

**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

Prof. 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 fluído 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.

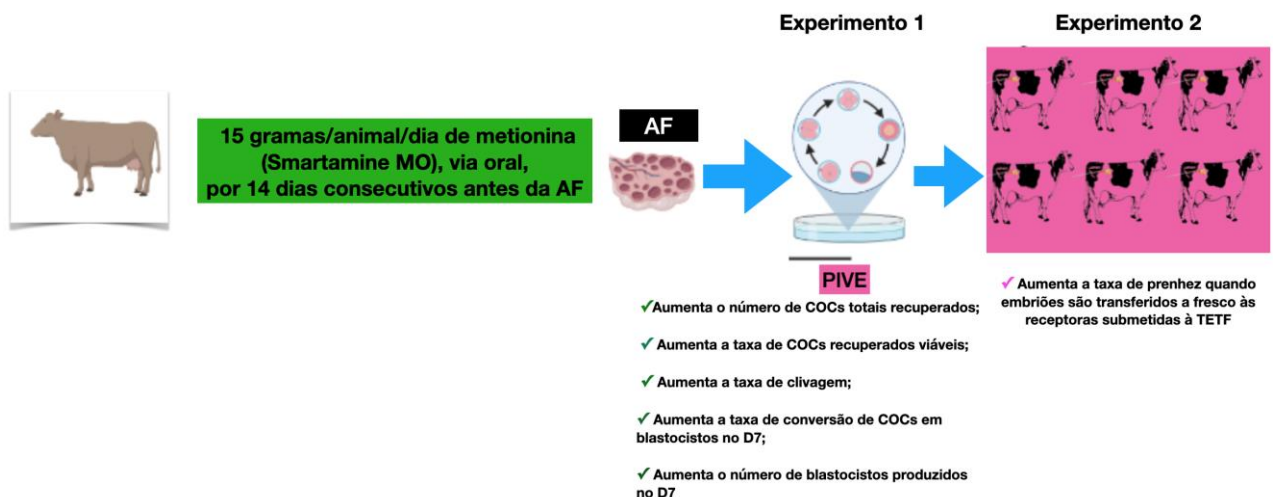
Vale ressaltar ainda, de acordo com Ikeda *et al.* (2012) em um estudo realizado administrando diferentes quantidades de etionina, um antagonista da metionina, no meio de cultivo de embriões produzidos por meio da PIVE. Os mesmos autores observaram que a interrupção do metabolismo da metionina causa 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.

2 HIPÓTESE

Conforme a Figura 1, a hipótese é que a suplementação via oral com MPR em vacas doadoras de oócitos, na dose diária de 15 gramas/doadora/dia, durante os 14 dias que antecedem a OPU, aumenta o número de 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, número de blastocistos produzidos no D7 e a taxa de prenhez após a transferência de embrião em tempo fixo (TETF).

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).



Fonte: Elaborado pela autora.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito da suplementação com MPR em vacas doadoras de oócitos nos diferentes aspectos reprodutivos, tanto em qualidade oocitária como embrionária.

3.2 Objetivos Específicos

Comparar:

- O número de CCOs totais recuperados;
- O número de CCOs viáveis recuperados;
- A taxa de CCOs recuperados viáveis;
- A taxa de clivagem;
- A taxa de conversão de CCOs em blastocistos no D7;
- O número de blastocistos produzidos no D7 (*Experimento 1*);
- A taxa de prenhez após TETF (*Experimento 2*).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Metilação do DNA

Nos últimos anos, foi destacado os efeitos da dieta sobre o controle da expressão gênica (GROEBNER *et al.*, 2011). A epigenética é definida como o estudo dos processos que não dependem exclusivamente da sequência de DNA, porém acarretam um fenótipo herdável, ou seja, processos epigenéticos são aqueles capazes de alterar o fenótipo sem alterar o genótipo, e que são herdáveis. Referem-se ao controle da expressão gênica baseados na organização estrutural da cromatina ao invés de informações da sequência primária do DNA, pois a organização da cromatina exerce função chave na determinação dos padrões de expressão gênica, uma vez que regiões mais condensadas da cromatina são menos acessíveis à transcrição, ou vice-versa (CANOVAS *et al.*, 2017). Assim, dependendo da condensação da cromatina, a mesma sequência de genes pode ser transcricionalmente expressa ou silenciada. Desse modo, a epigenética pode ser considerada imprescindível para a genômica funcional, revolucionando a genética molecular (HAMILTON, 2011).

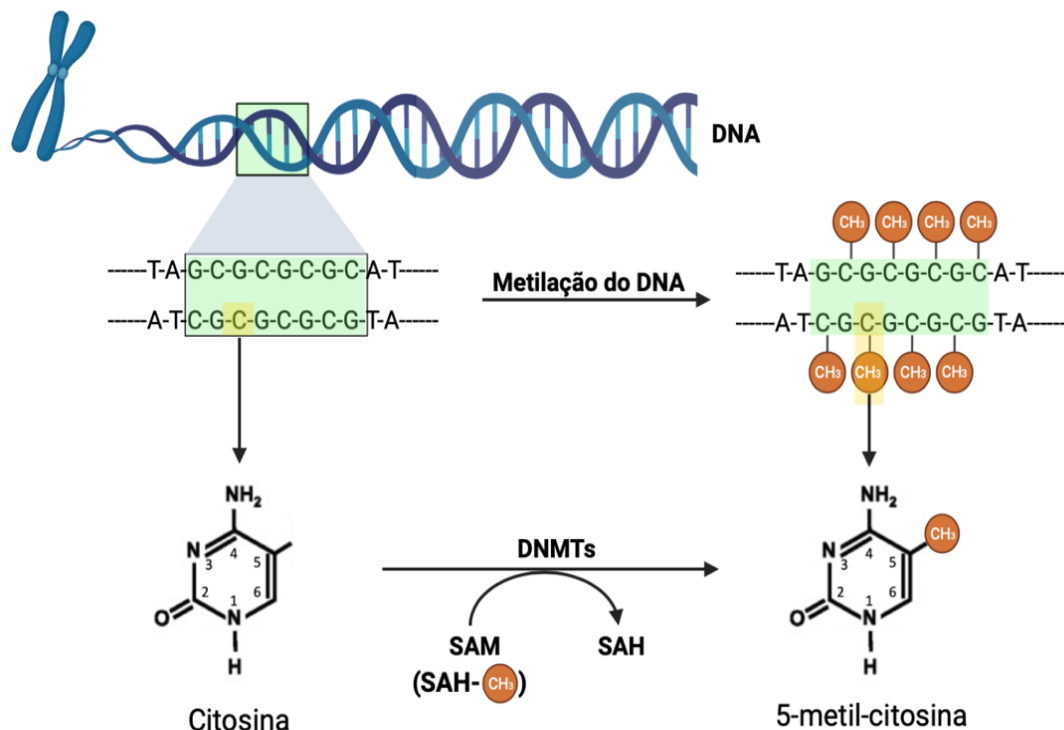
As mudanças na expressão gênica causadas pelos processos epigenéticos são herdáveis pelo processo mitótico e ao longo das gerações. A metilação do DNA é um mecanismo importante para a regulação da expressão gênica e silenciamento gênico assim como na regulação da transcrição. A metilação do DNA depende da disponibilidade de doadores de metil fornecido por aminoácidos como a metionina e por compostos de vias metabólicas do carbono, como a colina, betaína, vitamina B12 e ácido fólico (ANVAR *et al.*, 2021).

A metilação do DNA é um tipo de modificação química que pode ser adicionada ou removida do DNA sem alterar a sua sequência original, e que pode ser herdável. Conforme ilustrado na Figura 2, trata-se da adição de um grupo metil (-CH₃) - ou seja, um átomo de carbono ligado a três átomos de hidrogênio - no carbono 5 do anel pirimídico de citosinas adjacentes a guaninas (dinucleotídeos CpG), transformando-a em 5-metil-citosina (m5Cyt). A m5Cyt foi descoberta no DNA do timo de bezerro há 73 anos (HOTCHKISS, 1948). Segundo Maldonado *et al.* (2021), desde então, a metilação do DNA tem se mostrado uma modificação epigenética fundamental em

muitos processos biológicos tais como no desenvolvimento e na manutenção da estrutura da cromatina; na estabilidade cromossômica; na inativação do cromossomo X nas fêmeas; no “imprinting” genômico e desenvolvimento embrionário.

A metilação do DNA também tem desempenhando um importante papel como regulador epigenético da expressão gênica. Os padrões de metilação são estabelecidos e mantidos nos sítios dinucleotídeos CpG (pares de Citosina-fosfato-Guanina) pelas enzimas da família das DNA metiltransferases (DNMTs). Na metilação, o doador universal do grupamento metil é o cofator enzimático S-adenosil-L-metionina (SAM). As DNMTs catalisam a transferência de um grupo metil (CH₃) da SAM em (desoxi)citosina, produzindo a m5Cyt e S-adenosil-L-homocisteína (SAH) (ANVAR *et al.*, 2021).

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.

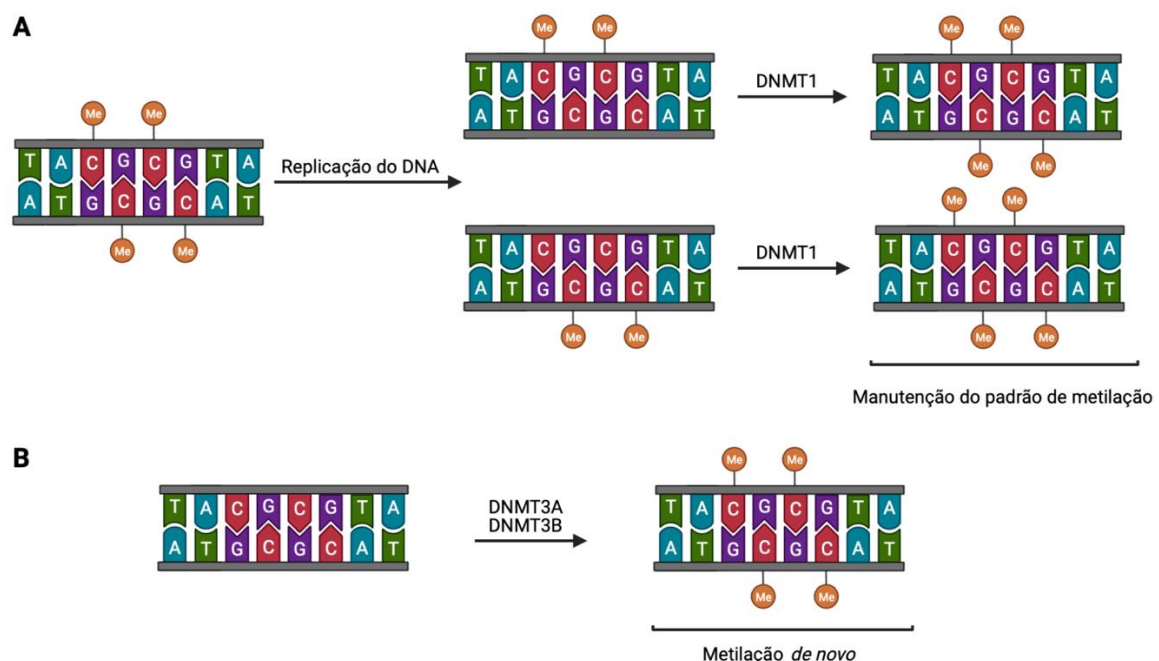


Fonte: Maldonado *et al.* (2021).

Conforme ilustrado na **Figura 3**, segundo Maldonado *et al.* (2021), em mamíferos, foram identificadas três famílias de DNMTs que correspondem a: (1)

DNMT1, composta pelas isoformas somática DNMT1s e oocitária DNMT1o; (2) DNMT2; e (3) DNMT3, composta pelas DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. No processo de metilação do DNA se destacam as DNMT1 e DNMT3A e 3B. A DNMT1s é responsável pela manutenção dos padrões de metilação, pois no momento da replicação do DNA os padrões de metilação não são copiados na nova fita. Assim, essa enzima é responsável por manter os padrões de metilação durante os processos de divisão celular (Figura 3A). A DNMT1o, que é específica do gameta feminino, parece desempenhar um papel importante na manutenção de imprinting genômico (mecanismo de regulação da expressão gênica no qual certos genes são expressos apenas por um dos alelos parentais, enquanto o outro é inativado por metilação) na segunda onda de desmetilação global do genoma, que ocorre após a fecundação. As DNMT3A e 3B são responsáveis pelas novas metilações no DNA (metilação de novo), ou seja, estabelecem novos padrões de metilação (Figura 3B).

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.



A inserção do grupo metil funciona como uma barreira e pode, por exemplo, fazer com que fatores de transcrição (que são proteínas imprescindíveis para a transcrição dos genes) não se liguem a sequência do DNA, afetando a transcrição e, conseqüentemente, a expressão gênica. Em razão disso, a metilação do DNA geralmente está associada ao silenciamento da expressão gênica. O silenciamento dos genes, mediado por metilação, pode ocorrer por meio de mecanismos diretos e indiretos. No mecanismo direto, a metilação impede diretamente, por meio de uma barreira física, a ligação de fatores de transcrição ou modificam o estado de condensação e estrutura da cromatina, causando a inativação do gene. Já no mecanismo indireto, a metilação ocorre em uma região que apresenta domínios de ligação “Methyl- CpG-binding domain” (MBD), que se localizam ao redor de um sítio de regulação da transcrição e que indiretamente atraem as proteínas MBD, que por sua vez recrutam correpressores e histonas deacetilases (HDACs) alterando a configuração da cromatina ao redor do gene, causando o desligamento do mesmo (MALDONADO *et al.*, 2021). A metilação do DNA é funcionalmente e mecanicamente ligada a outros mecanismos epigenéticos, principalmente às modificações de histonas, como, por exemplo, a metilação de lisina nas histonas. Especificamente, a metilação do DNA está correlacionada com a ausência de metilação na lisina 4 da histona 3 (H3K4) e, em menor intensidade, correlacionada com a presença de metilação na lisina 9 da histona 3 (H3K9).

Em mamíferos, as marcas epigenéticas são adquiridas durante a gametogênese e desenvolvimento embrionário inicial, quando a desmetilação e as ondas de metilação estabelecem o epigenoma (WANG *et al.*, 2012). A aquisição da metilação do DNA no oócito é gradual ao longo de seu crescimento e desenvolvimento. Oócitos presentes no folículo primordial antes do início da foliculogênese são praticamente não metilados, e a metilação é adquirida à medida que o oócito aumenta de tamanho, principalmente nos estágios finais do desenvolvimento do folículo (BERNSTEIN *et al.*, 2014). A metionina é um aminoácido essencial da dieta que desempenha múltiplos papéis biológicos, incluindo um aminoácido iniciador na síntese de proteínas eucarióticas, um precursor doador de metil essencial para reações de metilação (S-adenosilmetionina, SAM) e uma fonte de reguladores redox (cisteína e glutatona) (METAYER *et al.*, 2008). A metionina é um precursor doadora de metil, o qual é usado por DNA metiltransferases (DNMTs).

A metilação do DNA por DNMTs é um meio fundamental para a regulação epigenética da expressão gênica e o desenvolvimento pré-implantação de embriões de mamíferos é uma etapa crítica para o estabelecimento do epigenoma e, ao mesmo tempo, é vulnerável a perturbações epigenéticas. Assim, a interrupção do metabolismo da metionina pode causar defeitos epigenéticos nos embriões e, conseqüentemente, afetar seu desenvolvimento (JAENISCHR, 2003).

4.2 Características da Metionina

Uma das exigências nutricionais dos animais ruminantes são os aminoácidos, sendo estes divididos basicamente em essenciais e não essenciais. Como exemplo de aminoácido essencial temos a metionina (GROEBNER, et al, 2011). A metionina é um aminoácido que contém enxofre, este normalmente encontrado em proteínas com a função de dar início à síntese proteica. Estruturalmente, sua cadeia lateral não apresenta ramificações e possui modesta discriminação entre as diferentes conformações, assim como polarizabilidade e versatilidade redox de seu átomo de enxofre. Tais propriedades fazem este aminoácido ideal para interações transientes proteína-proteína, fundamentais para o reconhecimento molecular (ALEDO, 2019).

A metionina é o precursor da metilação celular e da síntese da cisteína (MACKAY *et al.* 2012). Dentre outras funções, a metionina é um antioxidante essencial na regulação do metabolismo celular. A metionina é facilmente oxidada a sulfóxido de metionina por meio de espécies reativas. A oxidação das metioninas ocorre na região exposta à superfície, portanto, possui a função de proteger outros resíduos funcionalmente essenciais de danos oxidativos (WEISSBACH *et al.*, 2002).

Em mamíferos, um códon Met é usado para o início da maior parte da síntese de proteínas, desempenhando um papel essencial em todos os aspectos das funções celulares (BROSNAN *et al.*, 2007). Sabe-se que os embriões podem responder ao seu ambiente e que o estresse, presente durante o início do desenvolvimento embrionário, pode impactar em sua estrutura e função (GAD *et al.*, 2012). Também está bem documentado que indivíduos originados de embriões produzidos *in vitro* são mais propensos a desenvolver doenças relacionadas à epigenética bem como distúrbios metabólicos. Os perfis transcriptômico e epigenético de embriões produzidos *in vitro* são alterados quando os mesmos são comparados aos embriões produzidos *in vivo* (SALILEW-WONDIM *et al.*, 2015).

4.3 Uso da Metionina em Ruminantes

Proteínas são nutrientes essenciais limitantes, especialmente em ruminantes com uma alimentação com forragens de baixa qualidade. As necessidades nutricionais, incluindo proteínas, são variadas de acordo com o estado fisiológico e o nível de produção do animal. Ruminantes possuem requerimentos especiais quanto a proteína degradável no rúmen (PDR) e a proteína não degradável no rúmen (PNDR). A maior parte das proteínas aproveitadas pelos animais ruminantes advém da multiplicação dos microrganismos no rúmen, esta denominada de proteína microbiana (KAMALAK *et al.*, 2005), essa particularmente restrita em metionina. Os microrganismos do rúmen degradam rapidamente a maioria dos aminoácidos em amônia, ácidos orgânicos e dióxido de carbono. A amônia produzida, principal nutriente nitrogenado, é essencial para o crescimento bacteriano. Nos animais ruminantes, apenas o que escapa do processamento dos microrganismos no rúmen ganha a chance de ser digerido no abomaso e intestino delgado (FERREIRA, 2018). A proteção da proteína dietética da degradação microbiana no rúmen permite que aminoácidos não sofram a ação dos microrganismos no rúmen e passem isentos de tal processo até o intestino delgado, assim ampliando o fornecimento de aminoácidos absorvíveis por unidade de energia absorvível (BROSANAN *et al.*, 2007).

Diversos fungos, bactérias e plantas são capazes de produzir metionina a partir de nitrogênio orgânico ou inorgânico, carboidratos e fontes de enxofre. No entanto, os animais dependem de fontes externas de metionina. Vários estudos publicados indicaram que a metionina é o aminoácido mais limitante para animais de produção alimentados com dietas contendo forragens de leguminosas, silagem de milho, farelo de soja e grão de milho (ALI *et al.*, 2009). A metionina no rúmen é degradada rapidamente e apresenta uma baixa absorção no intestino delgado. A suplementação na dieta com aminoácidos protegidos no rúmen, principalmente metionina e lisina, pode incrementar desempenho reprodutivo desses animais. Toledo *et al.* (2017) relataram que a adição diária de MPR é capaz de produzir um aumento agudo na metionina circulante e um incremento no percentual de proteína do leite.

Todos os aminoácidos estão presentes como os isômeros D e L, sendo estes quimicamente idênticos. A L-Metionina e a D-Metionina são os principais isômeros da metionina. A L-Metionina constitui a forma mais comumente encontrada na natureza (WILLKE, 2014). A metionina protegida oferecida na forma D é absorvida, porém é

necessário que a mesma seja convertida no isômero L nos tecidos antes de sua incorporação em proteínas animais (WILLKE, 2014). A metionina e a cisteína são os dois aminoácidos proteinogênicos essenciais possuindo enxofre. Em animais, a metionina pode agir como precursor da cisteína. O maior teor de metionina, de aproximadamente 5%, pode ser encontrado na albumina, principalmente do ovo, sendo esta proteína solúvel em água.

O conceito de proteger a metionina da degradação ruminal foi estabelecido nos anos 60, através de experimentos que constataram que o perfil da metionina absorvida em experimentos de infusão abomasal, intestinal e intravenosa não era consistente em ruminantes. Portanto, estudos foram realizados para o desenvolvimento de medidas para proteger a metionina da degradação ruminal. Tal proteção da metionina pode ser procedida através da proteção da metionina com lipídios, geralmente em mistura com materiais inorgânicos e carboidratos como agentes estabilizadores (CHALUPA, 1975). O uso de lipídios como principal material encapsulante pode apresentar a adversidade da necessidade de se desenvolver uma mistura de materiais e processos que tenham grande escape ruminal e liberação intestinal de metionina. Atualmente, o método mais eficiente de proteção da metionina é o revestimento superficial da mesma com polímeros sintéticos resistentes a enzimas e sensíveis ao pH, sendo insolúveis em compartimentos do sistema digestório de pH neutro como o rúmen, mas são altamente solúveis na presença de pH ácido como no abomaso. Este método depende das diferenças de pH entre o rúmen e o abomaso para a proteção ruminal da metionina e liberação intestinal da mesma. A metionina protegida por polímero possui maior proteção ruminal e maior coeficiente de liberação intestinal, em comparação com outros produtos (ROBERT *et al.*, 2001).

A utilização de análogos e derivados da metionina é outro mecanismo que vem sendo utilizado para incrementar a oferta de metionina para ruminantes. Os derivados de aminoácidos são aminoácidos livres aos quais foi adicionado um grupo impeditivo químico ao grupo α -amino, ou nos quais o grupo acilo foi manipulado. Isopropil-DL-Met, T-butil-DL-Met, N-estearoil-DL-Met, N-oleoil-DL-Met e capril-caproil-DL-Met são exemplos de derivados de metionina que apresentam alguma resistência à degradação ruminal (LOERCH; OKE, 1989).

4.4 Impactos do Uso de MPR na Produção

Relatou-se que a complementação da dieta dos animais com MPR pode determinar um aumento na ingestão de matéria seca e assim elevar os níveis de produção (KOENIG; RODE, 2001). Noftsger *et al.* (2005) verificaram que o nível de digestibilidade da matéria orgânica *in vitro* das dietas enriquecidas com MPR foram maiores do que nas dietas controle. No entanto, o nitrogênio bacteriano no omaso, a concentração de amônia e o perfil de ácidos graxos de cadeia curta do rúmen não foram alterados. Greenwood e Titgemeyer (2004) observaram redução nas emissões de nitrogênio após a suplementação da dieta com baixo teor de proteína bruta acrescida de MPR. Além disso, a digestibilidade, a fermentação ruminal, a proteína bruta microbiana e a população de *Ruminococcus albus* não diferiu entre dietas com baixo teor de proteína com ou sem metionina e dietas com alto teor de proteína.

A metionina é um aminoácido de oferta limitante em vacas em lactação, verificou-se que a suplementação com MPR apresentou um efeito positivo na síntese de proteínas do leite (ORDWAY *et al.*, 2009). Zanton *et al.* (2014) observaram que a suplementação de metionina promoveu um aumento significativo na produção e concentração de proteína no leite. Tais resultados foram também observados em outros estudos (SCHWAB *et al.*, 2003; SOCHA *et al.*, 2005) demonstrando a ativação da metionina na síntese proteica.

Misciattelli *et al.* (2003) e Rulquin *et al.* (2006) verificaram que a suplementação de vacas leiteiras com MPR resultou em elevação nos teores de gordura e proteína do leite. A alimentação de vacas leiteiras com altos níveis de MPR também aumentou o uso de nitrogênio na produção de leite. Assim, o uso de MPR levou a máxima eficiência de nitrogênio que consequentemente resultou em maior produção de leite com alto teor de proteína.

A suplementação da MPR ao feno aumentou tanto a retenção de nitrogênio quanto a digestão do mesmo e diminuiu a excreção diária de nitrogênio na urina em novilhos de corte. Um estudo realizado por Chung *et al.* (2006) mostrou que dietas à base de concentrado de feno de alfafa suplementadas com uma mistura de 0,52% de MPR forneceram níveis ótimos deste composto aos microrganismos ruminais e melhoraram a fermentação ruminal e a absorção intestinal de aminoácidos protegidos.

4.5 Impactos do Uso de MPR na Reprodução

Em dietas deficientes em metionina, antes e durante os primeiros seis dias após a concepção promovem mudanças substanciais na prole, como elevada pressão arterial, resistência à insulina e resposta imune alterada (PEÑAGARICANO *et al.*, 2013). O mesmo autor levantou a hipótese que mudanças sutis na disponibilidade de metionina poderiam produzir efeitos epigenéticos, trazendo mudanças no blastocisto inicial e levando a mudanças na expressão gênica em seu sétimo dia de desenvolvimento. O desenvolvimento embrionário, particularmente no período pré-implantação, é altamente dependente do microambiente uterino, que por sua vez pode promover alterações epigenéticas no genoma fetal, como a metilação do DNA, assim determinando mudanças permanentes no fenótipo dos indivíduos (BURDGE *et al.*, 2007). Há evidências crescentes de que a nutrição materna pode alterar as marcas epigenéticas do genoma fetal, como a metilação do DNA. De fato, essa ligação entre nutrição materna e subsequente modificação do epigenoma fetal, incluindo mudanças na expressão gênica, é um dos mecanismos moleculares propostos para explicar o fenômeno da programação fetal.

A produção de embriões *in vivo* assim como por fertilização *in vitro* ilustra importância do ambiente celular para seu desenvolvimento adequado. A competência dos embriões pode ser influenciada por receptores, características bioquímicas, moleculares e ultraestruturais no meio de cultivo durante o período de desenvolvimento embrionário, uma vez que é possível alterar sua capacidade de sobreviver à criopreservação (RIZOS *et al.*, 2002).

Estudos estabeleceram claramente que a dieta materna possui um efeito transgeracional na prole por meio de modificações epigenéticas. Por exemplo, um estudo em ovelhas relatou que a alimentação com dietas ricas em grupos metil aumentou a metilação e alterou a expressão dos genes IGF2R e H19 em tecidos fetais em comparação com dietas de grupo de baixo teor de metil. Tais genes estão relacionados à embriogênese e ao crescimento fetal (LAN *et al.*, 2013).

Reduções relevantes na disponibilidade de vitamina B12, folato e o aminoácido metionina da dieta materna no período periconcepção causa modificações epigenéticas generalizadas no genoma associadas ao aumento da adiposidade, resistência à insulina, função imunológica alterada e pressão alta na prole em idade adulta. Um estudo que restringiu doadores de metila através da restrição de metionina,

vitamina B12 e folato durante os primeiros 6 dias após a concepção, demonstrou que embriões com aparência normal no dia 6 após a concepção podem produzir indivíduos com diferenças substanciais na fisiologia subsequente (SINCLAIR *et al.*, 2007).

Um elemento nutricional essencial na reprodução em vacas são os aminoácidos, os quais estão concentrados no oviduto, histotrofo e nos fluidos amnióticos e alantóicos, determinando um papel importante no desenvolvimento embrionário e fetal (GROEBNER *et al.*, 2011). Um aminoácido essencial que pode ser potencialmente limitante para a reprodução em vacas é a metionina. Em mamíferos, um códon Met é usado para o início da maior parte da síntese de proteínas, desempenhando um papel essencial em todos os aspectos das funções celulares (BROSNAN *et al.*, 2007).

Tal importância nutricional do microambiente para desenvolvimento embrionário satisfatório pode também ser evidenciada *in vitro*. Em bovinos, a proporção de embriões cultivados que se desenvolvem até o estágio de blastocisto é afetada pela composição de aminoácidos do meio de cultura, sendo a metionina um aminoácido importante para o desenvolvimento e sobrevivência embrionário. Uma vez que é transportada para um ou mais compartimentos celulares do embrião bovino pré-implantação, além de servir como precursor de polipeptídeos, a metionina desempenha papéis na regulação da tradução, metilação do DNA e equilíbrio antioxidante (KURAN *et al.*, 2002). As concentrações de metionina em fêmeas bovinas são em média de 32-49 $\mu\text{Mol/L}$ no fluído ovidutal, 31-46 $\mu\text{Mol/L}$ no líquido uterino e 16-35 $\mu\text{Mol/L}$ no plasma sanguíneo (HUGENTOBLE *et al.*, 2007). No entanto, no intuito de melhorar a sobrevivência do embrião, o aumento da concentração de metionina acima dessas concentrações, através da suplementação na dieta com MPR tende a aumentar a fertilidade (ARDALAN *et al.*, 2009).

Vários estudos associaram as concentrações de metionina com o desenvolvimento embrionário inicial ideal. Um estudo recente *in vivo* demonstrou que a alimentação com MPR em vacas de leite em lactação produziu alterações dramáticas na expressão gênica em embriões, geralmente diminuindo as concentrações de mRNA em embriões no estágio inicial de desenvolvimento (PENAGARICANO *et al.*, 2013).

4.6 Influência da Metionina no Desenvolvimento Embrionário

Estratégias têm sido usadas para melhorar o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras por meio de alteração do estado nutricional (SANTOS *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2008). Em outras espécies, suplementação dietética com aminoácidos específicos como por exemplo, arginina, glutamina, leucina, glicina e metionina tiveram efeitos benéficos sobre o embrião e sobrevivência fetal através da regulação de vias metabólicas de sinalização essenciais (WANG *et al.*, 2013).

Estudos em ovelhas (GAO *et al.*, 2018; BROSNAN *et al.*, 2007) e bovinos (GROEBNER *et al.*, 2011) demonstraram que a metionina está concentrada nos fluidos uterinos e embrionários, sugerindo um que a metionina uterina está relacionada com o desenvolvimento embrionário normal e sua sobrevivência. Embora não comprometa a competência de um embrião para se tornar um blastocisto, baixas concentrações de metionina, entre 7 e 14 $\mu\text{M/l}$, reduzem a proporção de blastocistos classificados como avançados em desenvolvimento, ou seja, que se expandiram ou estavam eclodindo ou eclodiram da zona pelúcida. Como a expansão e a eclosão envolvem um aumento no tamanho da blastocela, é possível que a metionina seja importante na regulação do volume da blastocela. Tal papel poderia ser exercido através da conversão de metionina em S-adenosilmetionina, que é produzida exclusivamente a partir de metionina e pode servir como doador de metil para causar metilação de lipídios de membrana e aumentar a atividade da bomba Na-K ATPase (MURIEL, 1993).

Acosta *et al.* (2016) realizaram um estudo para determinar os efeitos da MPR e da colina protegida no rúmen no desenvolvimento, metilação do DNA e acúmulo de lipídios em embriões pré-implantação de vacas Holandesas. A suplementação de metionina na dieta aumentou o acúmulo de lipídios nos embriões, mas diminuiu a metilação de DNA quando as vacas receberam metionina durante o período de transição. Isto ocorreu porque a suplementação com metionina estimula a depuração de triacilglicerol do fígado através da ação de lipoproteínas de densidade muito baixa e então ocorre um aumento de ácidos graxos na corrente sanguínea.

Tais achados corroboram com resultados de análise gênica realizada por Penagaricano *et al.* (2013) em que relataram os 30 genes mais significativos em embriões pré-implantação que apresentaram expressão diferencial entre o grupo não suplementado e o grupo suplementado com metionina. Houve a maior expressão de

dois genes nas vacas suplementadas, estando estes envolvidos no transporte e metabolismo de lipídios, incluindo colesterol, e permitem a ligação de lipídios a organelas. Outro achado interessante de Penagaricano *et al.* (2013) foi que a expressão de vários genes em embriões pré-implantação (VIM, IFI6, BCL2A1, TBX15) foram reduzidos em vacas suplementadas com metionina. No entanto, Bonilla *et al.* (2010) trabalhando com embriões produzidos *in vitro*, relataram que a metilação global do DNA não foi afetada pela disponibilidade de metionina, sugerindo que a metionina extracelular não é necessária para a metilação do DNA no período pré-implantação. Além disso, a síntese de proteínas permanece baixa ao longo do desenvolvimento inicial e não aumenta substancialmente até o estágio de desenvolvimento de blastocisto. Bonilla *et al.* (2010) também evidenciaram que a concentração de metionina no meio de cultura de embriões melhorou o desenvolvimento embrionário, porém o desenvolvimento ideal foi alcançado em concentrações de metionina menores do que as concentrações de metionina tipicamente observadas no trato reprodutivo, sugerindo que a utilização de metionina é baixa durante o desenvolvimento pré-implantação.

A suplementação de metionina durante o desenvolvimento folicular e no início do desenvolvimento embrionário, até o dia 7 modifica a expressão gênica do embrião inicial. Penagaricano *et al.* (2013) relataram que embriões, em ambos os tratamentos (suplementação de metionina ou não), embora apresentassem aparência morfológica similar e tenham recebido a mesma avaliação para estágio de desenvolvimento e qualidade do embrião (blastocisto expandido com excelente qualidade), apresentaram diferenças transcriptômicas significativas. Na verdade, mesmo em embriões com morfologia semelhante, foram encontradas diferenças notáveis nos perfis de expressão gênica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as práticas envolvendo os animais foram realizadas de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP de Dracena (Protocolo nº 11/2021), São Paulo, Brasil.

5.1 Experimento 1

5.1.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido com as doadoras de oócitos alojadas na Fazenda Central Senepol, localizada no município de Vera Cruz, estado de São Paulo, Brasil, onde ocorreu os tratamentos e as aspirações foliculares. Os embriões foram produzidos *in vitro* no Laboratório de Fertilização *In Vitro* Central Senepol, sediado no município de Marília, São Paulo, Brasil.

5.1.2 Animais

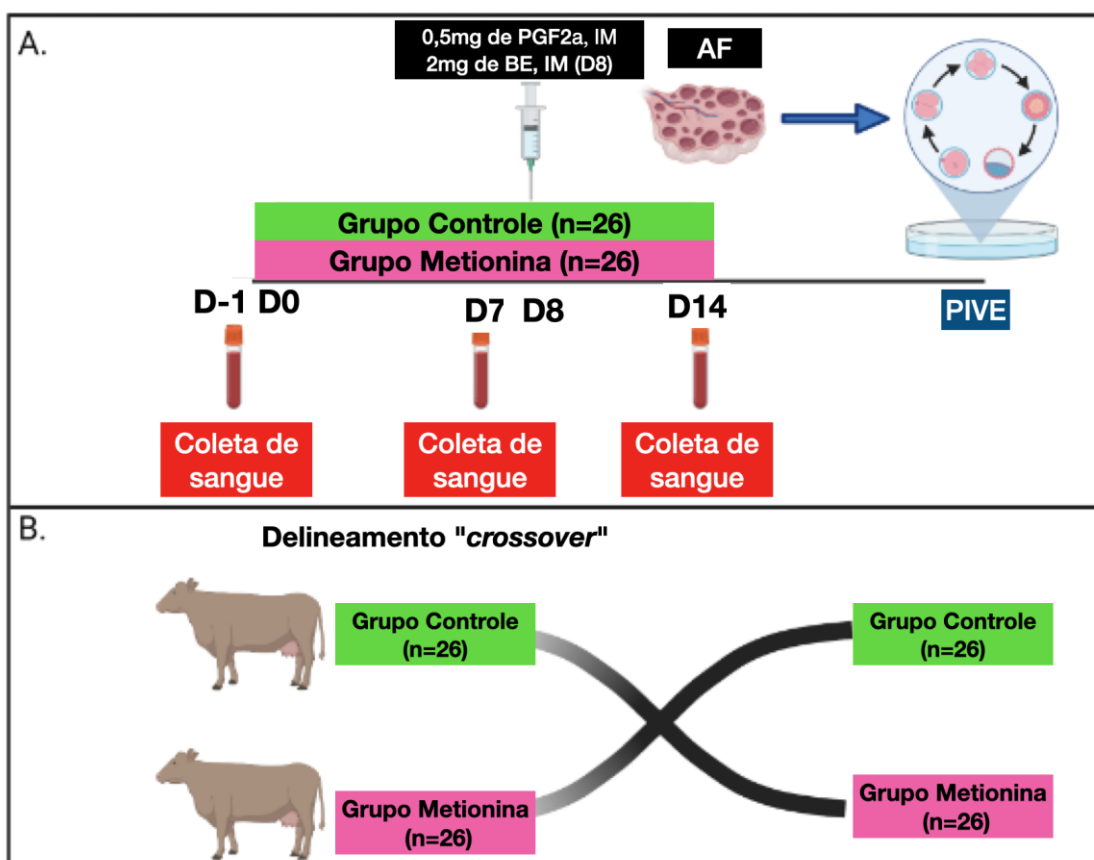
Foram utilizadas vacas doadoras de oócitos da raça Senepol (*Bos taurus taurus*), não prenhes e sem bezerro ao pé, com média de idade de 7 anos (variando de 4 a 10 anos), com um histórico prévio de fertilidade de no mínimo três anos consecutivos, reconhecido pelo Laboratório de Fertilização *In Vitro* Central Senepol, especialmente como boas doadoras de oócitos na produção *in vitro* de embriões (quantidade de oócitos, clivagem e conversão em embriões). As doadoras utilizadas neste estudo foram selecionadas dentro de um plantel total de 120 doadoras de oócitos mantidas na Central Senepol. Foram realizadas quatro repetições experimentais que contabilizaram, ao término do experimento, 26 doadoras por grupo de tratamento. Antes do início do experimento o sistema reprodutivo das doadoras foi avaliado por ultrassonografia transretal. Somente doadoras com anormalidades ausentes no sistema reprodutivo foram incluídas neste estudo. As doadoras foram mantidas a pasto (*Brachiaria sp.*) com acesso a suplemento mineral e água *ad libitum*.

5.1.3 Delineamento experimental

Para a formação dos dois grupos experimentais, trabalhados a cada repetição, as doadoras foram divididas equitativamente segundo idade, peso, ECC e capacidade média no número de oócitos obtidos a cada OPU (este parâmetro foi baseado em histórico prévio). As vacas doadoras de oócitos foram randomicamente divididas em dois grupos: não suplementadas com MPR (CON; n=26) e suplementadas com MPR (MPR; n= 26) constituindo um delineamento “crossover”, conforme ilustrado na Figura 4, para tanto foi realizado um total de seis repetições. Os embriões produzidos no

Experimento 1 foram congelados para as análises por RNAseq. Os embriões excedentes, produzidos por 6 doadoras de cada grupo experimental foram transferidos às receptoras por TETF, constituindo uma das repetições do experimento 2 (Item 5.2.3).

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).



Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.4 Sincronização da onda de crescimento folicular nas doadoras de oócitos

Em ambos os experimentos, oito dias após o início da suplementação (D8; D0 = primeiro dia de suplementação), ou seja, seis dias antes da OPU, as doadoras de oócitos receberam 0,5mg de PGF2 α (Sincrocio® - Ouro Fino) e 2mg de benzoato de estradiol (RIC-BE- Tecnopec), ambos administrados por via intramuscular. O benzoato de estradiol objetivou sincronizar a onda de crescimento folicular em todas as fêmeas, e a PGF2 α possibilitou que a nova onda de crescimento ocorresse na presença de altas concentrações de progesterona, condição que favorece o crescimento folicular.

5.1.5 Tratamentos *in vivo*

Conforme ilustrado nas Figura 4, as doadoras de ambos os grupos de tratamento, 14 dias antes da OPU foram suplementadas individualmente com 1,0 Kg de ração (Tabela 1) adicionada da dose diária de 15 gramas de metionina/animal (MPR; n=26) ou não (CON; n=26). A metionina (Smartamine M - Adisseo Brasil) foi fornecida uma vez ao dia, pela manhã (8:00 horas), durante os 14 dias que antecederam a aspiração folicular (D0 ao D14). O suplemento foi administrado em cochos de forma a disponibilizar 33 cm lineares/animal. O fornecimento da ração adicionada ou não de metionina foi realizada em cochos individualizados e sempre no mesmo horário, com o controle individual da ingestão diária de cada doadora. Os piquetes, como o mesmo tipo e padrão de crescimento de pasto foram alternados entre os grupos para que houvesse a eliminação do efeito do ambiente. Os animais de cada grupo foram intercalados em piquetes com características de produção semelhantes, permanecendo três dias em cada piquete, com o objetivo de reduzir ao máximo o efeito da pastagem.

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

Composição	Volume
Umidade (máx)	130 g/Kg
Proteína bruta (mín)	160 g/Kg
Extrato etéreo (mín)	30 g/Kg
Matéria fibrosa (máx)	75 g/Kg
Matéria mineral (máx)	65 g/Kg
Cálcio (mín)	10 g/Kg
Cálcio (máx)	12 g/Kg
FDA (máx)	100 g/Kg
Fósforo (mín)	4600 mg/Kg
Cobre (mín)	7,3 mg/Kg
Cobalto (mín)	0,12 mg/Kg
Ferro (mín)	8,3 mg/Kg
Iodo (mín)	0,4 mg/Kg
Manganês (mín)	18 mg/Kg
Selênio (mín)	0,3 mg/Kg
Sódio (mín)	1980 mg/Kg
Zinco (mín)	53 mg/Kg
Vitamina A (mín)	2000 UI/Kg
Vitamina D3 (mín)	600 UI/Kg
Vitamina E (mín)	16 UI/Kg

Fonte: Elaborado pela autora.

Composição básica do produto: Milho integral moído; Farelo de soja; Farelo de trigo; Farelo de algodão; Amygold®; Sorgo; Uréia pecuária; Calcário calcítico; Fosfato bicálcico; Cloreto de sódio (sal comum); Iodato de cálcio; Selenito de sódio; Sulfato de cobalto; Sulfato de cobre; Sulfato de manganês; Sulfato de zinco; Sulfato de ferro; Vitamina A; Vitamina D3; Vitamina E; Aditivo sensorial.

5.1.6 Coleta de sangue

Conforme ilustrado na Figura 4, amostras de sangue foram coletadas por venopunção da veia coccígena no D-1, D7 e D14 (D0 = dia do início da suplementação). O sangue foi coletado utilizando-se agulha de calibre 21G x 1" (BD Vacutainer®, REF 360212), e foi dispensado em um tubo de vidro de 8 mL com vácuo (Vacutainer; Labor Import, São Paulo, SP, Brasil) contendo ácido tetracético etilenediamine de sódio com sal tripotássico de EDTA (EDTA K3). Imediatamente após a coleta, o sangue foi delicadamente homogeneizado com a solução de EDTA e acondicionado em gelo até a centrifugação. Posteriormente, o sangue foi centrifugado (Centrífuga Marca Fanem, Modelo 206/1) a $2.250 \times g$ por 10 minutos a 4°C. Após este procedimento, o plasma foi transferido para microtubos e acondicionado a -20°C

devidamente identificado. Três alíquotas de plasma de 1 mL de cada amostra foram adequadamente identificadas e armazenadas a -80°C. As concentrações plasmáticas de metionina serão avaliadas por espectrometria de massas na University of Florida,

5.1.7 Aspiração folicular *in vivo* guiada por ultrassom

Imediatamente antes da aspiração folicular, foi procedida à aplicação de 0,1 g de lidocaína injetável (Lidovet®, Laboratório Bravet Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no espaço intervertebral, administrado pela via peridural. Em seguida, foi realizada a avaliação da população folicular ovariana (contagem e mensuração da população folicular) com o auxílio de um aparelho de ultrassonografia (Mindray, DP2200), com transdutor de aspiração (Mindray, modelo 65C15EAV). Após as fêmeas realizarem a ingestão da última suplementação, todos os folículos maiores do que 5 mm visualizados nos ovários foram puncionados para obtenção dos COCs. Para tanto, foi utilizado um cateter (Jelco) 18G acoplado à sonda convexa transvaginal, com bomba de sucção a vácuo, 100 mmHg/min (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Cravinhos, SP, Brasil, modelo BV 003), produzindo um fluxo de 15 mL/min. O conteúdo folicular foi recuperado a partir de um circuito de Teflon (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP, Brasil), de 2 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento, ligando a agulha a um tubo plástico de 50 mL, contendo 2 mL de meio constituído de Tampão fosfato de Dulbecco-salino (DPBS) com temperatura entre 35 e 37°C. O material coletado contido no tubo foi depositado em um microfiltro de 50 mL de coleta de embriões, com tela de nylon de 100 micras (TED, Cravinhos - SP) e lavado com DPBS. Todas as aspirações foram realizadas por um único veterinário. Considerando o delineamento “crossover”, 30 dias após a OPU de cada repetição um novo tratamento foi iniciado, onde as doadoras anteriormente do CON passaram a MPR, e as doadoras anteriormente do MPR passaram a CON. Após a seleção dos oócitos, 5 oócitos de classificação grau II e grau III de cada vaca foram desnudados com auxílio de Tripsina e pipetagem. Essas células do *cumulus* foram congeladas assim como os seus núcleos para posterior avaliação de expressão gênica e metilação do DNA.

5.1.8 Coleta de fluído folicular

Conforme ilustrado na Figura 4, no Experimento 1, no D14 imediatamente após a aspiração folicular, o fluído folicular de cada doadora de oócitos foi centrifugado em tubo de 15 mL logo após a coleta durante 10 minutos a 2.250 g. Após centrifugação, com auxílio de uma pipeta foi retirado 1,5 mL de pellet e 1,5 mL de sobrenadante e posteriormente armazenado em criotubos a -20°C, para posterior mensuração das concentrações de metionina no fluído folicular pela técnica de espectrometria de massas. Todos os tubos foram identificados (vaca #, amostra #, data). As concentrações de metionina no fluído folicular serão avaliadas por espectrometria de massas na University of Florida,

5.1.9 Identificação dos CCOs

Os CCOs recuperados no filtro foram transferidos para placas de poliestireno 100 x 20 mm (Corning Incorporated, NY, USA), contendo DPBS suplementado com 1% de SFB e avaliados através de microscópio estereoscópico. Os oócitos foram classificados segundo Lonergan (1994) em cinco grupos de qualidade, onde grau I = células do *cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células; grau II = células do *cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares; grau III = células do *cumulus* presente, com apenas uma camada de célula; Desnudo = ausência de camada de células do *cumulus* e Atrésicos = células do *cumulus* em regressão celular, *cumulus* expandido com células escuras e em grumos, e complexo *cumulus* oocitário escuro e irregular. Após classificação, os oócitos graus I, II, III com citoplasma homogêneo foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (TCM-199 suplementado com 22 µg/mL de piruvato, 20mM de HEPES, 5mM de Bicarbonato de sódio e 50µg/mL de amicacina). Posteriormente foram lavados uma vez em meio de maturação B-199 (TCM199 com sais de Earles, glutamina e bicarbonato, suplementado com 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL e com 10% SFB, antes de serem transferidos para o cultivo de maturação. Todos os meios de cultivo utilizados neste estudo foram produzidos pelo Laboratório Origem (Origem Embriões *in vitro*, Uberaba-

MG, Brasil). Tal procedimento, ao longo de todo o período experimental, foi realizado por um único veterinário.

5.1.10 Maturação *in vitro* dos oócitos

Após a aspiração dos folículos, os oócitos foram identificados e classificados em graus I, II, III, desnudo e atrésico. Após a classificação foram transferidos para tubos de 5 mL contendo 400 µL de meio de maturação coberto com 320 µL de óleo mineral (Marca Fujifilm Irvine Scientific), os quais foram gaseificados com mistura gasosa com 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ por 15 segundos antes de seu fechamento com rolhas de silicone bem vedadas e imediatamente colocados em transportadores de oócitos (WTA, Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP, Brasil, modelo TO 15-020) à 38°C. Assim que os oócitos chegaram ao laboratório, as tampas de silicone dos tubos foram retiradas e apenas mantido tampas de plástico sem vedação completa dos tubos, já que os mesmos foram transportados para a incubadora 38,8 °C, com 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade. O tempo total de maturação foi de 22 a 24 horas, desde o momento em que foram colocados nos tubos contendo meio de maturação até o momento em que foram transportados para a incubadora no laboratório. Os oócitos foram maturados em meio de maturação B-199 (TCM199 com sais de Earles, glutamina e bicarbonato, suplementado com 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL e com 10% SFB).

5.1.11 Fertilização *in vitro*

Após o período de maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro*, em microgotas de 70 µL de meio TALP-FIV suplementado com 4 µL/mL solução PHE (1µM hipotaurina, 2µM penicilamina e 0,25µM epinefrina), 10 µg/mL heparina, 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de amicacina e 6mg/mL BSA livre ácidos graxos. Os CCOs foram lavados em meio TALP-FIV. Foram utilizados 5 touros diferentes da raça Senepol (fertilidade *in vitro* previamente comprovada) para o processo de fertilização *in vitro*, onde os touros foram divididos equitativamente entre ambos os grupos de tratamento. As palhetas de sêmen foram descongeladas a 35 °C, durante 30 segundos

e seu conteúdo centrifugado á 5000 rpm por 5 minutos em gradiente de Percoll (45 e 90%) para obtenção dos espermatozóides móveis. Em seguida, foram centrifugados em meio FIV, por 3 minutos a 5000 rpm, para remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração espermática foi de 2×10^6 espermatozóides vivos/ml e os oócitos foram transferidos para as microgotas (de 20 a 23 oócitos/gota) contendo os espermatozoides, onde permaneceram sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ em ar a 38,8 °C, por um período de 18 a 20 horas.

5.1.12 Cultivo de embriões *in vitro*

Após o processo de MIV e FIV, os zigotos tiveram as células do *cumulus* removidas parcialmente, onde permaneceram poucas monocamadas de células da granulosa; e foram cultivados *in vitro* em meio SOF (“synthetic oviduct fluid”) suplementado com 22µg/mL de piruvato, 6mg/ml BSA livre ácidos graxos, 50 µg/mL de amicacina e 2% SFB. Decorridas 72 horas pós-inseminação-hpi (D3; D0 = dia da fertilização) foi verificada a taxa de clivagem. Os oócitos não clivados foram retirados do meio e em seguida procedeu-se a renovação com 50% do meio de cultivo novo caracterizando o primeiro “feeding”. Foi realizado um segundo “feeding” no D6. O estágio de desenvolvimento embrionário, incluindo a classificação de mórulas, blastocistos iniciais, blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos foi avaliado de acordo com Lindner e Wright (1983) no sétimo dia após a fertilização (D7). A qualidade dos embriões, em graus I, II ou III; foi avaliada segundo Kennedy *et al.* (1983). Os embriões permaneceram incubados em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, a 38,8 °C. Todo o processo de PIV, incluindo MIV, FIV e CIV foi realizado por uma única técnica laboratorial. Ao final do cultivo, para cada doadora, 5 embriões constituíram um “pool” e foram congelados a -80°C para posterior avaliação da expressão gênica e metilação do DNA pela técnica de RNAseq.

5.1.13 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) considerando a doadora como unidade experimental. As variáveis dependentes contínuas (número de CCOs totais

recuperados; taxa de CCOs recuperados viáveis; taxa de clivagem; taxa de conversão de CCOs em blastocistos no D7 e número de blastocistos produzidos no D7) foram avaliadas quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados não seguiram a distribuição normal, estes foram transformados em logaritmo, ranqueamento ou raiz quadrada. Os dados foram analisados por ANOVA usando o PROC MIXED considerando os efeitos fixos de grupo de tratamento (MPR ou controle) e replicata; e a doadora e o touro, como efeitos aleatórios no modelo. Os resultados serão apresentados com média $\pm$ erro padrão da média (EPM) não transformados. Em todas as análises considerou-se um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

5.2 Experimento 2

5.2.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido com as doadoras de oócitos alojadas na Fazenda Central Senepol, localizada no município de Vera Cruz, estado de São Paulo, Brasil. Após a suplementação das doadoras com metionina e a coleta dos oócitos na referida fazenda, o processo de PIVE foi realizado no Laboratório de Fertilização *In Vitro* Central Senepol, sediado no município de Marília, estado de São Paulo, Brasil. As receptoras de embriões, assim com a TETF foi conduzida em fazendas, localizadas em Marília – SP e Campo Mourão - PR, no período compreendido entre janeiro e junho de 2023.

5.2.2 Animais

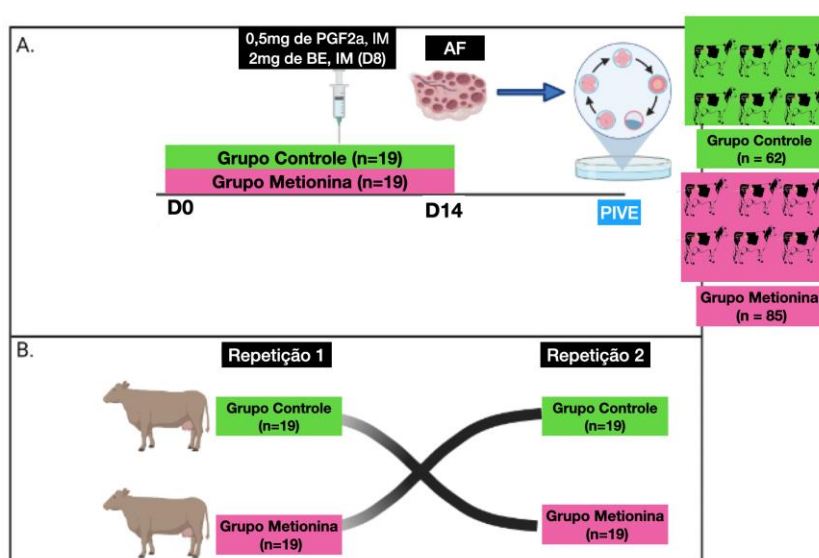
Foram utilizadas 19 fêmeas doadoras de oócitos da raça Senepol, não prenhes e sem bezerro ao pé, com média de idade de 7 anos (variando de 4 a 10 anos) e um histórico prévio de fertilidade reconhecido, especialmente como boas doadoras de oócitos na produção *in vitro* de embriões. Antes do início do estudo, as fêmeas doadoras de oócitos foram clinicamente examinadas quanto a normalidade do sistema reprodutivo, por ultrassonografia transretal. Somente fêmeas com anormalidades ausentes no sistema reprodutivo foram incluídas neste estudo. Os animais foram mantidos à pasto e recebiam água *ad libitum*. As receptoras de embriões ($n = 147$)

eram vacas, meio sangue (F1) provenientes do cruzamento de matrizes Nelore com Red Angus, Aberdeen Angus, Bradford e Senepol; sem bezerro ao pé (eram vacas solteiras), com ECC de 3,5 a 4; na escala de 1 a 5. As receptoras foram mantidas a pasto (*Brachiaria Brizantha*) com acesso a suplemento mineral e água *ad libitum*.

5.2.3 Delineamento experimental

As vacas doadoras 14 dias antes da OPU foram suplementadas individualmente com 1,0 Kg de ração (Tabela 1) adicionada de 15 gramas de metionina/animal/dia (MPR; n=19) ou não (CON; n=19), em cochos individualizados e sempre no mesmo horário (8:00 horas), conforme ilustrado na Figura 5. Os embriões excedentes, produzidos por 6 doadoras de cada grupo experimental pertencente a experimento 1 foram transferidos às receptoras por TETF, constituindo parte do experimento 2. Além destes, foram feitas mais duas repetições de OPU, constituindo também um delineamento experimental “crossover”, onde em cada repetição foram utilizadas 15 vacas, entretanto, apenas 13 doadoras produziram embriões em cada grupo. Assim, cada grupo experimental totalizou 19 doadoras por grupo, provenientes de quatro repetições. Houve uma produção total de 147 embriões, sendo 85 embriões provenientes de doadoras tratadas com MPR (MPR; n = 85) e 62 provenientes de doadoras não tratadas com MPR (CON; n = 62).

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.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.4 Sincronização da onda de crescimento folicular nas doadoras de oócitos

Em ambos os experimentos, oito dias após o início da suplementação (D8; D0 = primeiro dia de suplementação), ou seja, seis dias antes da OPU, as doadoras de oócitos receberam 0,5mg de PGF2 α (Sincrocio® - Ouro Fino) e 2mg de benzoato de estradiol (RIC-BE- Tecnopec), ambos administrados por via intramuscular. O benzoato de estradiol objetivou sincronizar a onda de crescimento folicular em todas as fêmeas, e a PGF2 α possibilitou que a nova onda de crescimento ocorresse na presença de altas concentrações de progesterona, condição que favorece o crescimento folicular.

5.2.5 Aspiração folicular *in vivo* guiada por ultrassom

Imediatamente antes da OPU foi procedida à aplicação de 0,1 g de lidocaína injetável (Lidovet®, Laboratório Bravet Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no espaço intervertebral, administrado pela via peridural. Em seguida, foi realizada a avaliação da população folicular ovariana (contagem e mensuração da população folicular) com o auxílio de um aparelho de ultrassonografia (Mindray, DP2200), com transdutor de aspiração (Mindray, modelo 65C15EAV). Após as fêmeas realizarem a ingestão da última suplementação, todos os folículos maiores do que cinco mm visualizados nos ovários foram puncionados para obtenção dos COCs. Para tanto, foi utilizado um cateter (Jelco) 18G acoplado à sonda convexa transvaginal, com bomba de sucção a vácuo, 100 mmHg/min (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Cravinhos, SP, Brasil, modelo BV 003), produzindo um fluxo de 15 mL/min. O conteúdo folicular foi recuperado a partir de um circuito de Teflon (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP, Brasil), de 2 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento, ligando a agulha a um tubo plástico de 50 mL, contendo 2 mL de meio constituído de Tampão fosfato de Dulbecco-salino (DPBS) com temperatura entre 35 e 37 °C. O material coletado contido no tubo foi depositado em um microfiltro de 50 mL de coleta de embriões, com tela de nylon de 100 micras (TED, Cravinhos - SP) e lavado com DPBS. Todas as aspirações foram realizadas por um único veterinário. Considerando o delineamento “crossover”, 30 dias após a OPU de cada repetição um novo tratamento foi iniciado, onde as doadoras anteriormente do Grupo CON passaram a Grupo MPR, e as doadoras anteriormente do Grupo MPR passaram a Grupo CON.

5.2.6 Identificação dos CCOs

Os CCOs recuperados no filtro foram transferidos para placas de poliestireno 100 x 20 mm (Corning Incorporated, NY, USA), contendo DPBS suplementado com 1% de SFB e avaliados através de microscópio estereoscópico. Os oócitos foram classificados segundo Lonergan (1994) em cinco grupos de qualidade, onde grau I = células do *cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células; grau II = células do *cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares; grau III =

células do *cumulus* presente, com apenas uma camada de célula; Desnudo = ausência de camada de células do *cumulus* e Atrésicos = células do *cumulus* em regressão celular, *cumulus* expandido com células escuras e em grumos, e complexo *cumulus* oocitário escuro e irregular. Após classificação, os oócitos graus I, II, III com citoplasma homogêneo foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (TCM-199 suplementado com 22 µg/mL de piruvato, 20mM de HEPES, 5mM de Bicarbonato de sódio e 50µg/mL de amicacina). Posteriormente foram lavados uma vez em meio de maturação B-199 (TCM199 com sais de Earles, glutamina e bicarbonato, suplementado com 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL e com 10% SFB, antes de serem transferidos para o cultivo de maturação. Todos os meios de cultivo utilizados neste estudo foram produzidos pelo Laboratório Origem (Origem Embriões *in vitro*, Uberaba-MG, Brasil). Tal procedimento, ao longo de todo o período experimental, foi realizado por um único veterinário nos diferentes dias.

5.2.7 Maturação *in vitro* dos oócitos

Após a aspiração dos folículos, os oócitos foram identificados e classificados em graus I, II, III, desnudo e atrésico. Após a classificação foram transferidos para tubos de 5 mL contendo 400 µL de meio de maturação coberto com 320 µL de óleo mineral (Marca Fujifilm Irvine Scientific), os quais foram gaseificados com mistura gasosa com 5% de O₂, 5% de CO₂ completando com nitrogênio por 15 segundos antes de seu fechamento com rolhas de silicone bem vedadas e imediatamente colocados em transportadores de oócitos (WTA, Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP, Brasil, modelo TO 15-020) à 38°C. Assim que os oócitos chegaram ao laboratório, as tampas de silicone dos tubos foram retiradas e apenas mantido tampas de plástico sem vedação completa dos tubos, já que os mesmos foram transportados para a incubadora 38,8 °C, com 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade. O tempo total de maturação foi de 22 a 24 horas, desde o momento em que foram colocados nos tubos contendo meio de maturação até o momento em que foram transportados para a incubadora no laboratório. Os oócitos foram maturados em meio de maturação B-199 (TCM199 com sais de Earles, glutamina e bicarbonato,

suplementado com 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL e com 10% SFB.

5.2.8 Fertilização *in vitro*

Após o período de maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro*, em microgotas de 70 µL de meio TALP-FIV suplementado com 4 µL/mL solução PHE (1µM hipotaurina, 2µM penicilamina e 0,25µM epinefrina), 10 µg/mL heparina, 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de amicacina e 6mg/mL BSA livre ácidos graxos. Os CCOs foram lavados em meio TALP-FIV. Foram utilizados 4 touros diferentes da raça Senepol (fertilidade *in vitro* previamente comprovada) para o processo de fertilização *in vitro* que foi dividido equitativamente entre ambos os grupos. As palhetas de sêmen foram descongeladas a 35 °C, durante 30 segundos e seu conteúdo centrifugado á 5000 rpm por 5 minutos em gradiente de Percoll (45 e 90%) para obtenção dos espermatozóides móveis. Em seguida, foram centrifugados em meio FIV, por 3 minutos a 5000 rpm, para remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração espermática foi de 2×10^6 espermatozóides vivos/ml e os oócitos foram transferidos para as microgotas (de 20 a 23 oócitos/gota) contendo os espermatozoides, onde permaneceram sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ em ar a 38,8 °C, por um período de 18 a 20 horas.

5.2.9 Cultivo de embriões *in vitro*

Após o processo de MIV e FIV, os zigotos tiveram as células do *cumulus* removidas parcialmente, onde permaneceram poucas monocamadas de células da granulosa; e foram cultivados *in vitro* em meio SOF (“synthetic oviduct fluid”) suplementado com 22µg/mL de piruvato, 6mg/ml BSA livre ácidos graxos, 50 µg/mL de amicacina e 2% SFB. Decorridas 72 horas pós-inseminação-hpi (D3), foi verificada a taxa de clivagem. Os oócitos não clivados, ou seja, aqueles oócitos que não foram fertilizados e que não continuaram seu desenvolvimento embrionário e se degeneraram após a fertilização foram retirados, e o meio de cultivo foi renovado (*feeding*). Foi realizado um segundo “*feeding*” 144 hpi (D6). O estágio de desenvolvimento embrionário, incluindo a classificação de mórulas, blastocistos

iniciais, blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos foi avaliado de acordo com Lindner e Wright (1983), nos dias seis e sete após a fertilização. A qualidade dos embriões foi avaliada segundo Kennedy *et al.* (1983). Os embriões permaneceram incubados em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, a 38,8 °C. Os embriões em estágio de blastocistos em D7 foram envasados em meio SOF adicionado de 20 mM de HEPES, 5% de SFB e 4 mg/ml de BSA livre de ácidos graxos, previamente aquecido à 38°C e então estes embriões selecionados de qualidade I (excelente) e II (bom) foram envasados em palhetas finas de 0,25 (IMV Technologies). Após o envase, os embriões já previamente identificados foram colocados no transportador de embriões à uma temperatura de 38°C e encaminhados até a Fazenda para transferência em vacas receptoras previamente preparadas. Após a palpação retal feita pelo médico veterinário, onde foi identificado o ovário que possuía o corpo lúteo ativo, o embrião foi inovulado com auxílio de um inovulador na ponta distal do corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo.

5.2.10 Protocolo de sincronização da ovulação nas receptoras

As receptoras foram submetidas à exame ginecológico e somente aquelas que estavam ciclando (não se encontravam em anestro) foram utilizadas. Para a sincronização das ovulações as receptoras receberam 2mg benzoato de estradiol (RIC-BE- Tecnopec) via IM, associado a inserção de dispositivo intravaginal contendo 1 grama de progesterona (PRIMER). Após 8 dias foi realizada a remoção do dispositivo de P4 e aplicação 0,5mg de PGF2 α (Sincrocio® - Ouro Fino) e 2mg de benzoato de estradiol (RIC-BE- Tecnopec), ambos via IM.

5.2.11 Transferência de embriões em tempo fixo (TETF)

Conforme representado na Figura 5, no Experimento 2, após a produção dos embriões, os blastocistos com 7 dias de desenvolvimento (D0 = dia da FIV) foram transferidos às receptoras. As receptoras foram previamente avaliadas por ultrassonografia a apenas fêmeas ovuladas com um corpo lúteo condizente com o D7 (D0 = dia da ovulação) receberam os embriões. O embrião no D7 foi via transcervical

inserido na porção mais cranial possível ao corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. As TETF foram realizadas por um único médico veterinário. As TETFs foram realizadas em duas repetições, onde os embriões eram provenientes de doadoras de oócitos suplementadas com metionina (MPR; n = 85) ou não (CON; n = 62).

5.2.12 Diagnóstico de prenhez

O diagnóstico de prenhez foi realizado aos 23 dias após a TETF, ou seja, aos 30 de prenhez, pelo uso de ultrassonografia transretal (Aloka, modelo SSD-500, Berger Distribuidora Aloka para Brasil), onde na presença de vesícula amniótica contendo o feto as fêmeas foram classificadas com prenhas; e na ausência de tais estruturas como não prenhas. A taxa de prenhez (número de fêmeas prenhas / número de fêmeas submetidas à TETF x 100) foi determinada para cada grupo de tratamento.

5.2.13 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Para a variável taxa de prenhez foi utilizado o PROC GLIMMIX usando uma distribuição binomial, considerando o tratamento (metionina ou controle) como efeito fixo, e a doadora, touro e fazenda, como efeitos aleatórios. Em todas as análises considerou-se um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1. Conforme ilustrado na **Tabela 2**, não foi observada diferença entre os grupos para as variáveis estudadas.

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.

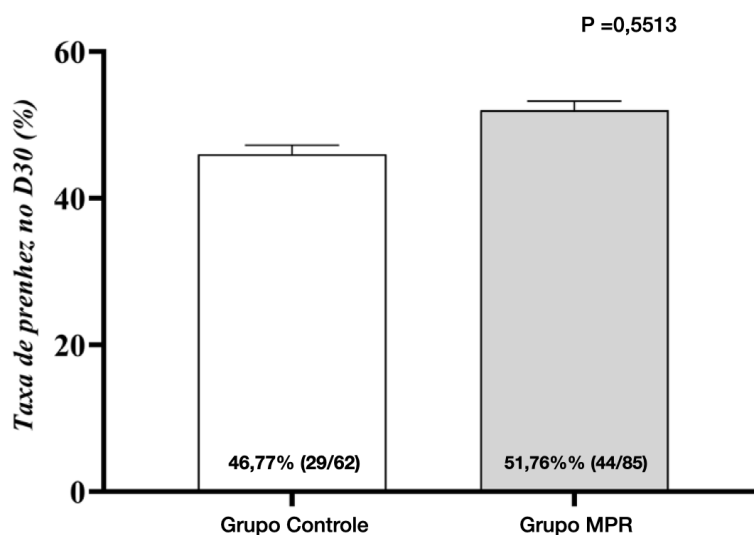
Variáveis	Grupo Controle	Grupo Metionina	Valor de P
Número de CCOs totais recuperados/doadora ¹	34,6842 $\pm$ 3,2687	34,7894 $\pm$ 3,6197	0,6690
Número de CCOs viáveis recuperados/doadora ²	29,2105 $\pm$ 3,5930	29,6315 $\pm$ 3,5992	0,7514
Taxa de CCOs recuperados viáveis (%) ³	72,2659 $\pm$ 5,2779	70,4465 $\pm$ 6,0910	0,6908
Taxa de Clivagem (%) ⁴	65,8627 $\pm$ 5,9443	68,7473 $\pm$ 6,8064	0,5692
Taxa de conversão de CCOs em blastocistos no D7 (%) ⁵	23,7181 $\pm$ 4,4780	28,3952 $\pm$ 4,6178	0,3082
Número de blastocistos produzidos no D7/doadora ⁶	9,8636 $\pm$ 1,6187	10,0869 $\pm$ 1,5411	0,6682

Fonte: Elaborado pela autora.

¹Número de CCOs recuperados por doadora com a aspiração folicular; ²Número de CCOs recuperados viáveis (Graus I, II e III) por doadora com a aspiração folicular; ³(Número de CCOs viáveis / número de CCOs totais recuperados) $\times$ 100; ⁴(Número de CCOs clivados/ número de CCOs submetidos à fertilização *in vitro*) $\times$ 100; ⁵Número de blastocisto no D7 Graus I e II / número de CCOs colocados na fertilização $\times$ 100; ⁶Número de blastocistos produzidos no D7 por doadora aspirada.

Experimento 2. Conforme ilustrado na Figura 6, 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) respectivamente; $P = 0,5513$].

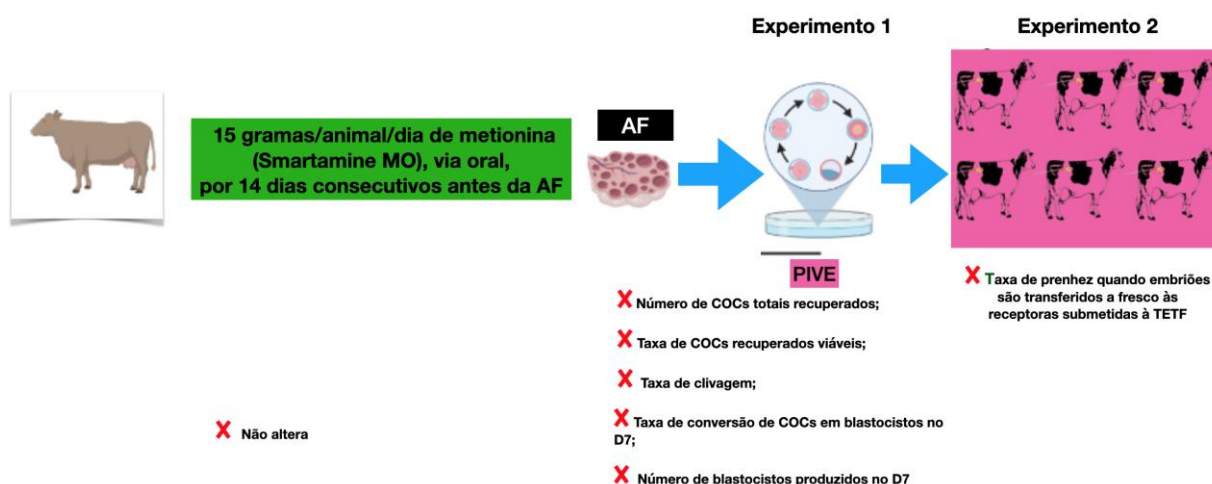
Figura 6 - Taxa de prenhez (número de receptoras prenhas / número de receptoras que receberam um embrião X 100) aos 23 dias após a TETF em receptoras ($n=147$) que receberam embriões produzidos *in vitro* oriundos de doadoras suplementadas com metionina (MPR; $n= 85$ embriões) ou não (CON; $n= 62$).



Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 7, estão sumarizados os resultados referentes a comparação das diferentes variáveis entre os dois tratamentos. Não foi observada diferença entre os grupos para todas as variáveis estudadas em ambos os experimentos.

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



Fonte: Elaborado pela autora.

Como visto nos resultados do *Experimento 1*, não houve diferença significativa entre CON e MPR em relação a todas às variáveis avaliadas. Liu *et al.* (2021) avaliaram o efeito da suplementação com de 3,7 gramas/cabeça/dia de MPR em vacas mestiças, fornecida 30 dias antes e 90 dias após o início da estação reprodutiva. Os autores verificaram que a suplementação com MPR alterou significativamente os padrões de coexpressão gênica na prole, e que algumas dessas mudanças foram mediadas por alterações na metilação do DNA. No presente estudo, apesar de não ter sido encontrada diferenças significativas na produção *in vitro* de embriões espera-se, com as análises que estão sendo realizadas por RNAseq, que sejam observadas diferenças notáveis no padrão de metilação dos embriões quando compararmos o Grupo MPR com o Grupo CON. 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 pré-implantação do oócito, assim como o desenvolvimento embrionário são períodos particularmente sensíveis a mudanças na nutrição materna. Penagaricano *et al.* (2013) observaram que embriões suplementados ou não com MPR não diferiram na aparência morfológica, e que embora os embriões de ambos os grupos tenham recebido a mesma avaliação para estágio de desenvolvimento e qualidade do embrião (blastocisto expandido com excelente qualidade), houveram diferenças transcriptômicas significativas. Na verdade, embriões morfológicamente semelhantes apresentaram diferenças notáveis nos perfis de expressão gênica.

De acordo com Penagaricano *et al.* (2013), a nutrição materna no período periconcepcional, com metionina ou lisina, promove alterações no transcriptoma do embrião após avaliação do RNA-seq. Neste estudo, de um total de 10.662 avaliados, observou-se 276 genes expressos diferencialmente, destes vários estavam relacionados ao desenvolvimento embrionário e a resposta imune. O experimento consistia no tratamento de vacas Holandesas com níveis diferentes de metionina, sendo um grupo suplementado com 2,4% de MPR e o segundo grupo com 1,9% de metionina está não protegida no rúmen. As fêmeas foram submetidas à um protocolo de superovulação, para que produzissem embriões *in vivo*, para posterior transferência em fêmeas receptoras. Após protocolo de superovulação, as fêmeas passaram por duas inseminações. Os embriões obtidos eram de qualidade excelente e boa. A suplementação da doadora com metionina à 2,4% de MPR promoveu alterações no

transcriptoma de alguns genes, onde observou-se um aumento da metilação do DNA de forma a determinar na prole, melhorias no sistema imunológico até a vida adulta da referida prole.

Importante ressaltar que de acordo com Bonilla *et al.* (2010), em um estudo adicionando diferentes níveis de metionina no meio de cultivo de embrião, onde foi realizado dois experimentos sendo um utilizando níveis de 0, 35, 50, 100, 200 ou 400 mol/l de metionina no meio e o segundo utilizando 0, 7, 14, 21, 28 ou 35 mol/l de metionina no meio de cultivo. Os mesmos autores observaram que em ambos os experimentos a porcentagem de oócitos que se desenvolveram até blastocisto foi menor no grupo controle. A produção de blastocisto foi maior para as concentrações de 35 e 400 mol/l de metionina no experimento 1 e também para embriões cultivados com 7 e 35 mol/l de metionina no experimento 2. No entanto, a proporção de blastocistos expandidos ou eclodidos foi reduzida em concentrações mais baixas de metionina no segundo experimento (7 e 14 mol/l de metionina). Os autores concluíram que a necessidade de metionina pré-implantação está entre 14 e 21 mol/l e que essas concentrações são menores ou semelhantes às encontradas no trato reprodutivo, dessa forma sugerindo que a deficiência de metionina não seria uma causa comum de mortalidade embrionária. Já no presente estudo, apenas as doadoras foram suplementadas com a metionina, isto é, obtivemos modificações apenas a nível de oócito. Diferentemente do trabalho de Bonilla *et al.* (2010), onde os embriões foram cultivados com meio enriquecido de metionina, no trabalho em questão os embriões não foram submetidos à nenhum tipo de tratamento. Sabe-se que a metionina promove a metilação no embrião.

Do mesmo modo, no *Experimento 2*, não houve diferença significativa na taxa de prenhez das receptoras que receberam embriões produzidos de doadoras de oócitos suplementadas ou não com metionina. Em um estudo realizado por Diaza *et al.* (2022, dados ainda não publicados), 114 vacas multíparas Angus e Brangus (Brahman x Angus) foram divididas em dois grupos para receberem 1 kg de ração/animal/dia com a adição 15 gramas de MPR/animal/dia, durante 14 dias, durante o período de 7 dias antes da IATF e 7 dias após a IATF. Os autores observaram uma taxa de prenhez de 55% nas vacas suplementadas com MPR e 50% nas não suplementadas, no diagnóstico realizado 30 dias após a IATF. Em nosso estudo, a taxa de prenhez não foi incrementada em embriões produzidos a partir de oócitos provenientes de doadoras

suplementadas com MPR. Importante ressaltar novamente que em nosso estudo apenas as doadoras foram suplementadas, enquanto os embriões e as receptoras não passaram por nenhum tipo de tratamento, diferentemente do trabalho de Diaza *et al.* (2022), onde a suplementação foi fornecida para a fêmea que não só fornece o oócito como também mantém a prenhez.

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 (Ujumugui 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.

HUGENTOBLER, 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.; PENAGARICANO, 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.