

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/01/2024.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Josiane Caobianco Dias Zucoloto

Bioquímica e Farmacêutica

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM METIONINA
PROTEGIDA NO RÚMEN EM VACAS DOADORAS DE
OÓCITOS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E NA
TAXA DE PRENHEZ**

Dracena

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Josiane Caobianco Dias Zucoloto

Bioquímica e Farmacêutica

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM METIONINA
PROTEGIDA NO RÚMEN EM VACAS DOADORAS DE
OÓCITOS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E NA
TAXA DE PRENHEZ**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus de Dracena como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive
Coorientadora: Profa. Dra. Angela Maria Gonella-Diaza

Dracena

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

Z943e

Zucoloto, Josiane Caobianco Dias.

Efeitos da suplementação com metionina protegida no rúmen em vacas doadoras de oócitos na produção in vitro de embriões e na taxa de prenhez / Josiane Caobianco Dias Zucoloto. -- Dracena: [s.n.], 2023.

59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2023.

Orientador: Claudia Maria Bertan Membrive

Co-orientadora: Angela Maria Gonella-Diaza

1. Fecundidade. 2. Embriões. 3. Metilação de DNA. 4. Bovinos. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

O Brasil busca aumentar a produção de carne e o número de bezerros geneticamente superiores nascidos empregando a produção *in vitro* de embriões. O uso de metionina protegida no rúmen em doadoras de oócitos pode aumentar o número de embriões produzidos pela referida biotecnologia, ainda tornando-os mais competentes em estabelecerem a prenhez.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeitos da suplementação oral com metionina protegida no rúmen em vacas doadoras de oócitos na produção *in vitro* de embriões e na taxa de prenhez

AUTORA: JOSIANE CAOBIANCO DIAS ZUCOLOTO
ORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE
COORDINADORA: ANGELA MARIA GONELLA DIAZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência e Tecnologia Animal, pela Comissão Examinadora:

Prof. Associada CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Unesp - Câmpus de Dracena

Prof. Dr. MURILLO CEOLA STEFANO PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Unesp - Câmpus de Dracena

Profa. Dra. SAARA CAROLLINA SCOLARI SCARAMUZZA (Participação Virtual)
IND Biotechnologies

Dracena, 28 de julho de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Josiane Caobianco Dias Zucoloto, nascida em 17 de março de 1973, na cidade de Ituverava, no estado de São Paulo. Em 1992, ingressou no Curso de Graduação em Farmácia na Universidade de Marília (Unimar), em Marília no estado de São Paulo, tendo concluído o mesmo em dezembro de 1994. Em 1995, ingressou no Curso de Graduação em Bioquímica na Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), em Presidente Prudente no estado de São Paulo, tendo concluído o mesmo em dezembro de 1995. Durante a Graduação, realizou estágio curricular na Farmácia de Manipulação Galena, na área de produção e manipulação de medicamentos. De 1996 a 1999, atuou como Bioquímica no Laboratório de Análises Clínicas Balan e Sanches, na cidade de Rancharia, no estado de São Paulo. De agosto a novembro de 2002, realizou um treinamento na produção *in vitro* de embriões bovinos, na Empresa Brasileira de Pesquisa (Embrapa), em Brasília no Distrito Federal. De dezembro de 2002 a julho de 2016, atuou como bioquímica no Laboratório de Fertilização *in vitro* de Bovinos, na Agropecuária Nova Vida, localizada na cidade de Ariquemes, no estado de Rondônia. Em dezembro de 2015, participou do treinamento “Vitrification and Thaw of Bovine Embryos” pela empresa ST Genetics em De Forest, Wisconsin. De agosto de 2016 até o momento, é sócia proprietária do Laboratório de Fertilização *In Vitro* Central Senepol Ltda, onde atua como responsável na produção *in vitro* de embriões bovinos. De 2002 a 2023, produziu aproximadamente 100.000 embriões bovinos *in vitro* com uma taxa média de concepção de 50% para embriões frescos e 30% para embriões congelados não vitrificados. Em agosto de 2021, ingressou no curso de Mestrado acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal (PPGCTA) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), na Unesp de Dracena no estado de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive. Desde fevereiro de 2022, vem atuando ativamente no seu projeto de Mestrado realizado no Laboratório de Fertilização *In Vitro* Central Senepol Ltda.

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus** que me sustentou até aqui. Ao meu marido e companheiro, **Wanderley Zucoloto**, pelo carinho e dedicação. Aos *meus filhos*, ***Gabriela Dias Teixeira Zucoloto e Tiago Dias Zucoloto***, que sempre me apoiaram ao longo de toda minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Em meio a tantas pessoas a quem quero agradecer esta conquista, prefiro iniciar agradecendo à **Deus**, pois sem a direção dada por ele este estudo não seria possível. Deus nunca me abandonou nos momentos de necessidade, grata por sempre ser generoso comigo.

Agradeço a **minha família**, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha trajetória acadêmica.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal**, da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT, UNESP Câmpus de Dracena e Ilha Solteira, pela oportunidade oferecida.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio ao Programa.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**, da UNESP Câmpus de Dracena e Ilha Solteira, pelos ensinamentos e formação.

A minha orientadora **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**, que aceitou orientar a minha dissertação de mestrado revelando uma especial delicadeza e atenção no trato. Agradeço aos seus conselhos e sugestões bem como a permanente valorização do trabalho desenvolvido nesta dissertação.

A minha coorientadora, **Profa. Dra. Angela Maria Gonella-Diaza**, da University of Florida, North Florida Research and Education Center, pelo auxílio nos experimentos e pela imensa colaboração científica na realização deste estudo. Sem o seu apoio esse projeto de pesquisa não teria sido concluído com êxito.

A **Ms. Isabella Rio Feltrin**, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências, da UNESP Câmpus de Botucatu, pela colaboração na análise estatística dos dados.

A ADISSEO a Bluestar Company, em especial **Dra. Fernanda Lopes e Dr. Ricardo Rocha**, pela cooperação científica e doação da metionina protegida, desta forma auxiliando também financeiramente este projeto.

À querida amiga e professora, **Daniela Costa Pereira**, toda a minha gratidão.

Aos meus colaboradores, **Saara Scolari Scaramuzza**, **Letícia de Oliveira**, **Tiago Dias Zucoloto** e **Carlos Henrique Sousa**, que contribuíram no planejamento e execução dos experimentos desenvolvidos. Graças a vocês a minha trajetória foi mais gratificante.

Ao médico veterinário **Rafael Alarcon Guimarães** pela competência nas aspirações realizadas, e ao técnico **Gabriel Luiz Ribeiro** pela cuidadosa avaliação e classificação dos oócitos.

Ao médico veterinário, **Augusto Fontana Pereira de Souza**, pela cuidadosa transferência de embriões realizada neste estudo, chave para que tudo decorresse da melhor maneira possível.

Ao **Diogo Bianchi**, proprietário da Senepol 3B, fundamental para o desenvolvimento do projeto, pela atenção dispendida ao longo de todo trabalho.

Ao **Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE)** e a todos os seus integrantes. Agradeço o apoio de todos os membros.

“Nós somos o que fazemos repetidas vezes. Portanto, a excelência não é um ato, mas um hábito.”

Aristóteles

RESUMO

A metionina é um aminoácido essencial para o desenvolvimento dos oócitos e embriões, uma vez que é precursora de polipeptídeos e atua na regulação da tradução, metilação do DNA e equilíbrio antioxidante. Alterações na metilação do DNA de oócitos e embriões, hipermetilação ou hipometilação de genes específicos, podem favorecer a produção *in vitro* de embriões (PIVE). O estudo foi dividido em dois experimentos objetivando avaliar não só qualidade de oócito e embrião como também taxa de prenhez. Com isso, a hipótese é que a suplementação com metionina protegida no rúmen (MPR; Smartamine M® - Adisseo Brasil) em vacas doadoras de oócitos, na dose diária de 15 gramas/doadora/dia, durante os 14 dias que antecedem a aspiração folicular (OPU), aumenta os índices da PIVE e a taxa de prenhez após a transferência de embrião em tempo fixo (TETF). Objetivou-se comparar o efeito da suplementação oral com MPR em vacas doadoras de oócitos no número de CCOs recuperados, taxa de clivagem, taxa de conversão de CCOs em blastocistos no D7 (*Experimento 1*) e a taxa de prenhez após TETF (*Experimento 2*). No Experimento 1, vacas da raça Senepol, sem bezerro ao pé, não lactantes, foram divididas equitativamente de acordo com a idade, escore de condição corporal (ECC) e nível de produção de embriões *in vitro*, baseado em histórico prévio como doadoras de oócitos, em dois grupos: suplementação com MPR na dose diária de 15 gramas/doadora/dia, durante os 14 dias que antecedem a OPU (MPR; n=26) ou não suplementadas com MPR (CON; n=26), compreendendo para tanto um total de seis repetições. Utilizou-se um delineamento crossover, onde o intervalo entre a OPU e o início de um novo tratamento, foi de 30 dias. Após a OPU, a PIVE foi realizada em um sistema convencional onde avaliou-se os parâmetros relacionados a tal produção. No Experimento 2, as doadoras de oócitos foram submetidas aos mesmos tratamentos do Experimento 1, onde foram suplementadas com MPR (MPR; n=19 doadoras) ou não (CON; n=19 doadoras), após a OPU procedeu-se a PIVE e os embriões no D7 (n= 147) provenientes de doadoras não tratadas com MPR (CON; n=62 embriões) ou tratadas com MPR (n=85 embriões) foram transferidos às receptoras de embriões previamente sincronizadas por um protocolo convencional de TETF. Não houve diferença entre o Grupo CON e Grupo MPR para o número de CCOs totais recuperados /doadora ($34,6842 \pm 3,2687$ vs. $34,7894 \pm 3,6197$; $P = 0,6690$); número de CCOs viáveis recuperados/doadora ($29,2105 \pm 3,5930$ vs. $29,6315 \pm 3,5992$; $P = 0,7514$); taxa de CCOs recuperados viáveis ($72,2659 \pm 5,2779$ vs. $70,4465 \pm 6,0910\%$; $P = 0,6908$); taxa de clivagem ($65,8627 \pm 5,9443$ vs. $68,7473 \pm 6,8064\%$; $P = 0,5692$); taxa de conversão de CCOs em blastocistos viáveis no D7 ($23,7181 \pm 4,4780$ vs. $28,3952 \pm 4,6178\%$; $P = 0,3082$) e número de blastocistos produzidos no D7/doadora ($9,8636 \pm 1,6187$ vs. $10,0869 \pm 1,5411$; $P = 0,6682$). A taxa de prenhez não diferiu em receptoras que receberam embriões do Grupo CON comparado ao MPR [46,77% (29/62) vs. 51,76% (44/85); $P = 0,5513$]. Conclui-se que a suplementação com metionina em doadoras de oócitos não aumenta eficiência na produção *in vitro* de embriões e a taxa de prenhez após TETF.

Palavras chaves: Fecundidade. Embriões. Metilação de DNA. Bovinos.

ABSTRACT

Methionine is an essential amino acid for the development of oocytes and embryos, since it is a precursor of polypeptides and acts in the regulation of translation, DNA methylation and antioxidant balance. Alterations in the DNA methylation of oocytes and embryos, hypermethylation or hypomethylation of specific genes, may favor the in vitro production of embryos (IVP). The hypothesis is that oral supplementation with rumen-protected methionine (RPM; Smartamine M® - Adisseo Brazil) in oocyte donor cows, at a daily dose of 15 grams/donor/day during the 14 days prior to follicular aspiration (OPU), increases the number of total cumulus oocyte complex (COCs) recovered, number of viable COCs recovered, rate of recovered viable COCs, cleavage rate, rate of conversion of COCs to blastocysts on D7, number of blastocysts produced on D7 and the pregnancy rate after fixed-time embryo transfer (FTET). The aim of this study was to compare the effect of oral RPM supplementation in oocyte donor cows on the number of total COCs recovered, the number of viable COCs recovered, the rate of viable COCs recovered, the cleavage rate, the rate of conversion of COCs into blastocysts on D7, number of blastocysts produced in D7 (Experiment 1) and the pregnancy rate after FTET (Experiment 2). In Experiment 1, Senepol cows single, non-lactating, were equally divided according to age, body condition score (BCS) and in vitro embryo production level, based on history as oocyte donors, into two groups: supplementation with RPM at a daily dose of 15 grams/donor/day, orally, during the 14 days prior to OPU (RPM; n=26) or not supplemented with RPM (CON; n= 26) comprising for both a total of six repetitions. A crossover design was used, where the interval between OPU and the start of a new treatment was 30 days. After OPU, in vitro IVP was performed in a conventional system where the parameters related to such production were evaluated. In Experiment 2, oocyte donors were submitted to the same treatments as in Experiment 1, where they were supplemented (RPM; n=19) or not with MPR (CON; n=19), after OPU and IVP and embryos on D7 (n=147) from donors not treated with MPR (CON; n = 62 embryos) or treated with MPR (MPR; n=85 embryos) were transferred to previously synchronized embryo recipients by a conventional protocol of FTET. There was no difference between the Control Group and MPR for the number of total COCs recovered /donor (34.6842 ± 3.2687 vs. 34.7894 ± 3.6197 ; $P = 0.6690$); number of recovered viable COCs/donor (29.2105 ± 3.5930 vs. 29.6315 ± 3.5992 respectively; $P = 0.7514$); rate of recovered viable COCs ($72.2659 \pm 5.2779\%$ vs. $70.4465 \pm 6.0910\%$; $P = 0.6908$); cleavage rate (65.8627 ± 5.9443 vs. $68.7473 \pm 6.8064\%$; $P = 0.5692$); conversion rate of into viable blastocysts on D7 (23.7181 ± 4.4780 vs. $28.3952 \pm 4.6178\%$; $P = 0.3082$) and number of blastocysts produced on D7/donor (9.8636 ± 1.6187 vs. 10.0869 ± 1.5411 ; $P = 0.6682$). Pregnancy rate did not differ in recipients receiving embryos to Control Group compared to MPR [46,77% (29/62) vs. 51,76% (44/85); $P = 0,5513$]. It is concluded that methionine supplementation in oocyte donors does not increase efficiency in vitro embryo production and pregnancy rate after FTET.

Keywords: Fecundity. Embryos. DNA Methylation. Cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo hipotético do estudo. A suplementação com metionina em vacas doadoras de oócitos, na dose diária de 15 gramas/animal/dia, fornecida via oral junto a uma ração concentrada durante os 14 dias que antecedem a aspiração folicular (OPU), aumenta o número de complexo cumulus oócito (CCOs) totais recuperados, número de CCOs viáveis recuperados, taxa de COCs recuperados viáveis, taxa de clivagem, taxa de conversão de CCOs em blastocistos no D7 e o número de blastocistos produzidos no D7 (Experimento 1) e a taxa de prenhez após a TETF (Experimento 2).....18

Figura 2 - Processo de metilação do DNA. As enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) catalisam a transferência de um grupo metil (-CH₃) da S-adenosil-L-metionina (SAM) em (desoxi)citosina, produzindo S-adenosil-L-homocisteína (SAH) e 5-metil-citosina..... 21

Figura 3 - Modo de ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) na fita de DNA e nas metilações. A) Manutenção do padrão de metilação após a replicação do DNA, onde a DNMT1 promove a metilação na fita de DNA hemimetilada (ou seja, que contém metilação em apenas um dos filamentos). B) Ocorrência de metilação de novo, onde as enzimas DNMT3A e DNMT3B promovem metilações na dupla fita de DNA não metilada..... 22

Figura 4 - Delineamento do Experimento 1. Doadoras de oócitos da raça Senepol, foram suplementadas ou não com MPR durante os 14 dias que antecederam a aspiração folicular (D0 ao D14; D0 = primeiro dia de suplementação com metionina), com um total de 26 animais por grupo, em um delineamento “crossover”, divididos em seis repetições; no D8 as doadoras receberam 0,5mg de PGF2 α e 2mg de benzoato de estradiol (BE) ambos via intramuscular; amostras de sangue foram coletadas no D-1, D7 e D14; a aspiração folicular (OPU) foi realizada no D14 e os oócitos foram submetidos ao processo de produção *in vitro* de embriões até o 7º dia após a fertilização (D7).....33

Figura 5 - Delineamento do Experimento 2. Doadoras de oócitos da raça Senepol, foram suplementadas ou não com MPR durante os 14 dias que antecederam a aspiração folicular (D0 ao D14; D0 = primeiro dia de suplementação com metionina), com um total de 19 animais por grupo, em um delineamento “crossover”, divididos em quatro repetições; no D8 as doadoras receberam 0,5mg de PGF2 α e 2mg de benzoato de estradiol (BE) ambos via intramuscular; a aspiração folicular (OPU) foi realizada no D14 e os oócitos foram submetidos ao processo de produção *in vitro* de embriões até o 7º dia após a fertilização (D7) blastocistos no D7 (n=147) advindos de doadoras tratadas com metionina (MPR; n = 85 embriões) ou não tratados (CON; n = 62 embriões) foram transferidos às receptoras por TETF.....42

Figura 6 - Taxa de prenhez (número de receptoras prenhas / número de receptoras que receberam um embrião X 100) aos 23 dias após a TETF em receptoras (n=147) que receberam embriões produzidos *in vitro* oriundos de doadoras suplementadas com metionina (MPR; n= 85 embriões) ou não (CON; n= 62).....50

Figura 7 - Sumarização dos resultados obtidos nos experimentos 1 e 2..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da ração concentrada – níveis de garantia. Produzida por: Cooperativa Agropecuária de Pedrinhas Paulista – SP.....35

Tabela 2 - Experimento 1. Média $\pm$ erro padrão do número CCOs recuperados/doadora, número de CCOs totais recuperados viáveis recuperados/doadora, taxa de CCOs recuperados viáveis (%); taxa de clivagem (%), taxa de conversão de CCOs em blastocistos no D7 (%) e número de blastocistos produzidos no D7/doadora; provenientes de doadoras de oócitos da raça Senepol não suplementadas (Grupo Controle; n = 26) ou suplementadas com 15g/animal/dia de MPR (Grupo Metionina; n = 26) via oral, durante os 14 dias que antecederam a aspiração folicular.....49

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CCOs	Complexos <i>cumulus oócit</i> os
CpG	Pares de Citosina-fosfato-Guanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
DPBS	Tampão fosfato de Dulbecco-salino
ECC	Escore de Condição Corporal
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
HDACs	Histonas deacetilases
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
LH	Hormônio luteinizante
MBD	Ligação “Methyl- CpG-binding domain”
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPR	Metionina Protegida no Rúmen
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
m5Cyt	5 metil-citosina
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
O ₂	Oxigênio
OPU	Aspiração folicular por Ovum Pick-up
PDR	Proteína Degradável no Rúmen
PGF2 α	Prostaglandina
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
RNAseq	RNA sequencial
SAH	S-adenosil-L-homocisteína
SAM	Cofator enzimático S-adenosil-L-metionina
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Synthetic Oviduct Fluid
TETF	Transferência de embrião em tempo fixo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
g	Gramas
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
mmHg	Miligramas de mercúrio
min	Minutos
mm	Milímetros
UI	Unidades Internacionais
μl	Microlitros
μg	Microgramas
μl	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 HIPÓTESE.....	18
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1 Metilação do DNA.....	20
4.2 Características da Metionina	24
4.3 Uso da Metionina em Ruminantes	25
4.4 Impactos do Uso de MPR na Produção	27
4.5 Impactos do Uso de MPR na Reprodução	28
4.6 Influência da Metionina no Desenvolvimento Embrionário	30
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 Experimento 1	32
5.1.1 Local do experimento	32
5.1.2 Animais	32
5.1.3 Delineamento experimental.....	32
5.1.4 Sincronização da onda de crescimento folicular nas doadoras de oócitos.....	34
5.1.5 Tratamentos <i>in vivo</i>	34
5.1.6 Coleta de sangue	35
5.1.7 Aspiração folicular <i>in vivo</i> guiada por ultrassom.....	36
5.1.8 Coleta de fluído folicular	37
5.1.9 Identificação dos CCOs.....	37
5.1.10 Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	38
5.1.11 Fertilização <i>in vitro</i>	38

5.1.12 Cultivo de embriões <i>in vitro</i>	39
5.1.13 Análise estatística	39
5.2 Experimento 2	40
5.2.1 Local do experimento	40
5.2.2 Animais	40
5.2.3 Delineamento experimental	41
5.2.4 Sincronização da onda de crescimento folicular nas doadoras de oócitos	42
5.2.5 Aspiração folicular <i>in vivo</i> guiada por ultrassom	43
5.2.6 Identificação dos CCOs	43
5.2.7 Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos	44
5.2.8 Fertilização <i>in vitro</i>	45
5.2.9 Cultivo de embriões <i>in vitro</i>	45
5.2.10 Protocolo de sincronização da ovulação nas receptoras	46
5.2.11 Transferência de embriões em tempo fixo (TETF)	46
5.2.12 Diagnóstico de prenhez	47
5.2.13 Análise estatística	47
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	53
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

Biotécnicas como a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) e a Transferência de Embriões em Tempo Fixo (TETF), constituem ferramentas poderosas na multiplicação de animais geneticamente superiores, tecnologias que estão sendo aplicadas de maneira crescente nos últimos anos. A IATF possibilita a uma matriz bovina gerar 1 bezerro/ano, a TETF com embriões produzidos *in vivo* (PIVE) possibilita a matriz gerar 1 bezerro/mês e a TETF com embriões produzidos *in vitro* possibilita gerar 1 bezerro/semana. Assim quando se pretende multiplicar rapidamente a genética materna, reduzindo drasticamente o intervalo entre gerações, a TETF aliada a produção *in vitro* de embriões torna-se exímia em tal multiplicação.

A PIVE envolve as etapas de maturação de oócitos *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo dos embriões *in vitro* (CIV). A eficiência das etapas de MIV e FIV é semelhante à obtida *in vivo*, entretanto a CIV é limitante, considerando que apenas 40,8% dos oócitos cultivados tornam-se blastocistos (DALL'ACQUA *et al.*, 2018). Além disso, os blastocistos gerados na PIVE ainda determinam menores taxas de prenhez e são menos resistentes à criopreservação quando comparados aos produzidos *in vivo* (MELLO *et al.*, 2016). Constatou-se que embriões produzidos *in vitro* possuem alterações epigenéticas quando comparados aos embriões produzidos *in vivo* (CANOVAS *et al.*, 2017) e que estas podem influenciar o desenvolvimento dos embriões e até mesmo na saúde dos mesmos após o nascimento (BOUILLON *et al.*, 2016).

O desenvolvimento embrionário, particularmente no período pré-implantação, é altamente dependente do microambiente uterino. A nutrição materna interfere em tal microambiente, determinando ações diretas no oócito e do embrião. Groebner *et al.* (2011) relatam que os aminoácidos constituem um elemento nutricional essencial no desenvolvimento embrionário e fetal, estando presentes no fluido ovidutal, histotrofo e nos fluidos amnióticos e alantóicos. Segundo Burdge *et al.* (2007), em tal período pode ocorrer alterações epigenéticas no genoma oocitário e embrionário, como a metilação do DNA; que determinam mudanças permanentes no fenótipo do indivíduo.

A suplementação com metionina, durante o desenvolvimento folicular e desenvolvimento embrionário até 7 dias, modifica a expressão gênica do embrião.

Penagaricano *et al.* (2013), relataram que um aumento sutil de metionina na dieta materna causou mudanças notáveis no transcriptoma de embriões pré-implantação. Tais descobertas apoiam a ideia de que a maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial são períodos particularmente sensíveis a mudanças na nutrição materna, especialmente em relação à metionina. No estudo em questão, vacas holandesas foram aleatoriamente designadas para um dos dois tratamentos diferindo no nível de metionina na dieta (Controle, 1,89% vs. 2,43% de metionina em relação a proteína metabolizável), desde o parto até o desenvolvimento do embrião. Esses embriões foram posteriormente analisados por sequenciamento de RNA. Foram analisados 10.662 genes e destes 276 apresentaram expressão diferencial entre os tratamentos, onde os genes mais significativos estavam relacionados ao desenvolvimento embrionário e à resposta imune. Os mesmos autores verificaram que embora os embriões não tenham diferido entre os grupos quanto a aparência morfológica, estágio de desenvolvimento e qualidade, os grupos demonstraram diferenças transcriptômicas significativas.

A metionina é um aminoácido de oferta limitante para fêmeas bovinas, considerando que a metionina livre contida na dieta é rapidamente e quase totalmente degradada pelos microrganismos durante a passagem da mesma pelo rúmen. Ainda deve-se considerar que a metionina é um aminoácido também limitante na composição da proteína microbiana, considerando esta ser a principal fonte de proteína para os animais ruminantes.

No intuito de aumentar a disponibilidade de metionina ao organismo, pode-se estrategicamente proteger a metionina da ação dos microrganismos ruminais. Assim, a indústria da nutrição animal desenvolveu a metionina protegida no rúmen (MPR), que passa pelo rúmen oferecendo dificuldades de ser disponibilizada aos microrganismos. Verificou-se que a suplementação oral com MPR aumenta as concentrações de metionina na corrente sanguínea (ORDWAY *et al.*, 2009).

Embora a PIVE esteja estabelecida como biotécnica, atualmente busca-se por melhores condições de cultivo que possam incrementar o número de embriões produzidos em relação ao número de CCO cultivados além de aumentar o êxito na porcentagem de prenhez em relação ao número de embriões transferidos. Hansen *et al.* (2023) (*dados não publicados*) verificaram que oócitos coletados de doadoras Brahman coletados por meio de OPU submetidos a PIVE, a suplementação do meio de cultivo dos embriões com 1,8mM de colina promoveu após o nascimento dos

produtos, um aumento ($P = 0,0477$) no peso dos bezerros desmamados, quando o peso foi ajustado aos 205 dias, caracterizando um incremento no peso dos bezerros desmamado de 9% em relação ao grupo controle. Na sequência, os mesmos autores verificaram que em vacas tratadas com MPR, oferecida via oral na dose de 15 gramas/cabeça/dia; as concentrações plasmáticas de metionina foram aumentadas comparada ao grupo controle. Quando vacas foram suplementadas durante 14 dias com metionina protegida, oferecida via oral na dose de 15 gramas/cabeça/dia 7 dias antes e 7 dias após à IATF, os bezerros nascidos também tiveram maior peso ao desmame. No momento, especula-se que tal suplementação quando realizada em doadoras de oócitos poderia aumentar a produção de embriões produzidos *in vitro*, assim como a taxa de prenhez após a transferência do mesmo à receptora, além de modificar o padrão de metilação de oócitos e embriões favorecendo o incremento do peso dos bezerros nascidos à desmama.

Vale ressaltar ainda, de acordo com Ikeda *et al.* (2012) em um estudo realizado administrando diferentes quantidades de etionina, um antagonista da metionina, no meio de cultivo de embriões produzidos por meio da PIVE. Os mesmos autores observaram que a interrupção do metabolismo da metionina causa comprometimento da transição mórula para blastocisto durante o desenvolvimento pré-implantação bovina e além disso, pode causar a hipometilação do DNA e dessa forma, levar à expressão alterada de genes importantes para o desenvolvimento resultando no comprometimento do desenvolvimento do blastocisto. Desse modo, é possível notar que aminoácidos como a metionina possuem grande importância no desenvolvimento de blastocistos e posteriormente ao longo de toda a vida do animal.

No presente estudo, o primeiro experimento desenvolvido tinha como objetivo comparar o efeito da suplementação com MPR em vacas doadoras de oócitos na taxa de CCOs recuperados viáveis, taxa de clivagem, taxa de blastocistos produzidos no D7 e taxa de conversão de CCOs em blastocistos no D7. Já o segundo experimento tinha como objetivo comparar o efeito da suplementação via oral com MPR em vacas doadoras de oócitos na taxa de prenhez. A hipótese do estudo foi que a suplementação com MPR em vacas doadoras de oócitos, na dose diária de 15 gramas/doadora/dia, durante os 14 dias que antecedem a aspiração folicular (OPU), aumenta o número de blastocistos produzidos no D7 (D0 = dia da fertilização), a taxa de conversão de complexos *cumulus* oócitos (CCOs) em blastocisto no D7 e a taxa de prenhez após TETF.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação com metionina em doadoras de oócitos não aumenta eficiência na produção *in vitro* de embriões e a taxa de prenhez após TETF.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. **Beef Report**: perfil da pecuária no Brasil. 2023. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-01/>. Acesso em: 20 maio 2023.

ABIEC. **Beef Report**: perfil da pecuária no Brasil. 2022. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/>. Acesso em: 10 dez. 2022.

ACOSTA, D. A. V.; DENICOL, A. C.; TRIBULO, P.; RIVELLI, M. I.; SKENANDORE, C.; ZHOU, Z.; CARDOSO, F. C. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on the preimplantation embryo in Holstein cows. **Theriogenology**, [s.l.], v. 85, n. 9, p. 1669-1679, 2016.

ALEDO, J. C. Methionine in proteins: the Cinderella of the proteinogenic amino acids. **Protein Science**, [s.l.], v. 28, n. 10, p. 1785-1796, 2019.

ALI, C.; SHARIF, M.; NISA, M.; JAVAID, A.; HASHMI, N.; SARWAR, M. Supplementation of ruminally protected proteins and amino acids: feed consumption, digestion and performance of cattle and sheep. **Int. J. Agricult. Biol.**, [s.l.], v. 11, p. 477–482, 2009.

ANVAR, Z.; CHAKCHOUK, I.; DEMOND, H.; SHARIF, M.; KELSEY, G.; VAN DEN VEYVER, I. B. DNA methylation dynamics in the female germline and maternal-effect mutations that disrupt genomic imprinting. **Genes (Basel)**, [s.l.], v. 12, n. 8, p. 1214, ago. 2021.

ARDALAN, M.; REZAYAZDI, K.; DEHGHAN-BANADAKY, M. Investigation on the effect of supplementing rumen-protected forms of methionine and choline on health situation and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Pak J Biol Sci.**, [s.l.], v. 12, p. 69–73, 2009.

BERNSTEIN, L. R., MACKENZIE, A. C., KRAEMER, D. C., MORLEY, J. E., FARR, S., CHAFFIN, C. L., MERCHENTHALER, I. Shortened estrous cycle length, increased FSH levels, FSH variance, oocyte spindle aberrations, and early declining fertility in aging senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) mice: concomitant characteristics of human midlife female reproductive aging. **Endocrinology**, [s.l.], v. 155, n. 6, 2014.

BONILLA, L.; LUCHINI, D.; DEVILLARD, E.; HANSEN, P. J. Methionine requirements for the preimplantation bovine embryo. **Journal of Reproduction and Development**, [s.l.], v. 56, n. 5, p. 527-532, 2010.

BOUILLON, C.; LÉANDRI, R.; DESCH, L.; ERNST, A.; BRUNO, C.; CERF, C.; FAUQUE, P. Does embryo culture medium influence the health and development of children born after in vitro fertilization? **PLoS One**, [s.l.], v. 11, n. 3, e0150857, 2016.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E.; BERTOLO, R. F. P.; BRUNTON, J. A. Methionine: a metabolically unique amino acid. **Livest Sci.**, [s.l.], v. 112, n. 1–2). p. 2–7, 2007.

BURDGE, G. C.; HANSON, M. A.; SLATER-JEFFERIES, J. L.; LILLYCROP, K. A. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? **British Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 97, p. 1036–1046, 2007.

CANOVAS, S.; ROSS, P. J.; KELSEY, G.; COY, P. DNA methylation in embryo development: epigenetic impact of ART (assisted reproductive technologies). **Bioessays**, [s.l.], v. 39, n. 11, 2017.

CHMURZYNSKA, A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. **Nutrition reviews**, [s.l.], v. 68, n. 2, p. 87-98, 2010.

CHALUPA W. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. **J Dairy Sci.**, [s.l.], v. 58, n. 8, p. 1198–1218, 1975.

CHUNG, Y. H.; BATEMAN, H. G.; WILLIAMS, C. C.; STANLEY, C. C.; GANTT, D. T.; BRAUD, T. W.; SOUTHERN, L. L.; WARD, J. D.; HOYT, P. G.; SOD, G. A. Effects of methionine and lysine on fermentation in vitro and in vivo, nutrient flow to the intestine, and milk production. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 89, n. 5, p. 1613-20, . 2006.

DALL'ACQUA, P. C.; NUNES, G. B.; SILVA, C. R.; FONTES, P. K.; NOGUEIRA, M. F. G.; MINGOTI, G. Z. Effect of pre-maturation culture using EGFR kinase inhibitor on embryo development, lipid metabolism and gene expression profile. **Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018)**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 1115, 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Brasil e o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo diz estudo**. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil>. Acesso em: 20 out. 2021.

FERREIRA, S. F.; LEITE, M. A. S.; TODESCATTI, S. R.; FERREIRA, A. C. F. Metionina e análogos na nutrição de bovinos. **Ciência Animal**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 130-144, 2018.

GAD, A.; HOELKER, M.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; CINAR, U.; RINGS, F.; TESFAYE, D. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. **Biology of Reproduction**, [s.l.], v. 87, n. 4, p. 100-101, 2012.

GAO, L. L.; WANG, Z. Y.; ZHENG, L. I.; ZHANG, C. X.; ZHANG, D. Q. The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumuglin sheep). **Journal of Integrative Agriculture**, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 704-711, 2018.

GREENWOOD, R.; TITGEMEYER, E. Limiting amino acids for growing Holstein steers limit-fed soybean hull- based diets. **J. Anim. Sci.**, [s.l.], v. 78, n. 7, p. 1997–2004, 2000.

GROEBNER, A. E.; RUBIO-ALIAGA, I.; SCHULKE, K.; REICHENBACH, H. D.; DANIEL, H.; WOLF, E. Increase of essential amino acids in the bovine uterine lumen

during preimplantation development. **Reproduction**, [s.l.], v. 141, n. 5, p. 685–695, 2011.

HAMILTON, J. P. Epigenetics: principles and practice. **Dig Dis.**, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 130-135, 2011.

HUGENTOBLE, S. A.; DISKIN, M. G.; LEESE, H. J.; HUMPHERSON, P. G.; WATSON, T.; SREENAN, J. M.; MORRIS, D. G. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. **Mol. Reprod. Dev.**, [s.l.], 74: 445–454. 2007.

IKEDA, S.; SUGIMOTO, M.; KUME, S. Importance of methionine metabolism in morula-to-blastocyst transition in bovine preimplantation embryos. **J. Reprod. Dev.** [s.l.], v. 58, n. 1, p. 91-97, 2012. DOI 10.1262/jrd.11-096h

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat. Genet.**, [s.l.], v. 33 (Suppl), p. 245–254, 2003.

KAMALAK, A.; CANBOLAT, O.; GURBUZ, Y.; OZAY, O. Protected protein and amino acids in ruminant nutrition. **KSU J Sci Eng.**, [s.l.], v. 8, p. 84–88, 2005.

KENNEDY, L. G. BOLAND, M.P.; GORDON, I. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. **Theriogenology**, [s.l.], v. 19, p. 823-832, 1983.

KOENIG, K.; RODE, L. Ruminal degradability, intestinal disappearance, and plasma methionine response of rumen-protected methionine in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 84, n. 6, p. 1480–1487, 2001.

KURAN, M.; ROBINSON, J. J.; BROWN, D. S.; MCEVOY, T. G. Development, amino acid utilization and cell allocation in bovine embryos after *in vitro* production in contrasting culture systems. **Reproduction**, [s.l.], v. 124, p. 155–165, 2002.

LAN, X.; CRETNEY, E. C.; KROPP, J.; KHATEEB, K.; BERG, M. A.; PEÑAGARICANO, F.; KHATIB, H. Maternal diet during pregnancy induces gene expression and DNA methylation changes in fetal tissues in sheep. **Frontiers in genetics**, [s.l.], v. 4, n. 49, 2013.

LIM, J. C.; YOU, Z.; KIM, G.; LEVINE, R. L. Methionine sulfoxide reductase A is a stereospecific methionine oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 108, n. 26, p. 10472-10477, 2011.

LIU, L.; AMORÍN R.; MORIEL, P.; DILORENZO, N.; LANCASTER, P.A.; PEÑAGARICANO, F. **Maternal methionine supplementation during gestation alters alternative splicing and DNA methylation in bovine skeletal muscle.** [S.l.]: BMC Genomics, 2021.

LOERCH, S. C.; OKE, B. Rumen protected amino acids in ruminant nutrition. In Friedman M, ed. **Absorption and Utilization of Amino Acids**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 187–200.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 48-53, 1994.

MACKAY, D. S.; BROPHY, J. D.; MCBREAIRTY, L. E.; MCGOWAN, R. A.; BERTOLO, R. F. Intrauterine growth restriction leads to changes in sulfur amino acid metabolism, but not global DNA methylation. Yucatan miniature piglets. **J. Nutr. Biochem.**, [s.l.], v. 23, n. 9, p. 1121–1127, 2012.

MAHER, E. R.; AFNAN, M.; BARRATT, C. L. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs? **Human Reproduction**, [s.l.], v. 18, n. 12, p. 2508-2511, 2003.

MALDONADO, M. B. C.; FELTRIN, I. R.; MENDES, A. F.; MEMBRIVE, C. M. B. Epigenética: a ciência que está reescrevendo o conceito da genética. *In*: MEMBRIVE, C.; BERNARDES, E. M.; ROSAS, F. S.; FONSECA, R. (Org.). **IMAST 2021: III International Meeting of Agrarian Science and Technology: atualidades nas ciências agrárias: mudanças, tendências e impactos**. Dracena: Ladri, 2021. 324–339.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G. De; MELLO, M. R. B. De; PALHANO, H. B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s.l.], v. 40, n. 2, 2016. Acesso em: 10 abr. 2023.

METAYER, S.; SEILIEZ, I.; COLLIN, A. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. **J. Nutr. Biochem.**, [s.l.], v. 19, n. 4, p. 207–215, 2008.

MISCIATTELLI, L.; KRISTENSEN, V.; VESTERGAARD, M.; WEISBJERG, M. R.; SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T. Milk production, nutrient utilization, and endocrine responses to increased postruminal lysine and methionine supply in dairy cows. **J. Dairy Sci.** [s.l.], v. 86, n. 1, p. 275–286, 2003.

MURIEL, P. S-adenosyl-L-methionine prevents and reverses erythrocyte membrane alterations in cirrhosis. **J. Appl. Toxicol.**, [s.l.], v. 13, p.179–182, 1993.

NOFTSGER, S.; ST-PIERRE, N.; SYLVESTER, J. Determination of rumen degradability and ruminal effects of three sources of methionine in lactating cows. **J Dairy Sci.**, [s.l.], v. 88, n. 1, p. 223–237, 2005.

NOUSIAINEN, J.; SHINGFIELD, K.; HUHTANEN, P. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feed- ing. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 87, n. 2, p. 386–398, 2004.

ORDWAY, R. S.; BOUCHER, S. E.; WHITEHOUSE, N. L.; SCHWAB, C. G.; SLOAN, B. K. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 92, p. 5154-66, 2009.

PENAGARICANO, F.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D. Effect of maternal methionine supplementation on the transcriptome of bovine preimplantation embryos. **PLOS One**, [s.l.], v. 8, n. 8, e72302, 2013.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, [s.l.], v. 293, n. 5532, p. 1089-1093, 2001.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Dev.**, [s.l.], v. 61, p. 234–248, 2002.

ROBERT, J.; RICHARD, C.; BOUZA, B. Influence of monomer and dimmer forms of isopropyl ester of HMB on the supply of metabolizable methionine to the blood of ruminants. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 84, p. 281, 2001.

RULQUIN, H.; GRAULET, B.; DELABY, L.; ROBERT, J. Effect of different forms of methionine on lactational performance of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 89, n. 11, p. 4387–4394, 2006.

SALILEW-WONDIM, D.; FOURNIER, E.; HOELKER, M.; SAEED-ZIDANE, M.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; TESFAYE, D. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed in vivo from embryos completed different stages of development in vitro. **PloS one**, [s.l.], v. 10, n. 11, 2015.

SANTOS, J. E. P.; DEPETERS, E. J.; JARDON, P. W.; HUBER, J. T. Effect of prepartum dietary protein level on performance of primigravid and multiparous Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 84, n. 1, p. 213-224, 2001.

SANTOS, J. E. P.; BILBY, T. R.; THATCHER, W. W.; STAPLES, C. R.; SILVESTRE, F. T. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, [s.l.], v. 43, p. 23-30, 2008.

SCHWAB, C. G.; ORDWAY, R. S. Methionine supplementation options. **Proc. Four-State Applied Nutrition Conference**, [s.l.], v. 2, 2003.

SINCLAIR, K. D.; ALLEGRUCCI, C.; SINGH, R.; GARDNER, D. S.; SEBASTIAN, S.; BISPHAM, J.; YOUNG, L. E. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 104, n. 49, p. 19351-19356, 2007.

SOCHA, M. T.; PUTNAM, D. E.; GARTHWAITE, B. D.; WHITEHOUSE, N. L.; KIERSTEAD, N. A.; SCHWAB, C. G.; ROBERT, J. C. Improving intestinal amino acid supply of pre-and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 88, n. 3, p. 1113-1126, 2005.

TOLEDO, M. Z.; BAEZ, G. M.; GARCIA-GUERRA, A. Effect of feeding rumen-protected methionine on productive and reproductive performance of dairy cows. **PLOS One**, [s.l.], v. 12, n. 12, e0189117, 2017.

WANG, J.; WU, Z.; LI, D.; LI, N.; DINDOT, S. V.; SATTERFIELD, M. C.; BAZER, F. W.; WU, G. Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. **Antioxid Redox Signal**, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 282-301, 2012.

WATERMAN, R. C.; LOEST, C. A.; BRYANT, W. D.; PETERSEN, M. K. Supplemental methionine and urea for gestating beef cows consuming low quality forage diets. **J. Anim. Sci.**, [s.l.], v. 85, n. 3, p. 731–736, 2007.

WEISSBACH, H.; ETIENNE, F.; HOSHI, T.; HEINEMANN, S. H.; LOWTHER, W. T.; MATTHEWS, B.; BROT, N. Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 397, n. 2, p. 172-178, 2002.

WILLKE, T. Methionine production: a critical review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 98, n. 24, p. 9893–9914, 2014.

WU, G.; BAZER, F. W.; CUDD, T. A.; MEININGER, C. J.; SPENCER, T. E. Maternal nutrition and fetal development. **J. Nutr.**, [s.l.], v. 134, n. 9, p. 2169–2172, 2004.

WU, G.; BAZER, F. W.; SATTERFIELD, M. C.; LI, X.; WANG, X.; JOHNSON, G. A.; WU, Z. Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. **Amino acids**, [s.l.], v. 45, p. 241-256, 2013.

ZANTON, G. I., BOWMAN, G. R., VÁZQUEZ-AÑÓN, M., RODE, L. M. Meta-analysis of lactation performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or postruminal infusion of methionine. **Journal of Dairy Science**, v.97, n. 11, p. 7085-7101. 2014.