proteínas enzimáticas, formando metaloproteínas fundamentais à vida e que se houver deficiências causa severos distúrbios metabólicos e severas conseqüências patológicas (McDOWELL, 1992; UNDEERWOOD & SUTTLE, 1999).

O teor considerado normal de Se no organismo de animais domésticos varia de 0,1 a 0,3 ppm (NRC, 2001), o qual participa da formação das enzimas glutatônicas, destacando-se a GSH-Px, a mais importante (RODRIGUEZ et al., 2004), encarregada de catalizar a redução dos peróxidos para proteger as células dos prejuízos oxidativos (CEBALLOS et al., 1998; OBLITAS et al., 2000; BOLAND, 2003; RODRIGUEZ et al., 2004; LUBERDA, 2005).

De acordo com Rodriguez et al. (2004), quando o equilíbrio entre radicais livres (oxidantes) e os defensores antioxidantes encontram-se com desbalanço favorável aos oxidantes, ocorre o estresse oxidativo, havendo ataque às células, levando-as à morte. Também podem ocorrer alterações na atividade das organelas intracelulares, como mitocôndrias, lisossomos, paredes e estruturas celulares (COMBS et al., 1975).

A produção total de embriões e o de blastocisto expandido, *in vitro*, foi superior no GT ( $P < 0,05$ ). A quantidade de Blastocisto inicial e blastocisto não diferiu entre os dois grupos ( $P > 0,05$ ). Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultado médio estimado da produção *in vitro* de embriões, por aspiração folicular de vacas Jersey (n=5) suplementadas com 3,2 mg / dia / animal e 9,6 mg / dia / animal de selênio e o desvio-padrão.

| Parâmetro                   | 3,2 mg Se / dia / animal | 9,6 mg Se / dia / animal |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Embriões totais (D-7)       | 13,12 ± 1,59             | 21,98 ± 2,37*            |
| Blastocisto inicial (D-7)   | 2,78 ± 0,77              | 4,49 ± 1,05              |
| Blastocisto (D-7)           | 3,01 ± 0,89              | 5,27 ± 1,16              |
| Blastocisto expandido (D-7) | 6,64 ± 1,15              | 10,95 ± 1,64*            |

\* ( $P < 0,05$ ), comparando-se os resultados na mesma linha.

As análises revelaram que submeter os oócitos ao processo de maturação e fecundação *in vitro* obtêm-se a média estimada de  $21,98 \pm 2,37$  blastocistos totais nos animais que foram tratados com 9,6 mg de Se/dia em comparação aos  $13,12 \pm 1,58$ , sendo significativa ( $P < 0,05$ ) esta diferença. Isto é o resultado, provavelmente, da produção de oócitos de melhor qualidade (grau I) nos animais que receberam 9,6 mg/dia de Se, o que pode ser justificado pelas observações de UHM et al. (2007), ao trabalharem com embriões de suínos e terem constatado que os oócitos cultivados e fecundados em meio contendo 25 mg de Selenito de sódio por mL de meio apresentaram melhor desenvolvimento e melhor qualidade aos sete dias de pós-fecundação em relação aos cultivados em meios sem Selenito de sódio. De acordo com UHM et al. (2007), o Se garantiu adequada biossíntese de selenoproteína, protegendo as células dos embriões de ações oxidantes e apoptose. Em relação à selenoproteína, pode ser destacado os estudos de WITTEWER et al. (2002), ao observarem uma correlação de 0,74 dos teores de Se ingeridos pelo animal e a GSH-Px.

A concentração média de Se no soro e no líquido folicular apresentaram variações numéricas entre os dois grupos, porém não se observou diferença estatística ( $P > 0,05$ ). Os dados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Resultado médio da análise de concentração de selênio no plasma no início e no final do experimento e no líquido folicular de vacas Jersey suplementadas com 3,2 mg / dia / animal e 9,6 mg / dia / animal de selênio durante 119 dias.

| Parâmetro                            | 3,2 mg Se / dia / animal<br>(mg / L) | 9,6 mg Se / dia / animal<br>(mg / L) |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Selênio no Soro (D-0)                | $0,057 \pm 0,017$                    | $0,064 \pm 0,017$                    |
| Selênio no Soro (D-119)              | $0,087 \pm 0,025$                    | $0,102 \pm 0,026$                    |
| Selênio no Líquido folicular (D-119) | $0,139 \pm 0,036$                    | $0,122 \pm 0,036$                    |

\* ( $P > 0,05$ ); n=5.

Não foi observada diferença estatística nas análises da concentração de Se no soro, comparando as análises do primeiro e do último dia de experimento no GT (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração inicial e final média de selênio no soro de vacas Jersey suplementadas com 9,6 mg / dia / animal de selênio durante 119 dias.

| Parâmetro                        | n | D-0               | n | D-119             |
|----------------------------------|---|-------------------|---|-------------------|
| Selênio no Soro D-0 x D-119 (GT) | 5 | $0,063 \pm 0,016$ | 5 | $0,102 \pm 0,016$ |

\*( $P > 0,05$ ); n = número de observações.

Com relação aos teores de Se no soro, apesar de não ter havido diferença ( $P>0,05$ ), notou-se um aumento de 52,63% comparando o início do experimento com o final, nos animais tratados com 3,2 mg de Se/dia. Neste mesmo grupo, o aumento no líquido folicular aos 119 dias foi de 143,86% em relação ao Se observado no soro no início do tratamento. Já naqueles que receberam 9,6 mg de Se / dia, verificou-se aumento de 59,38% de Se no soro comparado o início do experimento com o final, mas no líquido folicular o aumento foi de 90,63% ao comparar o Se no líquido folicular aos 119 dias com aquele existente no soro, no início do experimento.

Estes valores permitem justificar a importância do Se no processo de produção de oócitos com melhor competência para gerarem embriões ao serem fecundados *in vitro*, tendo entre outros fatores o aumento da síntese de GSH-Px. Entre outros fatores, poder-se-ia destacar o aumento da imunidade e melhor crescimento dos animais (CEBALLOS & WITTEWER, 1996).

### **Conclusões**

De acordo com as condições em que o trabalho foi desenvolvido, pode-se concluir que a maior adição de Se à dieta resultou em maior produção de oócitos, maior quantidade de oócitos de grau I e maior produção de embriões no processo de fecundação *in vitro*.

## Referências

- ALEXI, T. et al. 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathway of neurodegeneration. **Neuroreport**, London9, R57-R64, 1998.
- ARTHUR, J. R. et al. Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. **Biochemistry Journal**, Grã-Bretanha, v. 272, p. 537-540, 1990.
- ARTHUR, J. R. The biochemical functions of selenium relationships to thyroid metabolism and antioxidant systems. In: **ROWETT RESEARCH INSTITUTE ANNUAL REPORT**, p. 11-20, 1993. Rowett Research Institute, Blackburn, Abedeen, UK.
- BOLAND, M. P. Trace minerals in production and reproduction in dairy cows, **Advances in Dairy Technology**, Dublin, v. 15, p. 319-330, 2003.
- BARBOSA, F. A., SOUZA, G. M. Influência dos principais microminerais na reprodução de bovinos. Capturado em 4 abr. 2005. On-line. <Disponível em: <http://www.rhagro.com.br/leite>>
- CEBALLOS, A. et al. Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 12, p. 2.331-2.338, 1999.
- CEBALLOS, A. et al. Actividad sanguínea de glutatión peroxidase en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdivia, v. 30, n. 1, p. 1-13, 1998.
- CEBALLOS, A.; WITTEWER, F. Metabolismo del selênio em ruminantes. **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdivia, v. 28, p. 5-18, 1996.
- COMBS Jr, G. F. et al., Mechanisms of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 34, p. 2.090-2.095, 1975.
- EPPIG, J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmatic maturation in eutherian mammals. **Reproduction Fertility and Development**, v. 8 p. 485-489, 1996.
- GEWEKE, J. Evaluating the accuracy of sampling-based approaches to the calculation of posterior moments (with discussion). In: BERNARDO, J. M. et al. (Ed.). **Bayesian statistics 4**. p. 169-193. Oxford: Oxford University Press, 1992.
- GIANNI, P. et al. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. **Exp. Gerontol.**, 39, 1.391-1.400, 2004.
- GOSDEN, R. et al. Growth and development of the mammalian oocyte. **BioEssays**, Reino Unido, v. 19, n. 10, p. 875-882, 2005.
- HEIDELBERGER, P.; WELCH, P. Simulation run length control in the presence of an initial transient. **Operations Research**, Maryland, v. 31, n. 6, p. 1.109-1.144, 1983.



HURLEY, W. L. DOANE, R. M. Recent Developments in the role of Vitamins and Minerals in Reproduction. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 784-804, 1989.

KRISHER, R. L. BAVISTER, B. D. Response of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, New York, v. 49, p. 103-114, 1998.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 48, p. 76-86, 1979.

LONERGAN, P. **Studies in the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes**. 1992. 157f. Tese - National University of Ireland, Dublin.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, Krakow, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

McDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. 1992. Academic Press, California.

NOBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thiredoxin system. **Free Radical Biology Medecine**, v. 31, p. 1.287-1.312, 2001.

NRC – National Research Coucil, Subcomitte on Selnium. **Selenium nutrition**. Washington, DC: National Academic Press, 1983.

OBLITAS, F. et al. Efecto de la suplementación com selênio sobre la actividad sangüínea de glutation peroxidase (GSH-Px) y ganancia de peso em bovinos selenio deficientes mantenidos a pastoreo. **Archivos de Medicina Veterinária**, Santiago, v. 32, n. 1, p. 1-11, 2000.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Elementostraco na nutrição e saúde humanas**. São Paulo: Editora Roca, 1998.

ORTOLANI, E. L. Macro e microelementos. In SPINOS, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 648-649, 2002.

PASCHOAL, D. M.; GRADELA, A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: revisão de literatura. **Revista CFMV**, Brasília, n. 41, p. 20-28, 2007.

PAVLOK, A. et al. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 31, n. 1, p. 63-67, 2005.

PERRY, G. A. Effect of follicle size on fertility in cattle. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Brookings, SD, v. 2, n. 14, p. 1-9, 2007.

PRDhealth.Selenium.<[http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/sel\\_sel\\_0232.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/sel_sel_0232.shtml)>. 8 p. Disponível em: 26/12/2007.

PUNTEL, R. L. **Efeito de intermediários do ciclo de krebs sobre alterações oxidativas induzidas por diferentes agentes oxidantes**. 2006. 71f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria.

R Development Core Team (2007). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>>. Disponível em: 25/10/2007

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, p. 1-9, 2004.

SANDHOLM, M. Biological and clinical aspects of selenium. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PRODUCTION DISEASE IN FARM ANIMALS, 4. München, 1980, p. 247-253.

SANTIAGO, C. M. Estudo da influência do uso da emulsão de selênio-tocoferol nas vacas de corte em gestação no Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 6, n. 31, p. 23-25, 1986a.

SANTIAGO, C. M. Estudo do efeito da emulsão de selênio-tocoferol na fecundidade de vacas de corte no Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 6, n. 32, p. 13-15, 1986b.

SENEDA, M. M. et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 67, p. 37-43, 2001.

SHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of American Chemical Society**, v. 79, p. 3.292-3.293, 1957.

SPIEGELHALTER, D. J. *et al.* **BUGS - Bayesian Analysis using Gibbs Sampling. Version 0.5**, Cambridge:MRC Biostatistics Unit, 1996.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1.000 p.

UHM, S. J. et al. Embryo development: Selenium improves the developmental ability and reduces the apoptosis in porcine parthenotes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 11, p. 1.386-1.394. 2007.

UNDERWOOD, E. J. SUTTLE, N. F. **Mineral nutrition of livestock**. 3 ed. London: CAB Internacional, 1999.

WITTWER, F. et al. Actividad de glutatión peroxidase (GSH-Px) en sangre de bovinos a pastoreo de la IX región, Chile y su relación con la concentración de selênio en el forraje. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2002.