



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

RICARDO BRAZ DE TOLEDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO/2021



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE PLANOS ALIMENTARES NO CRESCIMENTO DE NOVILHAS
NELORE PRÉ-PÚBERES E NA PRODUÇÃO DE OVÓCITOS E EMBRIÕES *IN*
*VITRO***

ALUNO: RICARDO BRAZ DE TOLEDO

**ORIENTADOR: Dr. IVO PIVATO
CO-ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO MARTINS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA / DF
NOVEMBRO DE 2021**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

TOLEDO, R. B. **Efeito de planos alimentares no crescimento de novilhas nelore pré-púberes e na produção de ovócitos e embriões *in vitro***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2021, 53 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução dessa dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passada a Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

TOLEDO, R. B. **Efeito de planos alimentares no crescimento de novilhas nelore pré-púberes e na produção de ovócitos e embriões *in vitro***.. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2021, 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2021.

1. Bovinos. 2. Embriões. 3. Fecundação *in vitro*. 4. Novilhas nelore pré-puberes. 5. Nutrição.

CDD ou CDU
Agris / FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE PLANOS ALIMENTARES NO CRESCIMENTO DE NOVILHAS
NELORE PRÉ-PÚBERES E NA PRODUÇÃO DE OVÓCITOS E EMBRIÕES *IN*
*VITRO***

RICARDO BRAZ DE TOLEDO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS,
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADO POR:

Ivo Pivato, Doutor (FAV / UNB)
(ORIENTADOR)

Rodrigo Arruda de Oliveira, Doutor (FAV/UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)

Isabel Cristina Ferreira, Doutora (Embrapa Cerrados)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA, 25 de Novembro de 2021.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e família, obrigado pelo carinho e incansável apoio durante este período de sacrifícios e conquistas na elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, porque sem Ele nada seria possível. Aos meus pais, Marcelo Ricardo de Toledo e Elaine Braz de Toledo, por todos os anos de amor, educação, carinho, paciência, sabedoria e dedicação. Sou eternamente grato a Deus por Ele ter escolhido vocês para serem meus pais e terem me passado todos os ensinamentos sobre valores e princípios que me fazem ser a pessoa que sou hoje, por isso, muito obrigado. Amo muito vocês.

Agradeço ao meu orientador, Doutor Ivo Pivato, pela dedicação, paciência, conselhos e amizade durante todo o curso e principalmente nesta fase tão importante de conclusão. Não posso deixar de agradecer também ao doutor Carlos Frederico Martins, por sua amizade e ensinamentos no decorrer de todo o projeto. A todos os meus outros mestres amigos que contribuíram com palavras, ensinamentos e lições na minha caminhada em busca por conhecimento. Agradeço também a todas as outras pessoas que se fizeram presentes nesta minha caminhada, me ensinando muitas vezes o que não se é possível aprender dentro de sala de aula.

Agradeço aos meus colegas de turma e de curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da UnB, que de alguma forma se fizeram presentes e importantes nesta minha caminhada, compartilhando e adquirindo conhecimentos juntos. Aos meus amigos, que sempre se fizeram presentes, me apoiando nas conquistas, vitórias e, sobretudo nas dificuldades. Ao meu amigo Kaique Nogueira, por tamanho apoio e ajuda. Muito obrigado a todos, nossos momentos juntos nunca serão esquecidos.

Agradeço a EMBRAPA CERRADOS, a todos os seus funcionários, pesquisadores e colaboradores por todo o apoio e momentos de aprendizado, e pela oportunidade de ter estado presente com vocês.

E por último agradeço à Universidade de Brasília, por ter sido uma instituição impecável, que me possibilitou pós-graduar em uma das melhores universidades do país na área por me formar um profissional completo e preparado.

INDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
CAPÍTULO 1	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Importância da antecipação da reprodução em fêmeas nelore	16
2.2. Fisiologia reprodutiva de fêmeas pré-púberes	17
2.3. Competência ovocitária para reprodução assistida	18
2.4. Estratégias de suplementação alimentar para antecipação da reprodução de fêmeas de corte	18
2.5. Importância das Análises Genômicas Associadas a FIV e IATF	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivos gerais	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
5. CAPÍTULO 2 – ARTIGO	29
5.1. Resumo	29
5.1.1. Abstract	31
5.2. Introdução	32
5.3. Materiais e Métodos	33
5.3.1. Ética na experimentação	33
5.3.2. Seleção dos animais experimentais	33
5.3.3. Desenho Experimental	34
5.3.4. Suplementação Alimentar	35
5.3.4.1. <i>Creep feeding</i>	35
5.3.4.2. Planos nutricionais para desenvolvimento corporal	35
5.3.5. Mensurações de desempenho corporal	36
5.3.5.1. Altura de Cernelha	36
5.3.5.2. Profundidade do Tórax	36

5.3.6. Avaliações de carcaça	36
5.3.6.1. Área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea nas costelas (EGS) e espessura de gordura subcutânea na garupa (EGP8)	36
5.3.7. Produção de Embriões <i>In Vitro</i>	37
5.3.7.1. Recuperação de ovócitos	37
5.3.7.2. Seleção e classificação dos ovócitos	38
5.3.7.3. Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos (MIV)	39
5.3.7.4. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	39
5.3.7.5. Cultivo <i>in vitro</i> de embriões (CIV)	40
5.3.8. Análise Lipídica	40
5.3.9. Análise Estatística	42
6. Resultados	42
7. DISCUSSÃO	47
8. CONCLUSÃO	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

EFEITO DE PLANOS ALIMENTARES NO CRESCIMENTO DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES E NA PRODUÇÃO DE OVÓCITOS E EMBRIÕES *IN* *VITRO*

Ricardo Braz de Toledo¹, Ivo Pivato¹, Carlos Frederico Martins²

¹Universidade de Brasília; ²Embrapa Cerrados

No presente experimento objetivou-se superar de forma estratégica, os obstáculos para produção *in vitro* de embriões, a partir de material genético superior de bezerras e novilhas pré-púberes. Foram utilizadas 33 bezerras nelore pré-púberes, separadas e manejadas em 2 planos alimentares diferentes (PN1 e PN2) com ganhos de peso projetados de 400g/dia e 800g/dia, respectivamente. Com relação aos parâmetros de desenvolvimento corporal foram observados área de olho de lombo (AOL) de 50,16 mm²±2,13 no plano alimentar 1 (PN1) e 48,78 mm²±2,25 no plano alimentar 2 (PN2) (P=0,075), espessura de gordura subcutânea (EGS) de 3,11 mm±0,48 em PN1 e 3,70 mm±0,59 em PN2 (P=0,013), espessura de gordura subcutânea na garupa (EGSP8) com 4,12 mm±0,99 para PN1 e 5,23 mm±0,56 para PN2 (P=0,001), altura de cernelha (ACN) de 133,23 cm±2,69 em PN1 e 137,0 cm±9,44 em PN2 (P=0,197), e por fim profundidade de tórax (PFT) de 55,23 cm±3,38 para PN1 e 58,31±2,38 cm para PN2 (P=0,009). Foram verificados número de folículos ovarianos em PN1 de 150,43±19,60 e 170,57±22,86 em PN2 (P=0,516), número de ovócitos recuperados de 87,33±25,73 em PN1 e 129,17±35,18 em PN2 (P=0,043), número de ovócitos viáveis por fêmea jovem foi superior para PN2 (P=0,025), apesar do número ovócitos não fecundáveis (G4) ser superior para o tratamento PN2 (P=0,008). Quanto a quantidade de embriões produzidos, constatou-se que PN1 produziu 3,29±1,14 embriões por animal e PN2 4,71±1,76 (P=0,169); em número de embriões produzidos por OPU, PN1 apresentou 16,66±12,50 e PN2 26,50±15,80 (P=0,259), a taxa de clivagem em PN1 foi de 77,7%, em PN2 foi de 75,0% e em controle FIV foi de 83,2% (P=0,162), a taxa de blastocistos em D7 em PN1 foi de 21,4%, em PN2 foi de 25,1% e em controle FIV foi de 35,6% (P=0,02). Foi observado que os planos nutricionais foram benéficos ao desenvolvimento corporal, taxas de recuperação de ovócitos e produção de embriões, onde PN2 obteve valores semelhantes ao obtido com ovários de vacas adultas de abatedouros, e foi superior aos dados de literatura para animais de idade semelhante.

Palavras chaves: 1. Bovinos; 2. Embriões; 3. Fecundação *in vitro*; 4. Novilhas nelore pré-púberes; 5. Nutrição.

ABSTRACT

EFFECT OF NUTRITION PLANS ON THE GROWTH OF PREPUBERAL NELORE HEIFERS AND ON *IN VITRO* OOCYTE AND EMBRYO PRODUCTION

Ricardo Braz de Toledo¹, Ivo Pivato¹, Carlos Frederico Martins²
¹Universidade de Brasília; ²Embrapa Cerrados

In this sense, the present experiment aimed to strategically overcome the obstacles for *in vitro* embryo production from superior genetic material from calves and prepubertal heifers. Thirty-three prepubertal Nelore heifers were used, separated and managed in 2 different feeding plans (FP1 and FP2) with projected weight gains of 400g/day and 800g/day, respectively. Regarding the parameters of body development, rib-eye area got value of 50.16mm²±2.13 in feeding plan 1 (FP1) and 48.78 mm²±2.25 in feeding plan 2 (FP2) (P=0.075), subcutaneous fat thickness of 3.11 mm±0.48 in FP1 and 3.70 mm±0.59 in FP2 (P=0.013), subcutaneous rump fat thickness with 4.12 mm±0.99 for FP1 and 5.23 mm±0.56 for FP2 (P=0.001), height of withers of 133.23 cm±2.69 in FP1 and 137.0 cm±9.44 in FP2 (P=0.197), and finally chest depth of 55.23 cm±3.38 for FP1 and 58.31 cm±2.38 for FP2 (P=0.009). The number of ovarian follicle ins PN1 was 150.43±19.60 and 170.57±22.86 in PN2 (P=0.516), number of recovered oocytes of 87.33±25.73 in PN1 and 129.17±35.18 in PN2 (P=0.043), the number of viable oocytes per young female was higher for PN2 (P=0.025), despite the number of non-fertilized oocytes (G4) being higher for the PN2 treatment (P=0.008). Regarding the amount of embryos produced, it was found that PN1 produced 3.29±1.14 embryos per animal and PN2 4.71±1.76 (P=0.169); in number of embryos produced by OPU, PN1 presented 16.66±12.50 and PN2 26.50±15.80 (P=0.259), the cleavage rate in PN1 was 77.7%, in PN2 it was 75.0% and in control IVF it was 83.2% (P=0,162), the rate of blastocysts in D7 in PN1 was 21.4%, in PN2 it was 25.1% and in control IVF it was 35.6% (P=0,02). It was observed that nutritional plans were beneficial to body development, oocyte recovery rates and embryo production, where PN2 obtained values similar to those obtained with ovaries of adult cows from slaughterhouses, and was superior to literature data for animals of similar age.

Keywords: 1. Cattle; 2. Embryos; 3. *In vitro* fertilization; 4. Prepubertal Nelore Heifers; 5. Nutrition.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - A) Área de olho de lombo (AOL) do plano nutricional 1 (PN1); B) Espessura de gordura subcutânea (EGS) do plano nutricional 2 (PN2)	37
FIGURA 2 - A) Ovócitos graus 1, 2 e 3 selecionados para maturação do plano nutricional 2 (PN2); B) Ovócitos graus 1, 2 e 3 selecionados para maturação, e grau 4 para descarte do plano nutricional 1 (PN1)	39
FIGURA 3 - A) Embriões em D7 do plano nutricional 1(PN1); B) Embriões em D7 do plano nutricional 2 (PN2)	40
FIGURA 4 - Imagem representativa da microscopia confocal (LSM Leica sp8; laser argon 488-nm, objetiva x20) dos embriões corados com Bodipy 493/503. A: Análise lipídica do plano nutricional 2; B: Análise lipídica do plano nutricional 1	41
FIGURA 5 - Peso médio do grupo de animais dos tratamentos do plano nutricional 1 (PN1) e do plano nutricional 2 (PN2) durante as pesagens mensais	42
FIGURA 6 - Ganho médio de peso diário do grupo de animais dos tratamentos do plano nutricional 1 (PN1) e do plano nutricional 2 (PN2) durante as pesagens mensais	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Seleção das fêmeas nelore pré-púberes considerando a idade, peso e mérito genético médio do grupo no momento da desmama..... 34
- Tabela 2 - Ganho de peso médio mensal e diferença entre pesos iniciais e finais dos tratamentos de suplementação alimentar PN1 e PN2 em novilhas Nelore pré-púberes..... 43
- Tabela 3 - Parâmetros (média \pm desvio padrão) de desempenho de desenvolvimento corporal entre as novilhas Nelore pré-púbere submetidas a dois planos nutricionais..... 44
- Tabela 4 - Quantidade (média \pm desvio padrão) de folículos ovarianos por animal, ovócitos recuperados e qualidade de ovócitos recuperados por OPU de novilhas Nelore pré-púberes submetidas a dois planos nutricionais..... 45
- Tabela 5 - Número (média \pm desvio padrão) de ovócitos por animal, embriões por animal e por sessão de OPU e taxas de clivagem e embriões de novilhas Nelores pré-púberes submetidas a dois planos nutricionais..... 46
- Tabela 6 - Percentagem da área da área ocupada pelos lipídeos em razão da área total dos ovócitos maturados em diferentes sistemas..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCZ = Associação Brasileira dos Criadores de Zebu
ACN = Altura de cernelha
ANCP = Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores
AOL = Área de olho de lombo
CCO = Complexo cumulus ovócito
CIV = Cultivo *in vitro*
D3Pg = Probabilidade de parto precoce
DACABg = Acabamento de carcaça
DIF Pi-Pf = Diferença peso inicial e peso final
DP210g = Efeito direto de peso aos 210 dias
DP365g = Efeito direto de peso aos 365 dias
DPE365g = Perímetro escrotal aos 365 dias
DSTAYg = Tempo de permanência no rebanho
E2 = Estradiol
EGS = Espessura de gordura subcutânea nas costelas
EGSP8 = Espessura de gordura subcutânea na garupa
FIV = Fecundação *in vitro*
FSH = Hormônio folículo estimulante
IA = Inseminação artificial
IATF = Inseminação artificial em tempo fixo
IGF-1 = Fator de crescimento tipo insulina 1
LH = Hormônio luteinizante
MGTe = Mérito genético total econômico
MIV = Maturação *in vitro*
MP120g = Efeito materno aos 120 dias
OPU = *Ovum pick-up* / Aspiração folicular guiada por ultrassom
P4 = Progesterona
PB = Proteína bruta
PBS = *Phosphate buffered saline*
PFT = Profundidade de tórax
PIVE = Produção *in vitro* de embriões
PN = Plano nutricional
PTA = *Predicted transmitting ability*
PVP = Polivinilpirrolidona
RGN = Registro genealógico de nascimento
SFB = Soro fetal bovino
SOF = Fluido ovidutal sintético

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biotécnicas de reprodução animal, como inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e produção *in vitro* de embriões (PIVE) são estratégias fundamentais para a produção em larga escala de carne e leite (Baruselli, 2016). O Brasil ocupa atualmente lugar de destaque no fornecimento de carne, sendo responsável por mais de 26% da exportação mundial em 2020 (ABIEC, 2021).

O uso da biotecnologia reprodutiva ganhou destaque na produção comercial com a busca do melhoramento genético e eficiência reprodutiva nos rebanhos de corte. Embora a inseminação artificial seja uma biotecnologia reprodutiva antiga e de impacto na bovinocultura de corte (Reichenbach et al., 2008), percentualmente não é representativa, e estima-se que de 72,5 milhões de fêmeas bovinas em idade reprodutiva presentes no rebanho brasileiro (vacas e novilhas; ANUALPEC, 2018), apenas 13,1% são inseminadas artificialmente, sendo 86,3% das inseminações realizadas em tempo fixo (13,3 milhões de IATF) (Baruselli et. al., 2019). O surgimento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) tem impactado positivamente o comércio de sêmen no país, e conseqüentemente ampliado a adoção desta tecnologia, pois permite a inseminação das vacas no começo da estação de monta independente do seu estado cíclico, diminuindo o desperdício de sêmen, material e mão de obra. O protocolo hormonal de sincronização elimina a necessidade de detecção do estro e aumenta a proporção de vacas prenhas no final da estação de monta, aumentando o número de bezerros nascidos. Apesar de ser a principal biotécnica usada na multiplicação de rebanhos de corte e leite, a velocidade dos ganhos genéticos ainda é menor quando comparada com a tecnologia de produção de embriões *in vitro*.

A PIVE é atualmente um procedimento de enorme importância tanto na clínica reprodutiva humana quanto na produção animal. Na área animal, em 2017 a produção mundial de embriões bovinos *in vitro* superou a produção *in vivo* (por superovulação), tornando-se a biotecnologia reprodutiva mais importante, depois da inseminação artificial, para o melhoramento genético (Viana, 2018). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de embriões bovinos pela técnica de fecundação *in vitro* (Viana et al., 2017) e em larga escala teve um enorme impacto na evolução genética dos rebanhos. Estima-se que cerca de 20% dos

animais nascidos e registrados (RGN) na Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ) foi associado ao uso de tecnologias de produção de embriões (Viana et al., 2017).

A utilização dos embriões *in vitro* na pecuária tem sido o aspecto mais promissor dos anos recentes, depois dos avanços trazidos pelo controle farmacológico do ciclo estral e da ovulação. A produção de embriões pela fecundação *in vitro* (FIV) contribui decisivamente para uma maior eficiência reprodutiva, e se destaca por ser um instrumento de multiplicação rápida do material genético melhorado existente, encurtando o intervalo de gerações e intensificando a seleção, além da maior eficiência no controle da taxa de endogamia, o que oferece vantagens substanciais na taxa de melhoramento genético.

A viabilidade do uso comercial da PIVE foi diretamente associada ao desenvolvimento da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*ovum pick-up*-OPU). Esta técnica possibilita a coleta de ovócitos sem a necessidade de uma abordagem cirúrgica ou laparoscópica (Kruip et al., 1994, Santl et al., 1998), reduzindo os potenciais riscos e sequelas para as doadoras. A OPU pode ser realizada em intervalos tão curtos quanto 3 a 4 dias, e em animais pré-púberes (Majerus et al., 1999), potencializando o número de embriões produzidos por doadora em um mesmo intervalo de tempo. Na Embrapa, a pesquisa com produção de embriões de animais pré-púberes começou a ser desenvolvida no final da década de 1990. Contudo, uma série de entraves técnicos limitava a viabilidade econômica e, conseqüentemente, a adoção de animais pré-púberes como doadoras para a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Este cenário, contudo, vem mudando rapidamente, em função não apenas do aumento na eficiência da PIVE, mas principalmente pelos avanços nos equipamentos para aspiração folicular guiada por ultrassonografia e no campo da genômica.

A multiplicação de bezerras e novilhas pré-púberes superiores tem sido permitida, pois hoje já é possível estabelecer o valor genômico destas categorias, ou seja, identificar animais melhoradores antes mesmo que estas atinjam a vida adulta e entrem em fase reprodutiva. A avaliação genômica permite a identificação de animais geneticamente superiores logo após o seu nascimento para direcioná-los para testes de progênie ou mesmo para programas de produção *in vitro* de embriões (Batista et al., 2015). Essa inovação tecnológica acelera e aumenta a confiabilidade da seleção genética tradicional baseada na expressão fenotípica, principalmente quando são aplicadas em animais jovens (Coutinho et al., 2010).

A produção de embriões de bezerras identificadas precocemente como animais geneticamente superiores tem um enorme potencial para os programas de melhoramento genético, tanto em raças leiteiras como de corte. A técnica reduz ainda mais o intervalo entre

as gerações e acelera o ganho genético dos rebanhos, contribuindo para aumentar a eficiência e sustentabilidade dos sistemas de produção de leite e carne. O impacto é ainda mais significativo para as raças zebuínas, que são à base da maior parte do rebanho brasileiro, e que tem puberdade mais tardia em relação aos taurinos. Os benefícios potenciais desta estratégia têm sido percebidos pelo setor produtivo, que reconheceu os ganhos potenciais e vem sendo demandado o desenvolvimento da técnica. No entanto, essa categoria animal apresenta gametas com baixa competência para o desenvolvimento de blastocistos (Camargo et al., 2005; Zaraza et al., 2010; Guerreiro, 2015).

Programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) também podem ser aplicados nesta categoria, para auxiliar na antecipação da puberdade, porém os resultados ainda necessitam evoluir, especialmente nos animais zebuínos. Segundo Carvalho et al. (2008) novilhas zebuínas apresentaram comprometimento na taxa de crescimento do folículo dominante e menor taxa de ovulação que as novilhas taurinas. Assim, levantou-se a hipótese de que novilhas *Bos indicus* são mais sensíveis aos níveis circulantes de progesterona (P4) liberados por dispositivos intravaginais utilizados nos protocolos para IATF. Ainda, foi verificado que as fêmeas *Bos indicus* apresentaram menor taxa de crescimento, menor diâmetro máximo do folículo dominante e menor taxa de ovulação que as *Bos taurus*.

Segundo Freitas et al. (2015), o desenvolvimento corporal apresenta relação positiva com a ciclicidade de novilhas nelore precoces. Para que as bezerras possam atingir o maior peso no momento da aspiração folicular e produção de embriões, bem como as novilhas sobreano na inseminação artificial, estratégias nutricionais são extremamente importantes. Considerando que o peso e a condição corporal das novilhas são fundamentais para o início da reprodução, estratégias nutricionais associadas à seleção de animais superiores, protocolos de estimulação hormonal e programas de IATF específicos para novilhas foram utilizados neste experimento, visando reduzir a idade ao primeiro parto e aumentar as taxas de prenhez, garantindo antecipação no abate e conseqüente melhoria dos ganhos econômicos na atividade pecuária.

Diante do exposto, nesse trabalho objetivou-se estudar o uso da suplementação alimentar para melhorar produção e competência de ovócitos recuperados por OPU, assim como a produção de embriões produzidos *in vitro* a partir de material genético superior de bezerras e novilhas pré-púberes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da antecipação da reprodução em fêmeas Nelore

O Brasil possui cerca de 214,8 milhões de bovinos (IBGE, 2019), sendo o Nelore a principal raça de corte criada no Brasil, representando cerca de 80% do rebanho total. Um dos fatores que mais limitam o bom desempenho na pecuária de corte são os índices reprodutivos (Pessuti e Mezzadri, 2004).

Segundo Araujo et al. (2019), a precocidade sexual tem sido um dos principais objetivos a se alcançar na pecuária moderna, visto que dentre seus benefícios estão: redução da idade ao primeiro parto, redução do intervalo de gerações, redução da idade de abate, diminuição do custo do animal na propriedade, dentre outros benefícios. Fatores como herança genética, fatores de ambiente, nutrição e a presença de machos, estão associados à indução de puberdade em novilhas.

Fêmeas taurinas atingem a puberdade com média de 10 a 15 meses de idade, enquanto as fêmeas zebuínas atingem entre 16 e 40 meses (Hafez & Hafez, 2004). As novilhas, então, passam a ser a categoria animal que mais limita o retorno econômico, devido a idade ao primeiro parto ser um dos fatores que determinam a eficiência reprodutiva do animal, impactando assim no custo de manutenção das novilhas zebuínas (Baruselli et al., 2014).

Segundo Rocha & Lobato (2002), o produtor que deseja emprenhar suas novilhas com cerca de 1 ano de idade para que elas possam ter seu primeiro parto por volta de 2 anos, deve tomar algumas medidas relacionadas ao manejo, nutrição e seleção genética, dentre outras, para que possa atingir este objetivo.

Através da análise de animais da raça Nelore, Mercadante et al. (2003) reportaram diferença entre a concepção média total do rebanho e a reconcepção de novilhas primíparas igual a 20%. Então, incrementos nas taxas de reconcepção de novilhas podem levar a melhor eficiência econômica na pecuária de corte.

Desta maneira, existe uma constante procura por técnicas que permitam a melhora dos índices de eficiência reprodutiva da fêmea Nelore (Araujo et al., 2018).

2.2. Fisiologia reprodutiva de fêmeas pré-púberes

O início da puberdade é definido como a primeira demonstração de estro e ovulação, seguido por uma fase luteínica de duração normal. Esta é a primeira oportunidade de uma novilha conceber (Atkins et al., 2013; Perry, 2016).

Embora exista dependência de uma idade mínima relacionada também ao ganho de peso para se iniciar a reprodução de uma fêmea, outros pontos como fatores genéticos e ambientais, estão diretamente relacionados a idade de início da sua puberdade (Patterson et al., 1992).

Para que as bezerras no período pós-natal não ativem seu sistema reprodutivo, mecanismos endócrinos são modificados. Isto ocorre para que o desenvolvimento do animal seja compatível com as condições necessárias para reprodução (atingir cerca de 65% a 70% do peso adulto) e então ocorra a sinalização de que o gasto de energia necessário para o crescimento e desenvolvimento da fêmea já não são prioridades para seu organismo, permitindo então que os nutrientes sejam, em parte, direcionados para gestação, parto e lactação (Semmelmann et al., 2001).

O início da vida reprodutiva mais precoce e uma idade ao primeiro parto menor contribuem para um melhor desempenho reprodutivo do rebanho, desde que dentro dos limites fisiológicos dos animais para não prejudicar seu desempenho futuro, e a atividade ovariana num curto período pós-parto (Borges et al., 2009).

Segundo Patterson et al. (1992), nos mamíferos, o último sistema a ser ativado, é o sistema reprodutivo. Apesar de, logo após a formação da gônada ser iniciado o crescimento folicular, e com ele a produção de esteroides, entretanto a ovulação não ocorre até o início da puberdade.

Freitas (2005) cita alguns parâmetros que caracterizam a precocidade sexual, entre eles: aumento antecipado de pulsos de hormônio luteinizante (LH), diâmetro de folículos dominantes, concentrações de estradiol e duração de ondas foliculares no período pré-púbere. Sendo assim, a introdução de métodos que avaliem o grau de maturidade sexual de novilhas, podem impactar nas taxas de concepção.

2.3. Competência ovocitária para reprodução assistida

A eficiência de todo o processo de maturação *in vitro* (MIV), fecundação dos ovócitos e desenvolvimento dos embriões ainda não atinge índices satisfatórios. Quando se compara o número de gestações provenientes de embriões *in vitro* e os produzidos *in vivo*, nota-se que sua eficiência ainda é baixa, visto que após os processos de MIV, fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), apenas 30 a 40% destes se desenvolvem em blastocistos (Sirard et al., 2006).

A qualidade ovocitária é o fator de maior influência nas taxas de blastocistos, sendo determinante para obter melhores resultados na produção *in vitro* de embriões (PIVE) (Rizos et al., 2005). Alguns fatores têm influência direta na qualidade dos ovócitos e consequentemente na formação de blastocistos, como o estado fisiológico e reprodutivo da doadora, tamanho dos folículos e integridade das células do cumulus (Maillo et al., 2012).

Segundo Gottardi & Mingoti (2009), conhecer todos os fatores que regulam o crescimento ovocitário e de suas células foliculares, é de extrema importância para o entendimento do desenvolvimento folicular e da fisiologia, para que se obtenha sucesso na produção *in vitro* de embriões. É crucial se conhecer todos os mecanismos envolvidos na maturação dos ovócitos, para que se obtenha embriões em quantidade e qualidade (Van Den Hurk & Zhao, 2005).

Segundo Wit et al. (2000), na produção *in vivo* de embriões, em um momento específico do ciclo estral da fêmea, o ovócito é doado por um folículo saudável. Quando falamos na produção *in vitro*, isto não ocorre, visto que no processo de *ovum pick up* (OPU) os ovócitos são obtidos de folículos em diferentes momentos de seu desenvolvimento e em fases diferentes do ciclo estral, logo eles estão expostos a diferentes concentrações de LH, hormônio folículo estimulante (FSH) e progesterona, e estas condições influenciam na competência ovocitária para o correto desenvolvimento *in vitro*.

2.4. Estratégias de suplementação alimentar para antecipação da reprodução de fêmeas de corte

Segundo Robinson et al. (2006) o fornecimento de nutrientes específicos para os ruminantes, são necessários para os processos de desenvolvimento folicular, ovulação,

maturação ovocitária, fertilização, sobrevivência embrionária e manutenção da gestação; e, indiretamente, regulando a concentração de hormônios necessários.

Para que se atinja um desempenho reprodutivo eficiente, é de grande importância que ocorra um balanceamento e consumo adequado de energia, proteínas, vitaminas e minerais (Pires, 2011).

Na nutrição, a energia é o principal determinante na eficiência reprodutiva animal, embora minerais, vitaminas e proteínas também sejam essenciais. Funções reprodutivas como ciclicidade estral e início de gestação, são de baixa prioridade quanto a partição dos nutrientes, e só quando a demanda necessária para manutenção, crescimento e reserva forem supridas, que as funções reprodutivas são ativadas (Chaves et al., 2011).

Um dos efeitos da restrição alimentar nas fêmeas é a supressão da pulsatilidade de hormônio luteinizante (LH), este necessário para que ocorra o crescimento folicular ovariano até o momento pré-ovulatório. Além de suprimir o LH, a restrição de nutriente tem também um efeito negativo quanto as concentrações do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), que leva a uma menor produção de estradiol (E2), levando a não ovulação (Yelich et al., 1996).

Segundo Webb et al. (2004) dentre os fatores envolvidos nos processos reprodutivos, devem-se destacar as ações da glicose, IGF-1 e insulina, cujas variações de concentrações sanguíneas variam de acordo com o nível nutricional e fisiológico do animal. Como apresentado por Sartori et al. (2007) e Santos et al. (2008) resultados positivos foram obtidos na população folicular e número de ovulações, através da alta ingestão alimentar associada com altas concentrações circulantes de IGF-1 e insulina.

Segundo Bagley (1993), novilhas de reposição devem ser desmamadas com o maior peso possível, visto que uma fêmea de raça de corte necessita ter cerca de 60% a 65% do seu peso adulto para entrar na puberdade. Foi demonstrado que novilhas pré-puberes que tiveram um bom nível de ganho de peso pós desmama, tiveram aumento pulsátil de LH e sua puberdade antecipada.

Pesquisas mais recentes mostram uma certa flexibilidade quanto a maneira como estes animais atingem o peso desejado. Estudos têm indicado que o investimento para novilhas atingirem cerca de 50 a 57% do seu peso adulto no início da estação de monta, pode ser economicamente viável (Martin et al., 2008; Endecott et al., 2013).

Estudos conduzidos por Thallman et al. (1999) avaliando diferentes raças, as novilhas, observaram que chegaram à puberdade com cerca de 405 dias (13,5 meses) e média de 341kg de peso vivo. Gasser (2013) postula que o ideal seria obter um ganho de peso

adequado, que resulte em alta eficiência reprodutiva na primeira cobertura com cerca de 13 a 15 meses de idade, onde a maioria das novilhas atinjam sua puberdade cerca de 30-45 dias antes do início da estação reprodutiva. Ferrell (1982) evidenciou que com o aumento no ganho de peso pós desmama, a maturidade sexual é atingida em idade reduzida. Estes estudos mostram que além de outros fatores, o ganho de peso no período pós desmama é de extrema importância e influência na idade que o animal atinge a puberdade (Patterson et al., 1992).

Gasser et al. (2006) desenvolveram trabalhos correlacionando efeitos genéticos e nutricionais com a puberdade precoce de novilhas *Bos taurus taurus*. Estas foram suplementadas com dietas de alto teor de concentrado desde a desmama, apresentando uma taxa média de puberdade precoce de 84% com cerca de 7,8 meses de idade, já no grupo controle a taxa de puberdade foi de 19% aos 11,6 meses de idade. Segundo Nogueira (2004) e Nepomuceno (2017), em fêmeas *Bos taurus indicus*, a puberdade precoce foi atingida somente com 14 meses de idade com suplementação energética.

Em estudos conduzidos por Pacola et al. (1993), avaliando o efeito da suplementação alimentar nas fases pré e pós-desmama em fêmeas Nelore, o concentrado do *creep-feeding* foi composto por 80% de milho e 20% de farelo de algodão, com consumo médio de 0,328 kg/cab./dia. Na fase pós desmama os animais receberam diariamente 9,9kg de silagem de milho e 0,69kg de farelo de algodão. Foi então evidenciado que o grupo de fêmeas suplementadas nos períodos pré e também pós-desmama foram superiores as demais (suplementadas somente na pré-desmama, somente no pós-desmama, e sem suplementação) aos 210 dias (diferença de 13,7kg/cab.), 390 dias (11,4kg/cab.) e aos 550 dias (9,7kg/cab.). Foi verificado também, que nestes grupos avaliados, o efeito da suplementação pré-desmama foi mais significativo do que no período pós-desmama, onde a diferença do ganho de peso foi maior entre os grupos no período pré-desmama.

2.5. Importância das Análises Genômicas Associadas a FIV e IATF

No balanço econômico da produção de bovinos de corte no Brasil, as características reprodutivas são de extrema importância (Brumatti et al., 2011), porém não são amplamente utilizadas pelos programas de melhoramento genético devido a alguns fatores, como a baixa herdabilidade das características de fertilidade e pela dificuldade de mensuração e interpretação de algumas delas (Silva et al., 2003; Boligon et al., 2007).

Dentre as características reprodutivas que caracterizam fertilidade que são utilizadas pelos programas de melhoramento genético, está a idade ao primeiro parto, devido a sua fácil mensuração e por marcar o início da vida reprodutiva das novilhas (Baldi et al., 2008).

Dias et al. (2004) afirmam que na seleção para idade ao primeiro parto, as novilhas devem ser desafiadas precocemente, mas é importante que seja dado o manejo adequado para tal desafio, para que a fêmea tenha condição de expressar suas características de fertilidade.

Desta maneira, faz-se necessária a avaliação genética de um número muito grande de animais para que se atinja um nível satisfatório de acurácia. Então, a avaliação genômica vem como uma alternativa para seleção de características reprodutivas, permitindo um aumento da acurácia das informações e diminuição do intervalo de gerações através da inclusão da informação genotípica nos modelos de avaliação (Snelling et al., 2012).

Segundo Fortes et al. (2013) a natureza poligênica de características reprodutivas está associada com importantes regiões genômicas de 30 cromossomos. No trabalho, os autores destacaram regiões nos cromossomos 1, 5, 14 e 16, para características reprodutivas em fêmeas, como taxa de prenhez, taxa de ovulação, prenhez em novilhas, dentre outras características importantes. Para Burns et al. (2010), as características de idade à puberdade e idade ao primeiro parto seriam de principal influência na vida reprodutiva de fêmeas.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar se a utilização de suplementação alimentar, poderia antecipar a reprodução de fêmeas pré-púberes de corte da raça Nelore de alto mérito genético por meio do desenvolvimento de ferramentas de reprodução assistida e planos nutricionais.

3.2. Objetivos Específicos

Estabelecer um processo de suplementação nutricional para preparação de novilhas pré-púberes e melhorar a produção de embriões por fecundação *in vitro*. Avaliar o

crescimento das novilhas através da mensuração do ganho de peso, altura de cernelha e profundidade de costelas, avaliar a quantidade e qualidade de ovócitos e embriões produzidos em resposta aos planos nutricionais adotados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUALPEC: ANUARIO DA PECUARIA BRASILEIRA, São Paulo, 2018.

ARAUJO, A. C. C.; NONATO, M. S.; BEZERRA, A. R. A. et al. Induction of ovulation in heifers with memorandum of cyclicity. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 24286-24290, 2019.

ARAUJO, A. C. R.; SALES, A. F. F.; FERREIRA, J. P. V.; NEVES NETO, J. T. Indução à puberdade em novilhas. **In: Colóquio Estadual de Pesquisa Interdisciplinar e Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar**, II-I. Anais... 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES – ABIEC. Perfil da Produção Bovina no Brasil, 2020. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/>

ATKINS, J. A.; POHLER, K. G.; SMITH, M. F. Physiology and endocrinology of puberty in heifers. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 3, p. 479–492, 2013.

BAGLEY, C. P. Nutritional management of replacement beef heifers – a review. **Journal of Animal Science**, v.71, n. 11, p.3155 – 3163, 1993.

BALDI, F.; ALENCAR, M.M. de; FREITAS, A.R.; BARBOSA, R.T. Parâmetros genéticos para características de tamanho e condição corporal, eficiência reprodutiva e longevidade em fêmeas da raça Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.247-253, 2008.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M.O.; FERREIRA, R.M. et al. Como aumentar a quantidade e a qualidade de bezerros em rebanhos de corte. **Revista Brasileira da Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1327-1331, 2014.

BARUSELLI, P.S. IATF supera dez milhões de procedimentos e amplia o mercado de trabalho. **Revista CFMV**, v. 22, n. 69, p. 57-60, 2016.

BARUSELLI, P.S.; B.L.C.; ABREU, L.A.; ELLIFF, F.M.; SILVA, L.G.; BATISTA, E.S.; CREPALD, G.A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019)**; Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.

BATISTA, E.O.S; GUERREIRO, B.M.; FREITAS, B.G.; SILVA, J.C.B.; VIEIRA, L.M.; FERREIRA, R.M.; RESENDE, R.G.; BASSO, A.C.; LOPES, R.N.V.R.; RENNÓ, F.P.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, PS. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 54, p. 1-9, 2015.

BOLIGON, A.A.; RORATO, P.R.N.; ALBUQUERQUE, L.G. de. Correlações genéticas entre medidas de perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas de fêmeas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.565-571, 2007.

BORGES, A. M.; CARVALHO, B. C.; RUAS, J. R. M. Manejo reprodutivo da vaca mestiça: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.6, p.157-162, 2009 (supl.).

BRUMATTI, R.C.; FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; FORMIGONNI, I.B. Desenvolvimento de índice de seleção em gado de corte sob o enfoque de um modelo bioeconômico. **Archivos de Zootecnia**, v.60, n.230 p.205-213, 2011.

BURNS, B. M.; FORDYCE, G.; HOLROYD, R. G. A review of factors that impact on the capacity of beef cattle females to conceive, maintain a pregnancy and wean a calf- Implications for reproductive efficiency in northern Australia. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1-2, p. 1-22, 2010.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VALE FILHO, VR. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1–2, p. 53–59, 2005.

CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.167–175, 2008.

CHAVES, R. N.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES, A. M. C. V.; & FIGUEIREDO, J. R. (2011). Implicações da insulina na função ovariana e desenvolvimento embrionário. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5(2), n.2, p.136-146, 2011.

COUTINHO, L.L.; ROSÁRIO, M.F.; AND JORGE, E.C. **Biotecnologia animal. Estudos Avançados**, v. 24, p. 123–147, 2010.

DIAS, L.T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L.G. de. Efeito da idade de exposição de novilhas à reprodução sobre estimativas de herdabilidade da idade ao primeiro parto em bovinos Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.370-373, 2004.

ENDECOTT, R. L.; FUNSTON, R. N.; MULLINIKS, J. T.; ROBERTS, A. J. Implications of beef heifer development systems and lifetime productivity. **Journal of animal science**, v. 91, n. 3, p. 1329–35, 11 mar. 2013. Trabalho apresentado a Alpha Beef Cattle Nutrition Symposium no Joint Annual Meeting, July 15th to 19th, Indianapolis, Indiana.

FERRELL, C. L. Effects of postweaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. **Journal of animal science**, v. 55, n. 6, p. 1272–83, dez. 1982.

FORTES, M. R.; DEATLEY, K. L.; LEHNERT, S. A.; BURNS, B. M.; REVERTER, A.; HAWKEN, R. J.; HANSEN, G. B.; MOORE, S. S.; & THOMAS, M. G. (2013). Genomic regions associated with fertility traits in male and female cattle: advances from microsatellites to high-density chips and beyond. **Animal Reproduction Science**, v. 141 n. 1-2, p. 1-19, 2013.

FREITAS, BRUNO GONZALES DE. Influência do desenvolvimento corporal na resposta aos programas de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo em novilhas Nelore de 14 meses. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

FREITAS, SUZANA PEREIRA GOMES DE. Desempenho de novilhas expostas à reprodução aos 14/15 meses de idade. 2005.

GASSER, C. L. Considerations on puberty in replacement beef heifers. **Journal of animal science**, v. 91, n. 3, p. 1336–40, 15 mar. 2013. Trabalho apresentado a Alpharma Beef Cattle Nutrition Symposium no Joint Annual Meeting, July 15th to 19th, Indianapolis, Indiana.

GASSER, C. L.; BEHLKE, E. J.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. 2006. Effect of timing of feeding high concentrate diet on growth and attainment of puberty in early-weaned heifers. **Journal of Animal Science**, v.84, n. 11, p 3118-3122, 2006.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z.; Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v.33, n.2, p.82-94, 2009.

GUERREIRO, B.M. Produção in vitro de embriões de doadoras pré púberes da raça Holandesa. 2015. **Universidade de São Paulo, 2015.**

HAFEZ, E. S.; HAFEZ, B. **Fisiologia da reprodução**. 7 ed. São Paulo: Manole, p.513, 2004.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>

KRUIP, T. A.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M. W.; PIETERSE, M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology** v.42, n.4, p.675-684, 1994.

MAILLO, V.; RIZOS, D.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; KELLY, A. K.; GARRETT, M.; LONERGAN, P. Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, n. 7, p. 3865–76, jul. 2012.

MAJERUS V.; DE ROOVER, R.; ETIENNE D.; KAIDI, S.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. **Theriogenology** v.52, n.7, p.1169-1179, 1999.

MERCADANTE, M.E.Z.; PACKER, I.U.; RAZOOK, A.G.; CYRILLO J.N.S.G.; FIGUEIREDO, L.A. Direct and correlated responses to selection for yearling weight on reproductive performance of Nelore cows. **Journal of Animal Science**,v.81, p.376- 384, 2003.

MARTIN, J. L.; CREIGHTON, K. W.; MUSGRAVE, J. A.; KLOPFENSTEIN, T. J.; CLARK, R. T.; ADAMS, D. C.; FUNSTON, R. N. Effect of prebreeding body weight or progestin exposure before breeding on beef heifer performance through the second breeding season. **Journal of animal science**, v. 86, n. 2, p. 451–9, fev. 2008.

NEPOMUCENO, D. D.; PIRES, A. V.; FERRAZ JUNIOR, M. V. C.; BIEHL, M. V.; GONCALVES, J. R. S.; MOREIRA, E. M.; DAY, M. L. 2017. Effect of pre-partum dam supplementation, creep-feeding and post-weaning feedlot on age at puberty in Nellore heifers. **Livestock Science**, v.195, p.58-62, 2017.

NOGUEIRA, G. P. 2004. Puberty in South America Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.361-372, 2004.

PACOLA, LAÉRCIO JOSÉ; RAZOOK, ALEXANDER GEORGE; DE FIGUEIREDO, LEOPOLDO ANDRADE. Suplementação pré e pós desmama de fêmeas zebuínas da raça nelore. **Boletim de Indústria Animal**, v. 50, n. 1, p. 35-41, 1993.

PATTERSON, D. J.; PERRY, R.C.; KIRACOFÉ, G.H.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; CORAH, L.R. Management considerations in heifers development and puberty. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p. 4018-4035, 1992.

PERRY, G. A. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 373-378, 2016.

PESSUTI, O. & MEZZADRI, F. P. Atualidade e perspectivas da pecuária paranaense. In: **Anais Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1., 2004, Londrina**. Londrina, 2004. p. 21-27, 2004.

PIRES, A.V.; RIBEIRO, C.V.; MENDES, C. Q. Aspectos nutricionais relacionados à reprodução. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP. p.537-559, 2011.

REICHENBACH, H.D.; MORAES, J.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.; FIGUEIREDO, J.; FREITAS, V. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em bovinos. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal, 2.ed.** São Paulo, Roca: p.57-82, 2008.

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J. F.; O'FARRELL, K. J.; MACSIURTAIN, M.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 939-949, 2005.

ROBINSON, J. J.; ASHWORTH, C. J.; ROOKE, J. A.; MITCHELL, L. M.; & MCEVOY, T. G. (2006). Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v.126 (3-4), p.259-276, 2006.

ROCHA, M. G.; LOBATO, J. F. P. 2002. Avaliação do desempenho reprodutivo de novilhas de corte primíparas aos dois anos de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n. 3, p.1388-1395, 2002.

SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G.; WOLF, E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. **Theriogenology** v.50, n. 1, p. 89-100, 1998.

SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v.69, n.1, p.88- 97, 2008.

SARTORI, R.; BASTOS, M.R.; MOLLO, M.R. et al. Influência da ingestão alimentar na produção de embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35(Supl 3), p.869-873, 2007.

SEMMELMANN, C. E. N.; LOBATO, J. F. P.; ROCHA, M. G. 2001. Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n. 3, p.835-843, 2001.

SILVA, J. A. II de V.; VAN MELLIS, M.H.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Estimação de parâmetros genéticos para probabilidade de prenhez aos 14 meses e altura na garupa em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 5, p. 1141-1146, 2003.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.126-136, 2006.

SNELLING, W. M.; CUSHMAN, R. A.; FORTES, M. R. S.; REVERTER, A.; BENNETT, G. L.; KEELE, J. W.; KUEHN, L. A.; MCDANELD, T. G.; THALLMAN, R. M.; & THOMAS, M. G. (2012). Physiology and Endocrinology Symposium: How single nucleotide polymorphism chips will advance our knowledge of factors controlling puberty and aid in selecting replacement beef females. **Journal of animal science**, v.90 (4), n.4, p.1152-1165, 2012.

THALLMAN, R. M.; CUNDIFF, L. V; GREGORY, K. E.; KOCH, R. M. Germplasm evaluation in beef cattle--Cycle IV: postweaning growth and puberty of heifers. **Journal of animal science**, v. 77, n. 10, p. 2651–2659, 1999.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1717-1751, 2005.

VIANA, J.H.M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer Newsletter**, v.36, n.4, p.8-25, 2018.

VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SIQUEIRA, L.G.B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.476-481, 2017.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G. et al. Control of follicular interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82, n. suppl_13, p.E63-E74, 2004

WIT, A.A.C.; WURTH, Y.A.; KRUIP, A.M. Effect of ovarian and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **J. Anim. Sci.**, v.78, n.5, p.1277-83, 2000.

YELICH, J. V.; WETTERMANN, R. P.; MARSTON, T. T.; SPICER, L. J. 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin like growth factor-1, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. **Domestic Animal Endocrinology**, v.13, n. 4, p.325-338, 1996.

ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; VELAZQUEZ, M.A.; KORSAWE, K.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation in vitro-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 75–89, 2010.

5. CAPÍTULO 2 – Artigo

EFEITO DE PLANOS ALIMENTARES NO CRESCIMENTO DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES E NA PRODUÇÃO DE OVÓCITOS E EMBRIÕES *IN* *VITRO*

5.1. RESUMO

A eficiência reprodutiva do rebanho tem importante impacto econômico na pecuária de corte. Dentre as possibilidades para sua otimização, o manejo nutricional é um dos mais importantes. Com isto, objetivou-se com este trabalho avaliar dois diferentes planos nutricionais (PN) em bezerras e novilhas pré-púberes da raça Nelore, como estratégia para melhorar os parâmetros de desenvolvimento corporal, índices de recuperação ovocitária e produção de embriões através da sua produção *in vitro*. Foram utilizadas 33 bezerras Nelore pré-púberes, divididas em 2 grupos e suplementadas durante 5,5 meses, na fazenda da Embrapa Cerrados localizada em Planaltina-DF. Dentre os parâmetros avaliados quanto ao desenvolvimento corporal, ao final de todas as pesagens, foi observada diferença estatística quanto ao peso final médio dos grupos, evidenciado por Dif Pi-Pf (diferença peso inicial e peso final) entre PN1 e PN2 com valores $120,71 \pm 13,81$ kg e $135,88 \pm 18,55$ kg ($P=0,0133$) respectivamente. Área de olho de lombo (AOL) e altura de cernelha (ACN) não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Espessura de gordura subcutânea (EGS) apresentou $3,11 \pm 0,48$ mm para PN1 e $3,70 \pm 0,59$ mm para PN2 ($P=0,013$), espessura de gordura subcutânea na garupa (EGSP8) $4,12 \pm 0,99$ mm em PN1 e $5,23 \pm 0,56$ mm ($P=0,001$) em PN2 e com relação a profundidade de tórax (PFT) apresentou $55,23 \pm 3,38$ cm em PN1 e $58,31 \pm 2,38$ cm ($P=0,009$) em PN2. O número de ovócitos recuperados por sessão de aspiração folicular (OPU) foi de $87,33 \pm 25,73$ em PN1 e $129,17 \pm 35,18$ ($P=0,043$) em PN2, e ovócitos grau 4 (G4) foi de $16,33 \pm 6,44$ para PN1 e $31,00 \pm 8,60$ para PN2 ($P=0,008$), ambos demonstrando diferenças estatísticas. As fêmeas do tratamento PN2 apresentaram mais ovócitos viáveis por animal que o tratamento PN1. Na produção de embriões, a taxa de blastocistos em D7 foi de 21,4% em PN1, 25,1% em PN2 e 35,6% em controle FIV ($P=0,02$), evidenciando que PN2 obteve valores equivalentes estatisticamente ao controle FIV. Na avaliação lipídica, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos. Desta forma, nesse

estudo foi observado que os planos nutricionais tiveram efeitos positivos quanto ao desenvolvimento corporal dos animais, assim como nas taxas de recuperação de ovócitos, ovócitos viáveis e produção de embriões *in vitro*.

Palavras chaves: 1. Bovinos; 2. Embriões; 3. Fecundação *in vitro*; 4. Novilhas nelore pré-pubescentes; 5. Nutrição.

5.1.1. ABSTRACT

The reproductive efficiency of the herd has an important economic impact on beef cattle. Among the possibilities for its optimization, nutritional management is one of the most important. Thus, the objective of this work was to evaluate two different nutritional plans (NP) in prepubertal Nellore heifers and heifers, as a strategy to improve body development parameters, oocyte recovery rates and embryo production through their production in vitro. Thirty-three prepubertal Nellore heifers were used, divided into 2 groups and supplemented for 5.5 months, on the Embrapa Cerrados farm located in Planaltina-DF. Among the parameters evaluated in terms of body development, at the end of all weighings, a statistical difference was observed regarding the average final weight of the groups, as evidenced by Dif Pi-Pf (initial weight and final weight difference) between PN1 and PN2 with values of 120, 71±13.81kg and 135.88±18.55kg (P=0.0133) respectively. Ribeye area (AOL) and withers height (ACN) did not show statistically significant differences. Subcutaneous fat thickness (EGS) was 3.11±0.48mm for PN1 and 3.70±0.59mm for PN2 (P=0.013), thickness of subcutaneous fat in the rump (EGSP8) 4.12±0.99mm in PN1 and 5.23±0.56mm (P=0.001) in PN2 and with respect to chest depth (PFT) it presented 55.23±3.38cm in PN1 and 58.31±2.38cm (P=0.009) in PN2. The number of retrieved oocytes per follicular aspiration session (OPU) was 87.33±25.73 in PN1 and 129.17±35.18 (P=0.043) in PN2, and grade 4 (G4) oocytes were 16.33±6.44 for PN1 and 31.00±8.60 for PN2 (P=0.008), both demonstrating statistical differences. Females from the PN2 treatment had more viable oocytes per animal than from the PN1 treatment. In embryo production, the blastocyst rate in D7 was 21.4% in PN1, 25.1% in PN2 and 35.6% in IVF control (P=0.02), showing that PN2 obtained values statistically equivalent to the IVF control. In lipid evaluation, there were no statistical differences between treatments. Thus, in this study, it was observed that the nutritional plans had positive effects on the animals' body development, as well as on the recovery rates of oocytes, viable oocytes and in vitro embryo production.

Keywords: 1. Cattle; 2. Embryos; 3. *In vitro* fertilization; 4. Prepubertal Nellore heifers; 5. Nutrition.

5.2 INTRODUÇÃO

A diminuição do intervalo entre gerações representa um ponto fundamental no processo de melhoramento genético dos rebanhos e a exploração da reprodução de fêmeas cada vez mais jovens tem possibilitado um grande ganho genético no processo de seleção de bovinos. A possibilidade de se produzir embriões e produtos de fêmeas jovens pré-púberes tem ganhado destaque em virtude do desenvolvimento de avaliações de predição genômicas para características de interesse, tanto em gado de leite como de corte. O desenvolvimento de equipamentos de aspiração folicular adaptados para bezerras tem tornado a produção *in vitro* de embriões bastante atrativa para essa categoria, uma vez que não provoca manipulações danosas aos animais. Inicialmente, estudos eram realizados em bezerras utilizando-se a técnica de aspiração por laparoscopia através de procedimento cirúrgico (Batista et al., 2016; Baldassarre et al., 2018), posteriormente passaram a ser realizadas por técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU) (Majerus et al., 1999). Atualmente, foi desenvolvida uma guia específica com tamanho adequado para fêmeas jovens com o objetivo de maior eficiência na PIVE desta categoria animal (Elliff et al., 2019).

Sabe-se que a quantidade de embriões produzidos está diretamente relacionada ao número de complexos cumulus-ovócitos (CCOs) recuperados pelo procedimento de OPU. Essa quantidade de CCOs recuperados apresenta alta repetibilidade nas doadoras aspiradas (Monteiro et al., 2017) e deve ser considerada para aumentar a produção de embriões por procedimento. Além disso, outros estudos destacam que animais com elevada população folicular apresentam maior quantidade de ovócitos recuperados por OPU e maior produção de embriões por procedimento (Watanabe et al., 2017). Ainda, verifica-se que novilhas pré-púberes apresentam maior número de folículos disponíveis para aspiração (Landry et al., 2016), porém os índices de produção de embriões *in vitro* desta categoria são inferiores aos de animais adultos (Guerreiro, 2015).

Dentre os fatores que influenciam o desempenho reprodutivo de um rebanho, deve-se ter uma atenção especial a nutrição. Durante as diversas fases reprodutivas, há necessidade de que os níveis de energia, proteína, minerais e vitaminas, sejam suficientes para atender a exigência nutricional que esta fase exige (Dias et. al., 2009).

Os parâmetros reprodutivos da fêmea bovina são de baixa herdabilidade, mas não devem ser desconsiderados devido a sua importância; porém, isso faz com que a influência do ambiente tenha maior impacto sobre o desempenho reprodutivo do que a seleção

genética. Portanto, a reprodução é altamente influenciada pelo ambiente e manejo nutricional (Pereira et. al., 2010).

Segundo Madella-Oliveira et al. (2014) mostraram que a nutrição possui importante papel na manutenção e concentração de substratos celulares que desempenham funções essenciais de estímulo ou inibição de hormônios que influenciam diretamente no desempenho reprodutivo dos ruminantes.

Quando o animal não recebe a quantidade necessária de nutrientes essenciais, processos relacionados a reprodução passam a ficar deficitários, como desenvolvimento folicular, qualidade ovocitária, ovulação, maturação e fertilização, que passam a ter baixa taxa de sucesso (Maggioni et al., 2008; Abreu et al., 2018). O correto desenvolvimento folicular necessita de quantidades adequadas de nutrientes (Valentim et. al., 2019).

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos de dois diferentes planos alimentares no desenvolvimento corporal de bezerras pré-púberes, assim como na qualidade e quantidade de ovócitos e conversão em embriões através da técnica de fecundação *in vitro*.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Ética na experimentação

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Embrapa Cerrados sob o número de protocolo nº. 800-4372-1/2020.

5.3.2 Seleção dos animais experimentais

A seleção dos animais para o experimento levaram em consideração a idade, peso e mérito genético (Tabela 1), onde o mérito genético foi obtido através das informações da avaliação genética da Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP) no momento da desmama, sendo as características selecionadas as seguintes: a) MGT_e: Mérito genético total econômico; b) Peso a desmama: Peso final a data de desmama; c) MP120g: Efeito materno aos 120 dias (kg); d) DP210g: Efeito direto de Peso aos 210 dias (kg); e) DP365g: Efeito direto de Peso aos 365 dias (kg); f) DPE365g: Perímetro escrotal aos 365 dias

(cm); g) DACABg: Acabamento de carcaça (mm²); h) DSTAYg: Tempo de permanência no rebanho (%); i) D3Pg: Probabilidade de parto precoce (%).

Tabela 1. Seleção das fêmeas nelore pré-púberes considerando a idade, peso e mérito genético médio do grupo no momento da desmama.

Tratamentos	Nº animais	Idade média (dias)	MGTe	Peso a desmama	MP120 g	DP210 g	DP365 g	DPE 365g	DA CA Bg	DST AYg	D3Pg
PN1	17	198,71	13,96	178,31	180,11	4,47	13,10	0,57	0,01	71,51	63,14
PN2	17	202,00	15,24	180,11	1,13	5,39	15,05	0,50	0,07	72,11	62,67

5.3.3 Desenho Experimental

No experimento, 33 bezerras da raça Nelore, marca BRGN da Embrapa Cerrados foram suplementadas com 150 a 180g/dia de ração com 20% de proteína bruta (PB), em sistema creep feeding até a desmama (7 meses). A partir dos 7 meses, os animais foram divididos em dois grupos com 17 animais em cada um, e receberam suplementação alimentar diferenciada: grupo 1 (Plano Nutricional PN1) alimentação a base de pasto, silagem e concentrado, com ganhos projetados de 400 g/d e grupo 2 (Plano Alimentar PN2) alimentação a base de pasto, silagem e suplemento energético proteico para promover ganhos de 800g/d. Mensalmente, os animais foram pesados e ganho de peso médio diário e final foi mensurado. A altura de cernelha (ACN) e profundidade de tórax (PFT) foram mensuradas antes e após o período de suplementação. Além disso, ao final da suplementação de cada grupo, a área de olho de lombo (AOL), a espessura de gordura subcutânea (EGS), a espessura de gordura subcutânea na garupa (EGSP8) foi mensurada por ultrassonografia. Após 2,5 meses de suplementação, aos 9,5 meses de idade, ambos os grupos passaram a ser submetidos a aspiração folicular (OPU) e os embriões produzidos *in vitro* (PIV) durante 3 meses. Nesse período foram realizadas um total de 10 aspirações foliculares, onde 6 delas foram utilizadas para produção de embriões *in vitro* para verificar o efeito alimentação sobre a competência ovocitária e a produção embrionária.

No presente estudo, uma novilha do grupo de animais PN2 teve de ser removida das análises por vir a óbito.

5.3.4. Suplementação Alimentar

5.3.4.1. Creep feeding

Esta atividade visou suplementar as bezerras Nelore a partir do quinto mês até o desmame (7 meses), por meio de fornecimento de 150 a 180g/dia de concentrado com 20% de PB, em sistema creep feeding. Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso diário até o desmame.

5.3.4.2. Planos nutricionais para desenvolvimento corporal

Bezerras pré-selecionadas do rebanho BRGN da Embrapa por meio de características genéticas foram submetidas a dois planos alimentares após o desmame com o objetivo de estimar o efeito da nutrição sobre a produção e competência de ovócitos e a taxa de produção de embriões por fecundação *in vitro*. Neste sentido, 33 fêmeas do rebanho BRGN da Embrapa foram desmamadas aos 7 meses de idade, e divididas em 2 grupos experimentais. Um grupo com 17 fêmeas foi alimentado com pasto de brachiaria, silagem de milho e concentrado, com ganhos projetados de 400 g/d (Plano Alimentar PN1) durante 165 dias. O outro grupo com 17 fêmeas foi submetido a um manejo alimentar diferencial (Plano Alimentar PN2) a base de pasto de brachiaria, silagem de milho e suplemento energético proteico para promover ganhos de 800 g/d. Assim, foram projetados ganhos de peso de 400 e 800 g/d para os animais dos grupos (PN1) e (PN2), respectivamente. Este manejo foi executado até os animais atingirem média de 12,5 meses de idade. Os animais foram pesados e medidos de acordo com os protocolos exigidos pelo Programa melhoramento Genético Nelore Brasil (ANCP). Foram registrados mensalmente os pesos, altura de cernelha e profundidade de tórax. Além disso, a área de olho de lombo e espessura de gordura foram mensuradas nos animais de ambos os tratamentos.

5.3.5 Mensurações de desempenho corporal

5.3.5.1. Altura de cernelha (ACN)

A altura de cernelha foi mensurada com tonômetro da ponta do cupim ao solo, e o valor obtido foi descrito em centímetros (cm).

5.3.5.2. Profundidade do tórax (PFT)

A profundidade do tórax foi mensurada com tonômetro da linha de dorso a linha do peito e o valor obtido foi descrito em centímetros (cm).

5.3.6. Avaliações de carcaça

5.3.6.1 Área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea nas costelas (EGS) e espessura de gordura subcutânea na garupa (EGSP8).

Utilizou-se a técnica da ultrassonografia para mensurações das características de carcaça em tempo real no animal *in vivo*, tais como: área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea nas costelas (EGS) e espessura de gordura subcutânea na garupa (EGSP8). As mensurações da AOL e da EGS foram realizadas entre a 12^a e 13^a costelas, transversalmente sobre o músculo *Longissimus dorsi* e a EGSP8 foi mensurada na garupa do animal na região entre o íleo e o ísquio, na intersecção dos músculos *Gluteus medius e Biceps femoris*. Para obter essas medidas utilizou-se um equipamento de ultrassonografia de marca ALOKA 500V, com sonda linear de 17,5cm e frequência de 3,5MHz, com acoplador de silicone, e utilizando óleo vegetal como acoplante acústico.

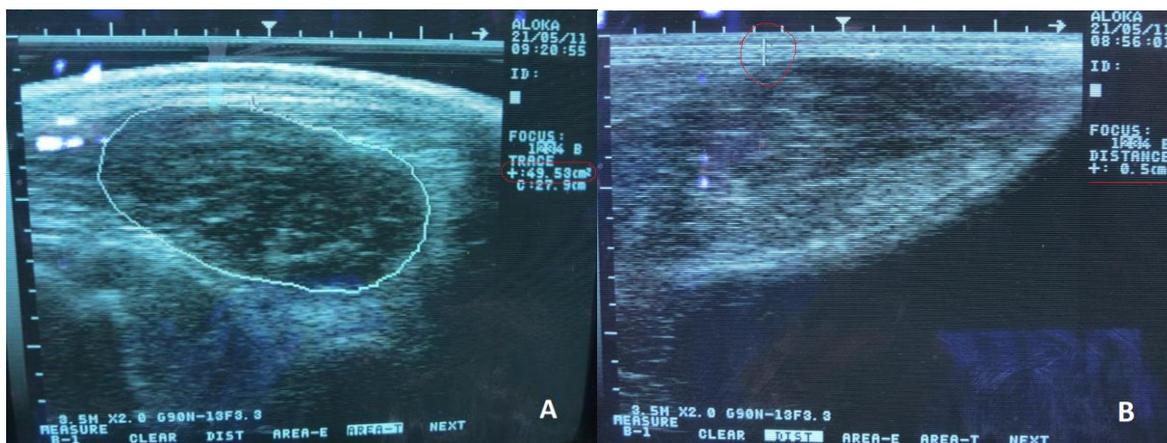


Figura 1: A) Área de olho de lombo (AOL) do plano nutricional 1 (PN1); B) Espessura de gordura subcutânea (EGS) do plano nutricional 2 (PN2).

5.3.7 Produção de embriões *in vitro*

5.3.7.1 Recuperação de ovócitos

Os animais foram mantidos em troncos de contenção para bovino. Para o procedimento de anestesia epidural baixa com Lidocaína 2% (3-5mL) (Anestésico L Pearson, Eurofarma, Brasil), foi feita a assepsia do local com álcool 70°. Após realizada a limpeza da região perineal com água e sabão neutro, seguida de assepsia com álcool 70°, a guia de aspiração foi posicionada no fórnix vaginal, lateralmente a cérvix, sendo direcionada para o mesmo lado do ovário a ser aspirado. Os ovócitos foram aspirados em PBS (Phosphate buffered saline) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (Sigma®) e 2µl/mL de Heparina Sódica (Heptar® i.v. Eurofarma, Brasil), a temperatura de 36°C. A pressão de aspiração utilizada foi de 10 a 15mL/min. Os ovócitos recuperados foram levados imediatamente ao laboratório para os processos de busca, seleção e maturação.

Para OPU foram utilizados aparelho de ultrassom modelo HS 1500 (Honda®, Japão), acoplado a uma probe setorial micro-convexa HCV-3710 MV (Honda®, Japão), multi-frequencial de 5, 7,5 e 10MHz, montada em uma guia transvaginal (WTA®, Brasil), uma bomba de vácuo digital BV-003d (WTA®, Brasil), acoplado a um sistema com uma agulha 18G (WTA®, Brasil).

5.3.7.2 Seleção e classificação dos ovócitos

Os ovócitos aspirados foram mantidos em tubos de 50 mL em banho Maria a 35°C até a lavagem do conteúdo aspirado. Em seguida o conteúdo do tubo foi vertido em um filtro de coleta de embriões com malha de 50µm e lavado com solução de PBS aquecido com auxílio de seringa de 20 ml e agulha 40x12. Após a lavagem, a solução com os ovócitos foi depositada em uma placa de 100x20 mm contendo meio de bancada (TCM 199 sais de Hank`s - Gibco BRL®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco BRL®), penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (50 µg/ml). Os Complexos *Cumulus Oophorus* (CCOs) foram procurados com auxílio de um estereomicroscópio SMZ 645 (Nikon®, Japão). Apenas os CCOs de qualidade I, II e III foram utilizados para MIV, classificados como preconizados por LEIBFRIED & FIRST (1979), de acordo com uma escala de I a IV, considerando as características do *cumulus* e do citoplasma do ovócito:

Qualidade 1 (G1): Ovócitos apresentando *cumulus* compacto e presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom. Qualidade 2 (G2): Ovócitos com *cumulus* compacto parcialmente presente em volta do ovócito ou rodeando completamente o mesmo, com menos de três camadas celulares. Ooplasma, com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preencha todo o espaço interior da zona pelúcida. Qualidade 3 (G3): Ovócitos com *cumulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida. Preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado. Qualidade 4 (G4): Oócitos desnudos sem células do *cumulus oophorus* ao seu redor.

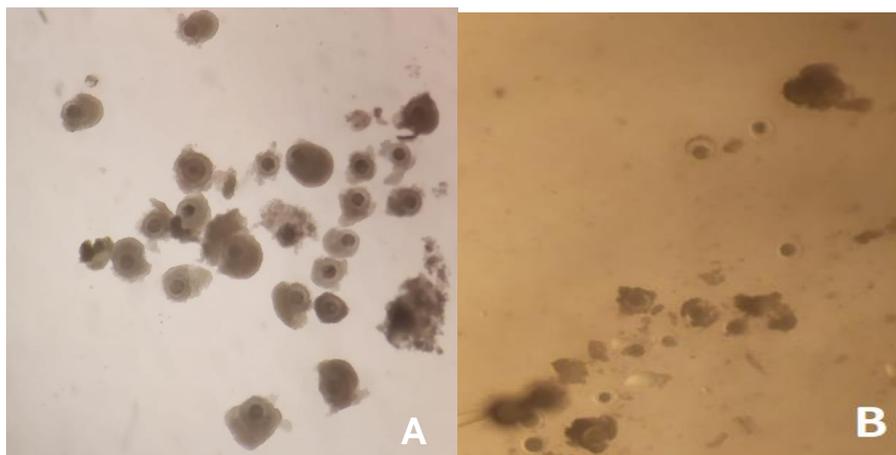


Figura 2: A) Ovócitos graus 1, 2 e 3 selecionados para maturação do plano nutricional 2 (PN2); B) Ovócitos graus 1, 2 e 3 selecionados para maturação, e grau 4 para descarte do plano nutricional 1 (PN1).

5.3.7.3 Maturação *in vitro* dos ovócitos (MIV)

Os CCOs selecionados foram lavados e transferidos para uma placa contendo gotas com volume de 200 μ L de meio de maturação coberto com óleo Mineral (Sigma®) e incubados por 22 horas a 39 °C à 5% de CO₂ em ar. O meio de maturação foi composto por TCM 199 sais de Earles (Gibco BRL ®) suplementado com 10 % de SFB (Gibco BRL®), 24 UI/mL de hormônio luteinizante (LH Sigma ®), 10 μ g/mL de hormônio folículo estimulante (FSH Sigma®), 1 μ g/mL L-glutamina (Sigma®), 100 UI/ml penicilina (Sigma®) e 50 μ g/mL estreptomicina (Sigma®).

5.3.7.4 Fecundação *in vitro* (FIV)

Para a FIV, os ovócitos foram separados em grupos de até 30 estruturas, lavados e transferidos para gotas de 150 μ L de meio de fecundação. O meio de fecundação utilizado foi o TALP, suplementado com 2 mM de penicilamina (Sigma®), 1 mM de hipotaurina (Sigma®), 250 mM de epinefrina (Sigma®) e 10 μ g/ml de heparina (Sigma®). Foram utilizados para fecundação apenas os ovócitos recuperados de grau 1, 2 e 3.

Para os experimentos foram utilizadas doses de sêmen do mesmo reprodutor da raça nelore e da mesma partida, avaliadas previamente, estando de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução. A seleção espermática foi realizada pelo método do gradiente mini percoll consistindo de 0,5 mL de percoll 45 e 0,5 mL de percoll 90 % (Parrish *et al.*, 1995). O sêmen descongelado em água à 36°C, durante 30 segundos, foi depositado

sobre o gradiente de percoll previamente preparado, e centrifugado à 700g por 20 minutos à 30° C. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado permanecendo apenas o *pellet*, que foi ressuspenso com 2 ml de TALP-sp e centrifugado à 700g por 5 minutos, sendo então ressuspenso com meio de fecundação. Após a avaliação da concentração espermática, 1×10^6 espermatozoides / ml foi adicionado à gota de fecundação de 150µL.

Os ovócitos e espermatozoides foram co-incubados por 22 horas em estufa a 38,5 °C com 5% de CO₂ em ar, sendo o dia da fecundação considerado D0. Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram retirados da gota de fecundação, lavados em meio de cultivo (SOFaaci) e distribuídos nas gotas de cultivo na quantidade de até 30 estruturas /gota.

5.3.7.5 Cultivo *in vitro* de embriões (CIV)

Para o cultivo *in vitro* foi utilizado o meio líquido sintético do oviduto (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de *sodium tri citrato* (Sigma®), 2,77 mM myo-inositol (Sigma ®) e 5 % de SFB (SOFaa) (Holm *et al.*, 1999). As placas de cultivo foram preparadas um dia antes da sua utilização, sendo que o tamanho da gota de cultivo foi de 150µl sob óleo.

Os embriões foram avaliados 44 horas após a inseminação para determinar a taxa de clivagem e em D7 (sete dias após a inseminação) para avaliação taxa de blastocisto.

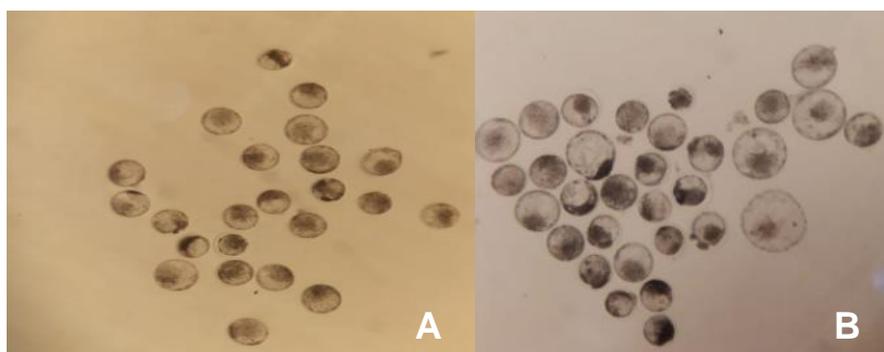


Figura 3. A) Embriões em D7 do plano nutricional 1(PN1); B) Embriões em D7 do plano nutricional 2 (PN2).

5.3.8 Análise Lipídica

Os embriões foram fixados por uma hora em paraformaldeído 4%, lavados três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e armazenados, por até uma semana, a 4°C em paraformaldeído 1%. Após esse período de fixação, os embriões foram lavados duas

vezes em PBS suplementado com 0,3% de polivinilpirrolidona (PVP), incubados por 30 minutos em PBS suplementado com 0,2% de Triton. Posteriormente, os embriões foram lavados três vezes em PBS com 0,3% de PVP e, em seguida, corados com Bodipy 493/503 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA; 20 µg / mL, diluído em 50 µl de etanol absoluto e 950 µl de PBS) por uma hora. Posteriormente, foram lavados três vezes em PBS com PVP (0,3%), colocados individualmente em placas de 35 mm em gotas de 8µL em solução anti-fade (SlowFade™; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e avaliados em microscópio confocal. Todas as imagens foram submetidas as mesmas condições microscópicas de dissecação a laser (LSM Leica Sp8; New Orleans, LA, EUA). Todas as amostras foram analisadas e foto documentadas pela objetiva 20x sob o Laser Argon 488, para visualização das gotas lipídicas, em um espectro de fluorescência entre 495 a 505 nanômetros. Os embriões foram submetidos, um a um, a 30 cortes transversais, com intervalo de 2,96 µm. As 30 seções das quais os embriões foram observados uma a uma e a presença das gotas lipídicas fluorescentes foram identificadas. A imagem foi criada com todas as seções sobrepostas. Após a criação da imagem final de cada embrião, elas foram ajustadas em escala de cinza pelo programa ImageJ e o fundo foi corrigido. A quantificação dos lipídios foi baseada na razão entre a área ocupada no citoplasma e a área total do embrião.

Os tratamentos foram comparados com um grupo controle (Controle FIV) com ovócitos provenientes de ovários de vacas adultas de abatedouros locais.

Os embriões produzidos foram congelados e armazenados para futura avaliação de qualidade embrionária por expressão de genes.

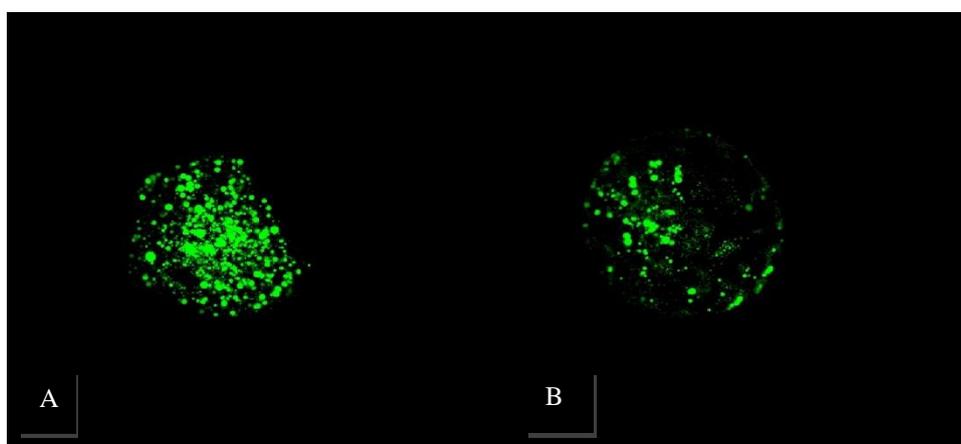


Figura 4. Imagem representativa da microscopia confocal (LSM Leica sp8; laser argon 488-nm, objetiva x20) dos embriões corados com Bodipy 493/503. A: Análise lipídica do plano nutricional 2; B: Análise lipídica do plano nutricional 1.

5.3.9 Análise Estatística

Para a comparação dos tratamentos foi aplicado o teste t student, com exceção das taxas de clivagem e de blastocistos que foram avaliadas com o teste de Bonferroni. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de probabilidade de 5%. Todas as análises foram realizadas pelo software estatístico R, versão 3.5.1.

6. Resultados

Os dados sobre os pesos e os ganhos médios de pesos diários dos animais dos tratamentos PN1 e PN2 estão descritos nas figuras 5 e 6, respectivamente.

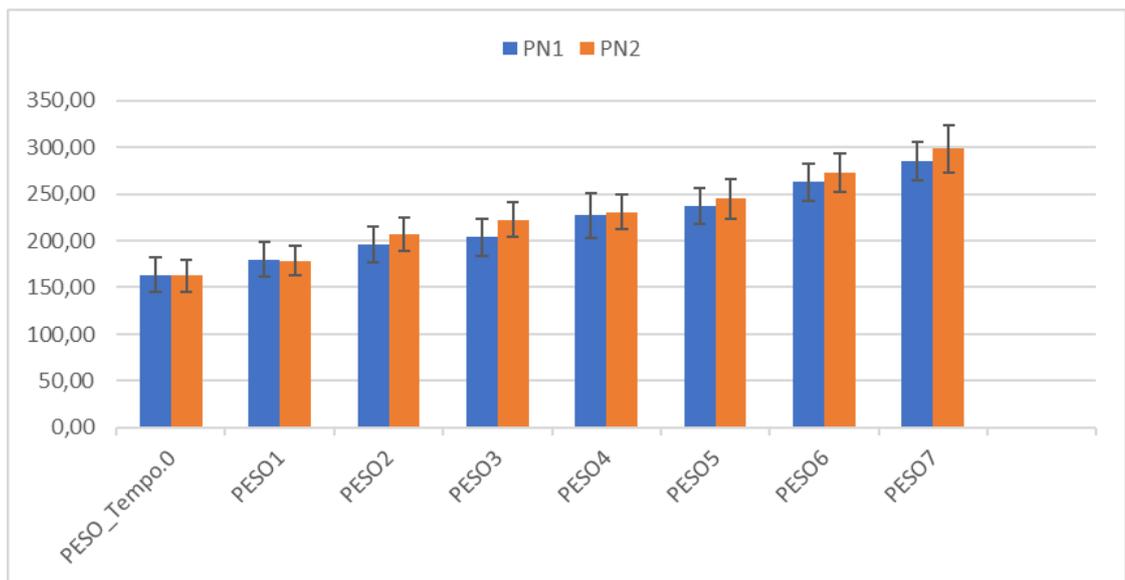


Figura 5: Peso médio do grupo de animais dos tratamentos do plano nutricional 1 (PN1) e do plano nutricional 2 (PN2) durante as pesagens mensais.

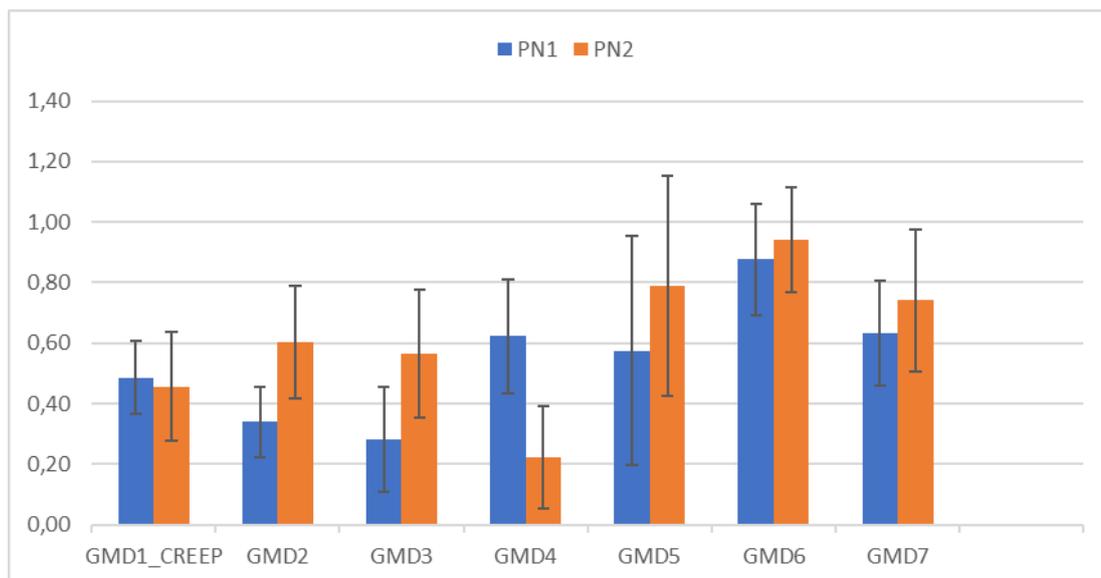


Figura 6: Ganho médio de peso diário do grupo de animais dos tratamentos do plano nutricional 1 (PN1) e do plano nutricional 2 (PN2) durante as pesagens mensais.

Com relação aos dados obtidos sobre os pesos dos animais, houve diferença de peso cumulativo entre os tratamentos PN1 e PN2, sendo que o grupo de animais do PN2 apresentaram aproximadamente 15 kg a mais que os animais do tratamento do PN1 (Tabela 2).

Tabela 2. Ganho de peso médio mensal e diferença entre pesos iniciais e finais dos tratamentos de suplementação alimentar PN1 e PN2 em novilhas Nelore pré-púberes.

Pesos	PN 1	PN 2	Valor de P
Peso 0	163,12 ± 18,42	162,31 ± 16,96	0,4484
Peso 1	180,12 ± 18,02	178,31 ± 16,0	0,3813
Peso 2	196,06 ± 19,21	206,69 ± 18,23	0,0567
Peso 3	203,94 ± 20,03 ^b	222,53 ± 18,57 ^a	0,0048
Peso 4	227,00 ± 23,60	230,75 ± 18,35	0,3066
Peso 5	237,35 ± 19,13	244,94 ± 21,19	0,1450
Peso 6	262,76 ± 19,91	272,25 ± 20,51	0,0941
Peso 7	284,88 ± 20,19	298,19 ± 25,15	0,0534
*Dif Pi-Pf	120,71 ± 13,81 ^b	135,88 ± 18,55 ^a	0,0133

^{a,b} Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

*Dif Pi-Pf: Diferença entre o peso médio inicial (Peso 0) e peso médio final (P 7) entre os tratamentos PN1 e PN2.

Na análise mensal do ganho de peso, somente houve diferença estatística na pesagem número 3 (Peso 3) onde PN2 obteve pesagem com 18,59kg a mais que os animais do PN1 (P=0,0048). Porém, ao final das pesagens, na diferença entre o peso médio inicial e peso médio final (Dif Pi-Pf), observou-se diferença estatística significativa entre PN1 e PN2, com PN2 se mostrando com maior ganho médio de peso ao final (Tabela 2).

As análises realizadas por meio de ultrassonografia de carcaça e método métrico com utilização de tonômetro para avaliação do desenvolvimento corporal mostraram resultados distintos entre os grupos, embora nem todos significativos (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros (média \pm desvio padrão) de desempenho de desenvolvimento corporal entre as novilhas Nelore pré-púbere submetidas a dois planos nutricionais.

Parâmetros	PN 1	PN 2	Valor de P
AOL (mm ²)	50,16 \pm 2,13	48,78 \pm 2,25	0,075
EGS (mm)	3,11 \pm 0,48 ^b	3,70 \pm 0,59 ^a	0,013
EGS P8 (mm)	4,12 \pm 0,99 ^b	5,23 \pm 0,56 ^a	0,001
ACN (cm)	133,23 \pm 2,69	137,0 \pm 9,44	0,197
PFT (cm)	55,23 \pm 3,38 ^b	58,31 \pm 2,38 ^a	0,009

^{a,b} Diferentes letras sobscritas na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05). AOL: área de olho de lombo; EGS: espessura subcutânea; EGS P8: espessura subcutânea na P8; ACN: altura de cernelha; PFT: profundidade de tórax.

Os valores de AOL e ACN não apresentaram diferenças estatísticas significativas. O EGS do PN2 apresentou medida de 3,70 \pm 0,59 mm, superior ao PN1 que apresentou 3,11 \pm 0,48mm, de forma estatisticamente significativa (P=0,013). Da mesma forma, o EGSP8 do PN2 apresentou mensuração superior ao PN1 com 1,11mm a mais, apresentando diferença estatística significativa (P=0,001). Por fim, a PFT dos animais do PN2 apresentou diferença estatística significativa em relação ao PN1 (P=0,009), com mensurações de 58,31 \pm 2,38cm e 55,23 \pm 3,38 cm, respectivamente (Tabela 3).

Os dados de número de folículos ovarianos e ovócitos graus 1, 2 e 3 não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Os animais do tratamento PN2 apresentaram número de ovócitos recuperados de $129,17 \pm 35,18$ sendo superior ao PN1 que apresentou $87,33 \pm 25,73$, ($P=0,043$). Quanto aos ovócitos grau 4 (G4), o PN2 apresentou mais ovócitos qualidade 4 que o PN1 ($31,00 \pm 8,60$ e $16,33 \pm 6,44$, respectivamente; $P=0,008$) (Tabela 4). Já o número de ovócitos viáveis por fêmea foi superior para o tratamento PN2 ($P=0,025$; Tabela 5).

Tabela 4. Quantidade (média \pm desvio padrão) de folículos ovarianos, ovócitos recuperados e qualidade de ovócitos por sessão de OPU em novilhas Nelore pré-púberes submetidas a dois planos nutricionais.

Variáveis	PN1	PN2	Valor de P
Nº de folículos ovarianos	$150,43 \pm 19,60$	$170,57 \pm 22,86$	0,516
Nº ovócitos recuperados	$87,33 \pm 25,73^b$	$129,17 \pm 35,18^a$	0,043
Ovócitos G1	$16,50 \pm 10,75$	$19,17 \pm 7,22$	0,627
Ovócitos G2	$11,83 \pm 6,05$	$16,17 \pm 4,88$	0,205
Ovócitos G3	$42,67 \pm 16,16$	$62,83 \pm 23,58$	0,12
Ovócitos G4	$16,33 \pm 6,44^b$	$31,00 \pm 8,60^a$	0,008

^{a,b}Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$).
G1: grau 1; G2: grau 2; G3: grau 3; G4: grau 4.

O número de ovócitos viáveis por animal do PN2 foi superior ao PN1, com valores de $12,75 \pm 2,63$ e $9,66 \pm 1,57$, respectivamente. O número de embriões por animal, taxa de clivagem e taxa de blastocistos em D7 não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$; Tabela 5). No entanto, a taxa de embriões do tratamento PN2 foi semelhante ao controle laboratorial com ovócitos de ovários de vacas adultas de abatedouro ($P = 0,02$; Tabela 5).

Tabela 5. Número (média \pm desvio padrão) de ovócitos e embriões por animal e taxas de clivagem e embriões de novilhas Nelores pré-púberes submetidas a dois planos nutricionais.

	PN1	PN2	Controle FIV	Valor de P
Nº ovócitos viáveis por animal	9,66 \pm 1,57 ^b	12,75 \pm 2,63 ^a	---	0,025
Nº de embriões por animal	3,29 \pm 1,14	4,71 \pm 1,76	---	0,169
Taxa de Clivagem (%)	77,7	75,0	83,2	0,162
Taxa de Blastocistos D7 (%)	21,4 ^b	25,1 ^{a,b}	35,6 ^a	0,02

^{a,b} Diferentes letras sobscritas na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

Em relação a análise de acúmulo de lipídeos nos embriões produzidos *in vitro*, não foi observada diferenças entre os tratamentos com maior suplementação de concentrado (PN2) e menor suplementação de concentrado (PN1) (P= 0,066; Tabela 6).

Tabela 6. Percentagem da área da área ocupada pelos lipídeos em razão da área total dos ovócitos maturados em diferentes sistemas.

Tratamentos	% Área Gota Lipídica	Desvio Padrão (%)
PN1	13,80	6,47
PN2	18,05	7,90

7. DISCUSSÃO

Atualmente, por meio das avaliações genômicas, é possível obter informações de PTAs (*Predicted Transmitting Ability*) e avaliações genéticas de grande importância para seleção e multiplicação precoce de fêmeas pré-púberes que possuam características desejáveis. Desta forma, neste estudo fêmeas Nelores pré-púberes receberam aporte nutricional com concentrado um mês antes da desmama e também na pós-desmama até os 12,5 meses de idade. Folículos ovarianos foram aspirados a cada 15 dias a partir dos 9,5 meses de idade para determinar o efeito da nutrição na reprodução destes animais. O tratamento utilizado com maior aporte nutricional promoveu um maior desempenho no peso final e profundidade de tórax, além de um maior acúmulo de gordura subcutânea nos animais deste grupo. Além disso, esse tratamento (PN2) promoveu um aumento no número de ovócitos totais recuperados, ovócitos viáveis por animal e taxa de blastocisto em D7 igual ao de vacas adultas controle, diferentemente dos animais do tratamento PN1.

Em relação ao ganho de peso, o grupo de animais do tratamento PN2 obteve maior ganho acumulado no final da suplementação, apresentando média de 15 kg a mais que os animais do PN1. O peso final para o tratamento do PN2 está dentro do peso recomendado para procedimento de inseminação artificial (IA) em fêmeas precoces. Segundo Mousquer et al. (2014), a ciclicidade reprodutiva da fêmea bovina é consequência de uma série de eventos hormonais e está mais relacionada ao peso corporal do que a idade. Esta observação foi confirmada por Gregianini et al. (2021), que trabalhando com novilhas Nelore com média de 12 meses de idade, verificaram que a média de peso das novilhas que ficaram gestantes foi de $287,27 \pm 30,28$ kg e as fêmeas que permaneceram vazias pesaram $274,84 \pm 29,14$ kg com isso demonstrando a influência do peso na eficiência reprodutiva.

Este plano nutricional também proporcionou maior desenvolvimento de profundidade de tórax nos animais integrantes do PN2, porém não apresentou diferença estatística quanto a característica de altura de cernelha. Andrighetto et al. (2011) obtiveram correlação positiva e significativa entre estrutura corporal e precocidade, confirmando que animais com maior profundidade de costelas e maior perímetro torácico indicam um animal com maior precocidade. Além disso, segundo Koury Filho et al. (2006), por meio da avaliação dos escores visuais, a precocidade é considerada pela relação entre a profundidade de costelas com altura dos membros, e corresponde aos animais que depositam gordura mais precocemente.

Nesse sentido, a suplementação do PN2 também proporcionou um acúmulo de gordura subcutânea geral (EGS) e também acúmulo de gordura subcutânea na garupa (ESGP8) superior aos animais do PN1. O presente trabalho não demonstrou relação entre AOL e EGS/EGSP8, visto que os animais do PN2 tiveram menor AOL, porém com maiores valores para EGS e EGSP8, enquanto o PN1 teve maior AOL e com menores valores para EGS e EGSP8. Da mesma forma, Bonin et al. (2015) também não encontraram correlação entre as características de AOL comparadas com EGS e EGSP8, demonstrando que esta primeira mensuração não tem valor preditivo na seleção de animais melhoradores, mostrando a importância da mensuração de todas as características, e destacando que há uma estrita relação entre a EGS/EGSP8 com a precocidade de fêmeas jovens. Lima (2017) analisando e correlacionando avaliações ultrassonográficas de carcaça de EGS e precocidade sexual de nelore, encontrou correlação positiva entre EGS e precocidade sexual, sendo o grupo que obteve maior EGS foi também o grupo mais precoce sexualmente.

A dinâmica folicular não foi alterada entre os tratamentos de suplementação alimentar, sendo que o número de folículos ovarianos foi semelhante para os dois tratamentos. As fêmeas do tratamento PN2 apresentaram média de $27,51 \pm 6,17$ folículos/animal, superior aos achados citados por Baruselli et al. (2016), que encontram $19,7 \pm 2,1$ folículos para fêmeas Nelore de 8 a 12 meses. Os números de folículos das fêmeas do tratamento PN2 foram semelhantes aos encontrados por Silva (2020), que demonstraram que fêmeas de 12 meses apresentam cerca de $30 \pm 2,0$ folículos ovarianos. Os dados obtidos no trabalho atual demonstram que os planos nutricionais não interferem no desenvolvimento folicular, apresentando um ligeiro aumento no número de folículos para animais mais jovens. Contrariamente, Martins et al. (2007) observaram que vacas recebendo dietas de alta e baixa ingestão de energia, apresentaram maior número de folículos aspirados para o grupo de alta ingestão, porém com redução na porcentagem de ovócitos de qualidade superior, que também foi observado no presente estudo. As fêmeas do tratamento PN2 apresentaram um maior número de ovócitos não fecundáveis (Grau 4), que pode ser atribuído a um efeito negativo provocado pela maior ingestão de proteína e energia. Esta hipótese pode estar ligada ao excesso de ingestão de proteína degradável no rúmen (IPDR) que pode levar ao aumento da concentração sanguínea de uréia, onde essa alta concentração pode provocar alterações fisiológicas reprodutivas, inclusive diminuição nas taxas de concepção (Ferguson et al., 1989; Ferguson et al., 1986). Esta observação contraria os achados de Freret et al. (2006) que demonstraram que em 2 grupos de novilhas suplementadas, não houve diferença de quantidade e qualidade de folículos entre os animais dos grupos com menor e maior ganho de

peso. Já Adamiak et al. (2005) e Mollo et al. (2007) mostraram, inclusive, efeito negativo sobre o número de folículos recrutados em grupos de vacas e novilhas, com alta ingestão de energia.

Na avaliação da produção de embriões, não houve diferença entre o número de embriões produzidos por animal e nas taxas de clivagem entre os animais dos tratamentos PN1 e PN2. Resultados semelhantes foram obtidos por Martins et al. (2007), onde em vacas aneloradas não foram observadas diferenças entre as taxas de clivagem e de blastocistos com dietas de baixa e alta ingestão.

Vários laboratórios de pesquisa têm sucesso produzindo embriões viáveis de novilhas pré-púberes (Fry et al., 1998; Taneja et al., 2000). No entanto, existem algumas evidências de que os ovócitos de fêmeas jovens têm uma baixa capacidade de desenvolvimento em comparação aqueles provenientes fêmeas adultas (Presicce et al., 1997; Majerus et al., 1999). No atual estudo, a taxa de blastocistos em D7 foi semelhante entre os tratamentos PN1 e PN2, porém os animais do tratamento PN2 apresentaram estatisticamente a mesma taxa de blastocistos que o grupo controle, que utilizou ovócitos de ovários de vacas adultas de frigoríficos. Diferentemente, as fêmeas do tratamento PN1 apresentaram menor produção de embriões em D7 que o grupo controle. Este fato evidencia um efeito positivo nos animais que receberam maior aporte nutricional.

No presente estudo se verificou $4,71 \pm 1,76$ embriões/animal no grupo de novilhas que receberam maior aporte nutricional. Esse resultado foi superior aos resultados obtidos por Silva (2020), que demonstrou produção de embriões de $3,3 \pm 0,6$ por fêmea Nelore de 12 meses sem tratamento com FSH e de $3,5 \pm 0,6$ para fêmeas tratadas com FSH. Além disso, os animais dos dois tratamentos nutricionais (PN1 e PN2) apresentaram taxas superiores de produção de embriões quando comparados com os achados citados por Baruselli et al. (2016), onde fêmeas de 8 a 12 meses produziram $1,5 \pm 0,3$ embriões por animal.

Em relação a taxa de blastocistos, as fêmeas do tratamento PN2 produziram taxa de blastocistos de 25,1%, sendo superior aos dados encontrados por Silva (2020) que obteve 19,2% de blastocistos para as fêmeas não tratadas com FSH e de 22,8% para as novilhas nelore de 12 meses de idade superestimuladas com FSH. A taxa de blastocisto desse estudo também foi superior ao estudo citado por Baruseli et al. (2016), que encontram 20,2% de produção de embriões para fêmeas entre 8 a 12 meses de idade. Mesmo o grupo de fêmeas do PN1 que foram tratadas com menor quantidade ração apresentou taxa de blastocisto de 21,4%, superior às fêmeas não tratadas com FSH e similar as tratadas com FSH do trabalho de Silva (2020). Estes resultados demonstram que o tratamento nutricional foi benéfico para

fêmeas pré-púberes, estimulando a fisiologia reprodutiva nesses animais. Segundo Ashworth et al. (2009) a correta alimentação fornece a oportunidade de aumentar a capacidade reprodutiva através da melhoria da qualidade do gameta e da competência embrionária. Ainda Ashworth et al. (2009) levanta a hipótese de que a nutrição induz alterações hormonais e metabólicas que interferem diretamente na produção e qualidade de ovócitos e embriões. Neste estudo, acredita-se que o maior peso e disposição de gordura dos animais do tratamento PN2 influenciaram no aumento da quantidade de ovócitos viáveis, apresentando o mesmo potencial de desenvolvimento embrionário que os ovócitos provenientes de vacas adultas de abatedouro.

Pelo fato dos animais do tratamento nutricional PN2 terem recebido um aporte maior de energia e proteína, foi hipotetizado que pudesse haver um maior acúmulo de lipídeos nos embriões produzidos *in vitro*, comprometendo a qualidade dos mesmos. No entanto, foi observado que não houve um acúmulo de lipídeos significativo entre tratamentos.

8. CONCLUSÃO

Foi possível observar que os planos nutricionais foram benéficos para o desenvolvimento corporal dos animais, porém os animais que receberam um maior aporte de concentrado apresentaram maior peso final e maior deposição de gordura subcutânea. Além disso, a produção de embriões *in vitro* para este grupo de animais foi igual aos de vacas adultas de abatedouros e superiores aos dados de literatura para animais de idades semelhantes, mostrando efeito positivo da nutrição para a fisiologia e parâmetros de crescimento e eficiência reprodutiva de fêmeas Nelore pré-púberes.

9. REFERÊNCIAS

- ABREU, M. S.; SILVA, L. S.; GOTTSCHALL, C. S. Resposta reprodutiva e custo por prenhez em função do escore de condição corporal de novilhas ao acasalamento. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 1, n. 16, 2018.
- ADAMIAK, S. J.; MACKIE, K.; WATT, R. G.; WEBB, R.; & SINCLAIR, K. D. (2005). Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology of reproduction**, v.73(5), n.5, p.918-926, 2005.
- ANDRIGHETTO, C.; SOARES FILHO, C. V.; FONSECA, R. D.; CAMINHAS, M. M. T.; & PERRI, S. H. V. (2011). Correlações entre escores visuais e características produtivas em prova de ganho de peso de bovinos da raça Nelore Mocha. **Veterinária e Zootecnia**, p.602-609, 2011.
- ASHWORTH C. J.; TOMA L. M.; HUNTER M. G. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. **Phil Trans R Soc B**, v.364, n.1534, p.3351-3361, 2009
- BALDASSARRE, H.; CURRIN, L.; MICHALOVIC, L.; BELLEFLEUR, A. M.; GUTIERREZ, K.; MONDADORI, R. G.; GLANZNER, W. G.; SCHUERMAN, Y.; BOHRER, R. C.; DICKS, N.; LOPEZ, R.; GRAND, F. X.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; GOURDON, J.; & BORDIGNON, V. (2018). Interval of gonadotropin administration for in vitro embryo production from oocytes collected from Holstein calves between 2 and 6 months of age by repeated laparoscopy. **Theriogenology**, v.116, p.64-70, 2018.
- BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; GUERREIRO, B. G.; BAYEUX, B. M.; SALES, J. N. S.; SOUZA A. H.; GIMENES, L. U. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. **Anim. Reprod.**, v.13, n.3, p.264-272, 2016.
- BATISTA, E. O. S.; GUERREIRO, B. M.; FREITAS, B. G.; SILVA, J. C. B.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; REZENDE, R. G.; BASSO, A. C.; LOPES, R. N. V. R.; RENNO, F. P.; SOUZA, A. H.; & BARUSELLI, P. S. (2016). Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. **Domestic animal endocrinology**, v.54, p.1-9, 2016.
- BONIN, M. N.; FERRAZ, J. B. S.; PEDROSA, V. B.; et al. (2015). Visual body-scores selection and its influence on body size and ultrasound carcass traits in Nelore cattle. **Journal of Animal Science** v.93, n.12, p.5597–5606.
- DIAS, J. C.; MARTINS, J. A. M.; EMERICK, L. L.; SOUZA, F. A.; & ANDRADE, V. J. (2009). Efeitos da suplementação lipídica no aumento da eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33(2), n.2, p.95–104, 2009.
- ELLIFF, F. M.; GUIMARÃES, E. C.; FÉRES, L. F.; BAYEUX, B. M.; COLLI, M. H. A.; & BARUSELLI, P. S. (2019). Effect of treatment with follicle-stimulating hormone on in vitro embryo production of Gyr (*Bos indicus*) calves, pubertal heifers and adult cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v.31(1), p.191-191, 2019.

FRY R. C.; SIMPSON T. L.; SQUIRES T. J. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. **Theriogenology**, v.49, n.6, p.1077-1082, 1998.

FERGUSON, J.D.; CHALUPA, W. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, vol. 72, n.3, p. 747-66, 1989.

FERGUSON, J.D.; BLANCHARD, T.L.; HOSHALL,; CHALUPA, W. High rumen degradable protein as a possible cause of infertility in a dairy herd. *J. Dairy Sci.*, vol. 69(suppl.1), p. 120, 1986.

FRERET, S.; GRIMARD, B.; PONTER, A. A.; JOLY, C.; PONSART, C.; & HUMBLLOT, P. (2006). Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers. **Reproduction**, v.131, n.4, p.783-794, 2006.

GREGIANINI, H. A. G.; JUNIOR, J. M. C.; NETO, A. P.; DA COSTA FILHO, L. C. C.; GREGIANINI, J. T. F.; PINHEIRO, A. K.; & TRENKEL, C. K. G. (2021). Precocidade sexual de novilhas Nelore em rebanho sob seleção no Estado do Acre. **Research, Society and Development**, v.10, n.4, p.e16310413945-e16310413945.

GUERREIRO B.M. Produção in vitro de embriões de doadoras pré-púberes da raça Holandesa. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

KOURY FILHO, W.; ALBUQUERQUE, L.G.; ALENCAR, M.M. de; FORNI, S.; CHIQUITELLI NETO, M. Genetic parameter estimates of visual score traits and their relationship with growing traits in Brazilian Nelore cattle. **In: Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 13-18 August, 2006.** Instituto Prociência, p.03-50, 2006.

LANDRY, D. A.; BELLEFLEUR, A.; LABRECQUE, R.; GRAND, F.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. **Theriogenology**, v.86, p.1240-1246, 2016.

LIMA, A. V. O. Desempenho produtivo e características de carcaça de novilhos Nelore de diferentes progênies terminados em confinamento. 2017.

MADELLA-OLIVEIRA, A. D. F.; QUIRINO, C. R.; & PACHECO, A. (2014). Main hormones that control the reproductive and social behavior of female ruminants-review. *PUBVET*, v.8, n.3, 2014.

MAGGIONI, D.; ROTTA, P. P.; ITO, R. H.; MARQUES, J. A.; ZAWADZKI, F.; PRADO, R. M.; PRADO, IN. N. Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma revisão. **PUBVET**, v. 2, n. 11, 2008.

MAJERUS, V.; DE ROOVER, R.; ETIENNE, D.; KAIDI, S.; MASSIP, A.; DESSY, F.; & DONNAY, I. (1999). Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. **Theriogenology**, v.52, n.7, p.1169-1179, 1999.

- MARTINS, A.; MOLLO, M.; BASTOS, M.; GUARDIEIRO, M.; & SARTORI, R. (2007). Concentrações séricas de hormônios reprodutivos e metabólicos em vacas azebuadas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar. **In *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Resumo em anais de congresso (ALICE)***. Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 35, supl. 3, p. S1026, 2007.
- MOLLO, M.; RUMPF, R.; MARTINS, A.; CARRIJO, L.; SAUERESSIGN, M.; & SARTORI, R. (2007). Produção de embriões em novilhas Nelore superovuladas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar. **In *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Resumo em anais de congresso (ALICE)***. Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 35, supl. 3, p. S1241, 2007.
- MONTEIRO, F. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; BAYEUX, B. M.; ACCORSI, M.; CAMPANHOLI, S. P.; DIAS, E. A. R.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. **Theriogenology**, v.90, p.54-58, 2017.
- MOUSQUER, C. J.; FERNANDES, F. F. D.; FERNANDES, G. A.; & CASTRO, W. J. R. (2014). Desempenho reprodutivo de matrizes Nelore. **PUBVET.**, v.8, n.3, p.15. <https://www.pubvet.com.br>.
- PEREIRA, E. S.; PIMENTEL, P. G.; QUEIROZ, A. C.; & MIZUBUTI, I. Y. (2010). Novilhas leiteiras (Vol. 1, p. 632). Graphiti Gráfica e Editora Ltda, Fortaleza, Brasil.
- PRESICCE, G. A.; JIANG, S.; SIMKIN, M.; ZHANG, L.; LOONEY, C. R.; GODKE, R. A.; YANG X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. **Biol Reprod**, v.56, n.2, p.386-392, 1997.
- SILVA, L. G. D. (2020). Produção in vitro de embriões de novilhas Nelore (Bos indicus) de 12 e 24 meses de idade tratadas ou não com FSH (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- TANEJA, M.; BOLS, P.E.; VAN DE VELDE, A.; JU, J.C.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M. W.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; YANG, X. 2000. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biol Reprod**, v.62, n.1, p.206-213, 2000.
- VALENTIM, J. K.; MENDES, J. P.; PRZYBULINSKI, B. B.; SERPA, F. C.; BARBOSA, D. K.; CASTILHO, V. A. R.; PIETRAMALE, R. T. R. Fatores nutricionais aplicados à reprodução de ruminantes. **UNICIÊNCIAS**, v. 23, n. 2, p. 77-82, 2019.
- WATANABE, Y. F.; SOUZA, A. H.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; BATISTA E. O S.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F. V.; NOGUEIRA, M.F.G.; FERRAZ J. B. S.; BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. **Anim Reprod**, v.14, p.635-644, 2017.