

Planaltina, DF / Novembro, 2024

Efeito da suplementação alimentar com maior densidade energética por curto período e uso de melatonina na produção de embriões in vitro de novilhas Nelore pré-púberes

Eduardo da Costa Eifert⁽¹⁾, Ludmilla Costa Brunet⁽²⁾, Roberto Guimarães Junior⁽¹⁾, Carlos Frederico Martins⁽¹⁾, Cláudio Ulhôa Magnabosco⁽¹⁾, Adriano Queiroz de Mesquita⁽³⁾, Rodrigo Vidal Oliveira⁽⁴⁾, Otávio Augusto Costa de Faria⁽⁵⁾ e Margot Alves Nunes Dode⁽⁶⁾

⁽¹⁾Pesquisadores, Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. ⁽²⁾Pesquisadora, Avaltech, Santo Antônio de Goiás, GO.

⁽³⁾Analista, Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. ⁽⁴⁾Professor, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

⁽⁵⁾Estudante de doutorado, Universidade de Brasília, Brasília, DF. ⁽⁶⁾ Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Embrapa Cerrados
BR 020, Km 18, Rod. Brasília-
-Fortaleza
Caixa Postal 08223
73310-970 Planaltina, DF
www.embrapa.br/cerrados
www.embrapa.br/fale-conosco/
sac

Comitê Local de Publicações
Presidente
Eduardo Alano Vieira
Secretária-executiva
Lidiamar Barbosa de Albuquerque
Membros
Alessandra de Jesus Boari
Alessandra Silva G. Faleiro
Angelo Aparecido Barbosa Sussel
Fábio Gelape Faleiro
Fabiola de Azevedo Araújo
Giuliano Marchi
Jussara Flores de Oliveira Arbues
Karina Pulrolnik
Maria Emília Borges Alves
Natália Bortoleto Athayde Maciel

Edição executiva e
revisão de texto
Jussara Flores O. Arbues
Normalização bibliográfica
Marilaine Shaun Pelufe
(CRB-1/2023)
Projeto gráfico
Leandro Sousa Fazio
Diagramação
Wellington Cavalcanti
Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

Resumo – O objetivo deste estudo foi avaliar a metodologia de suplementação alimentar com dieta de maior densidade energética sobre o desenvolvimento corporal e quantidade e qualidade de ovócitos e embriões. Além disso, verificar o impacto do uso da melatonina na maturação e cultivo embrionário de novilhas *Bos indicus* da raça Nelore pré-púberes suplementadas com PN2 sobre a produção de embriões in vitro. No primeiro experimento, 34 bezerras selecionadas geneticamente foram divididas em dois grupos e alimentadas com dois planos nutricionais (controle – PN1 e tratamento – PN2), em que o PN2 recebeu dietas com 18 e 6,8% mais energia metabolizável (megacaloria por quilograma de massa seca) que o PN1 na estação seca e das águas, respectivamente. O ganho de peso, deposição de gordura, produção e qualidade ovócitos e embriões foram comparados entre os dois tratamentos. No segundo experimento, 11 bezerras Nelore sem triagem genética foram suplementadas com a dieta PN2 e seus ovócitos e embriões foram cultivados com melatonina 10⁻⁹ M e a taxa de clivagem e blastocistos foram comparadas com vacas (controle). O número de ovócitos recuperados e ovócitos viáveis por *ovum pick up* (OPU) foi respectivamente 49 e 42% maior em novilhas mantidas no PN2 (p = 0,018 e p = 0,049), e como consequência, produziram 43% mais embriões que o tratamento PN1. As fêmeas do PN2 apresentaram maior deposição de gordura subcutânea e peso corporal, influenciando positivamente na reprodução. Foi observada similar quantidade de ovócitos viáveis em comparação a vacas adultas e 13% mais embriões quando os ovócitos e embriões foram cultivados com melatonina. Esses resultados indicam um efeito positivo da dieta mais energética sobre o desenvolvimento corporal e produção de embriões in vitro em novilhas pré-púberes, com um aumento na taxa de blastocistos quando a melatonina é usada no cultivo embrionário.

Termos para indexação: antioxidante, biotecnologia reprodutiva, fecundação in vitro, nutrição, zebu.

Effect of feed supplementation with higher energy density for a short period and use of melatonin on the production of in vitro embryos of pre-pubertal Nellore heifers

Abstract – The aim was to evaluate the methodology of feed supplementation of prepubertal Nellore heifers with a higher energy density diet (PN2) on body development and quantity and quality of oocytes and embryos. Furthermore, was verified the impact of melatonin use in the oocyte maturation and embryo culture on the in vitro embryo production of supplemented heifers with PN2. In the first experiment, 34 genetically selected heifers were divided into two groups and fed with two nutritional plans (control – PN1 and treatment – PN2), where PN2 received diets with 18 and 6.8% more metabolizable energy (Mcal/kg DM) than the PN1 in the dry and rainy seasons, respectively. Weight gain, fat deposition, oocyte and embryo production and quality were compared between the two treatments. In the second experiment, 11 Nellore heifers without genetic screening were supplemented with the PN2 diet and their oocytes and embryos were cultured with 10^{-9} M melatonin and the cleavage and blastocyst rates were compared with cows (control). The number of oocytes recovered and viable oocytes per *ovum pick up* (OPU) was respectively 49% and 42% higher in heifers maintained in PN2 ($p = 0.018$ and $p = 0.049$), and as a consequence, they produced 43% more embryos than the PN1 treatment. Females in the PN2 treatment showed greater subcutaneous fat deposition and body weight, positively influencing reproduction. A similar amount of viable oocytes was observed compared to adult cows and 13% more embryos when the oocytes and embryos were cultured with melatonin. These results indicate a positive effect of a higher energy diet on body development and in vitro embryo production in prepubertal heifers, with an increase in the blastocyst rate when melatonin is used in embryo culture.

Index terms: antioxidant, biotechnology, breeding program, in vitro fertilization, nutrition, zebu.

Introdução

Reduzir o intervalo entre gerações representa um ponto fundamental no melhoramento genético de rebanhos bovinos, maximizando o progresso genético e a produtividade. Isso pode ser alcançado por meio da seleção genética para precocidade sexual, reduzindo a idade de entrada das novilhas na reprodução. O uso reprodutivo de fêmeas jovens ganhou maior relevância com o avanço das avaliações genômicas para características de interesse na pecuária leiteira e de corte, possibilitando a identificação das fêmeas com maior mérito genético, com confiabilidade, e em idade precoce. Ademais, o desenvolvimento de equipamentos e técnicas de aspiração folicular adaptados para bezerras, menos invasivos, incentivou o aumento de estudos sobre produção de embriões in vitro, visando intensificar a multiplicação de animais com genética superior. Inicialmente, os estudos com bezerras e novilhas eram realizados utilizando laparoscopia, um procedimento cirúrgico (Baldassarre et al., 2018; Batista et al., 2016). Atualmente, essa técnica é realizada por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom *ovum pick up* (OPU) (Elliff et al., 2019), com guia de tamanho adequado para novilhas. Novilhas pré-púberes podem apresentar um número maior de folículos disponível para aspiração (Landry et al., 2016), trazendo vantagens para sua utilização. Porém, as taxas de produção de embriões in vitro de novilhas pré-púberes são inferiores às dos animais que completaram seu desenvolvimento (Guerreiro, 2015), o que permanece como uma limitação.

Entre os fatores que influenciam a idade da puberdade e a precocidade sexual das fêmeas, destaca-se o peso corporal (PC), que reflete o nível de alimentação recebido durante o crescimento. O aporte nutricional pode afetar diretamente os folículos ovarianos, ovócitos e embriões (D'Occhio et al., 2019). Por outro lado, o manejo nutricional restritivo pode retardar o crescimento, resultando em animais sexualmente mais tardios (Amin, 2014).

Em sistemas de produção em fazendas com nível tecnológico mais avançado, aos 12–14 meses, o acasalamento é rotina, trazendo vantagens na eliminação de categorias em crescimento da propriedade e beneficiando a seleção do rebanho, o desfrute e o ganho de gerações. Como meta para o desafio reprodutivo, buscam-se pesos entre 280 e 300 kg, equivalentes a 65% do peso da vaca adulta. Animais criados em pastagens, principal sistema de produção de bovinos em regiões tropicais, necessitam de suplementação proteica e energética para

suprir suas exigências nutricionais de manutenção e crescimento e alcançar as metas de crescimento, que podem variar de 500 g/dia a próximo de 1,0 kg/dia, dependendo do peso ao desmame, no período entre o desmame, aos 7 meses de idade, e o acasalamento, aos 12 meses.

O regime de chuvas imprime ao capim, principal componente da dieta, grande variação em quantidade e qualidade, sendo um desafio maior para os animais atingirem os ganhos de peso adequados às metas de peso para acasalamento em idade precoce, sobretudo durante a seca, quando a contribuição dos nutrientes da forragem é baixa. Nesse período, as pastagens de *Urochloa brizantha* (cultivar *Brachiaria brizantha*), uma das principais cultivares utilizadas em regiões tropicais, contêm, em média, 7% de proteína bruta (PB) e 1,9 megacalorias de energia metabolizável (EM) por quilograma de matéria seca (MS) (Euclides; Medeiros, 2003; Valadares Filho et al., 2018), enquanto, na época das águas, o mesmo capim contém cerca de 10% de PB e 2,0 megacaloria de energia metabolizável por quilograma de matéria seca, com maior disponibilidade de folhas verdes, permitindo ainda a seleção das partes mais nutritivas da planta.

Novilhas entre 4 e 9 meses de idade são mais sensíveis aos efeitos da antecipação da puberdade resultante de maior aporte nutricional (Cardoso et al., 2018), podendo melhorar a produção e a qualidade de ovócitos e embriões. O fator nutricional mais importante que afeta a reprodução em bovinos é a ingestão de energia (Amin, 2014), mas há poucos dados de pesquisa que relacionem os reflexos de maior densidade energética das dietas em categorias dessa idade e dentro de um sistema de produção.

O crescimento dos folículos e a ovulação dependem da secreção pulsátil de hormônio luteinizante (LH) (Canfield; Butler, 1990), insulina e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), entre outros fatores (Amin, 2014). No entanto, com baixa ingestão energética, a secreção desses hormônios é inibida, levando a crescimento e desenvolvimento folicular lentos, o que atrasa a ovulação (Amin, 2014; Imakawa et al., 1987). Por outro lado, a alta ingestão de energia pode elevar as concentrações plasmáticas de insulina e IGF-1 (Armstrong et al., 2001). Assim, a suplementação em curto prazo com dietas ricas em energia pode melhorar o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas, sendo esse efeito mais pronunciado do que o aumento dos níveis de proteína (Armstrong et al., 2001). O propionato, por exemplo, um ácido graxo volátil produzido no rúmen em dietas com alta concentração de amido, desempenha um papel importante na reprodução. Este pode servir como principal substrato gliconeogênico

em ruminantes e modificar o perfil de hormônios reprodutivos pela associação da produção de glicose com o IGF-1, melhorando o desenvolvimento embrionário (Thatcher et al., 2003) e a produção de progesterona (Spicer; Chamberlain, 1998).

De acordo com Davis et al. (2023), devido à resposta fisiológica rápida, a estratégia de suplementação energética na fase que antecede a entrada das fêmeas na reprodução pode ser um método eficaz para aumentar o sucesso das tecnologias de reprodução assistida. Isso sugere que um aumento na produção de propionato pode melhorar os índices reprodutivos. Os tecidos ovarianos respondem diretamente aos estímulos metabólicos, com consequências para a foliculogênese, a esteroidogênese e o desenvolvimento do ovócito e do embrião (Chagas et al., 2007). Além de regular o crescimento folicular, mudanças de curto prazo na ingestão de energia também podem influenciar a morfologia e o potencial de desenvolvimento do ovócito (Mcevoy et al., 1995; O'Callaghan et al., 2000).

A condição nutricional de um animal é geralmente avaliada com base nas alterações no peso vivo e na condição corporal, como em variáveis de carcaça. Contudo, essas são mudanças de longo prazo, enquanto muitos eventos reprodutivos, como ovulação, fecundação e placentação, ocorrem durante um curto período (Amin, 2014).

Conforme mencionado, ovócitos derivados de novilhas pré-púberes têm menor competência de desenvolvimento *in vitro* do que aqueles obtidos em fêmeas adultas. Associado a isso, o manuseio de espermatozoides e ovócitos na fecundação *in vitro* pode reduzir a competência de ambos os gametas, o que se associa a maior produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), resultando em alto nível de estresse oxidativo, regulação alterada da apoptose e prejuízos ao metabolismo (Agarwal et al., 2014; Gutiérrez-Añez et al., 2021). O aumento do estresse oxidativo eleva a probabilidade de ovócitos com defeitos citoplasmáticos e segregação cromossômica anormal (Belhadj Slimen et al., 2016). Como consequência, há uma redução da competência dos ovócitos e do embrião, além de queda nas taxas de concepção (Wolfenson et al., 2000), comprometendo o sucesso reprodutivo.

Embora, durante a maturação *in vitro*, os complexos cúmulus-ovócitos (COCs) ativem seu sistema antioxidante endógeno, essa ação pode não ser suficiente para compensar o aumento das espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo. Substâncias exógenas têm sido utilizadas no processo de criopreservação e manuseio do sêmen para combater o estresse oxidativo. Entre elas, destaca-se a melatonina, substância presente no fluido folicular bovino, que pode melhorar a competência e

o desenvolvimento embrionário (Currin et al., 2021; Gutiérrez-Añez et al., 2021), pois atua como antioxidante na regulação intracelular dos níveis de ROS, embora seus mecanismos relacionados à melhoria do desenvolvimento embrionário *in vitro* ainda não estejam totalmente elucidados.

Neste contexto, este estudo objetivou determinar os efeitos de dietas com diferentes níveis de energia sobre a qualidade e quantidade de ovócitos, a produção de embriões *in vitro* e o desenvolvimento corporal de novilhas Nelore pré-púberes. Também se buscou avaliar o efeito da nutrição associada a estratégias laboratoriais com o cultivo embrionário na presença de melatonina sobre a competência ovocitária e a produção de embriões *in vitro* de novilhas pré-púberes.

Material e métodos

Experimento 1

Neste estudo, foram utilizadas 34 novilhas pré-púberes, com idade inicial de 5,5 meses, que permaneceram em aleitamento natural com suplementação alimentar via *creep-feeding* até o desmame, aos 6,5 meses de idade, quando o lote foi dividido para aplicação dos tratamentos. Durante a fase de *creep-feeding*, o consumo médio de concentrado foi de 0,568 kg/dia, equivalente a 0,38% do peso corporal (PC). O suplemento, formulado à base de farelo de soja, milho moído e minerais (Tabela 1), continha 19,3% de proteína bruta (PB) e 3,10 megacaloria por quilograma de energia metabolizável (EM). O uso do *creep-feeding* nesta fase teve como objetivos promover um ganho de peso superior ao proporcionado exclusivamente pelo leite materno

e adaptar os animais ao manejo com suplementos para a fase seguinte, que envolveu o consumo de suplementos proteicos energéticos no cocho.

Após a pesagem ao desmame (6,5 meses), as novilhas foram divididas em dois grupos experimentais, considerando a idade, o peso e a avaliação genética dos animais. A avaliação genética foi realizada com base em características contempladas no Programa Nelore Brasil, coordenado pela Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP, Ribeirão Preto, SP). Utilizou-se o índice de “mérito genético econômico total (MGte)” e as diferenças esperadas na progênie (DEPs) para as características que compõem esse índice, a saber: PM120g, efeito materno sobre o peso aos 120 dias de idade (kg); PD210g, efeito direto sobre o peso aos 210 dias de idade (kg); PD365g, efeito direto sobre o peso aos 365 dias de idade (kg); PED365g, efeito direto sobre o perímetro escrotal aos 365 dias de idade (cm); ACABg, acabamento de carcaça (mm); STAYg, longevidade (%); e PP30g, probabilidade de parto precoce (%). Estes dados encontram-se detalhados na Tabela 2, e os valores das DEPs foram fornecidos pela ANCP.

Os tratamentos consistiram de planos nutricionais e, conseqüentemente, de crescimento para que os animais atingissem um peso mínimo para serem acasalados aos 12 a 14 meses de idade, que é entre 280 e 300 kg de peso vivo. Assim, o PN1 consistiu de um plano alimentar próximo ao que é corriqueiramente usado para essa categoria nos sistemas de produção: pasto diferido mais suplementação na estação seca (pós-desmame) e pasto mais suplemento no período das águas (Tabela 2).

Tabela 1. Composição do suplemento utilizado no *creep-feeding*, e dos planos nutricionais 1 (PN1) e 2 (PN2) durante o período seco e chuvoso ofertado a novilhas *Bos indicus* da raça Nelore pré-púberes.

Variável nutricional e de desempenho	Período ⁽¹⁾			
	Seco		Chuvoso	
	PN1	PN2	PN1	PN2
Faixa de pesos (kg)	170–240	170–240	240–300	240–300
Ganho alvo (kg)	0,400	0,800	0,650	0,800
Consumo estimado dos ingredientes das dietas				
• Pasto de braquiária (estação seca), consumo estimado (kg/dia)	3,250	–	–	–
• Silagem de milho, consumo estimado (kg/dia)	–	3,500	–	–
• Pasto de braquiária (estação das águas), consumo estimado (kg/dia)	–	–	4,500	3,800
Concentrado, oferta média (kg/dia)	1,400	1,000	0,650	1,870
Consumo de NDF (%PV) ⁽²⁾	1,23	0,86	1,24	1,09

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Variável nutricional e de desempenho	Período ⁽¹⁾			
	Seco		Chuvoso	
	PN1	PN2	PN1	PN2
Composição bromatológica das dietas				
• Matérias seca (%)	56,57	38,12	27,28	21,76
• Proteína bruta (%)	12,22	12,61	15,35	15,97
• Fibra em detergente neutro (%)	52,05	37,91	61,48	50,02
• Minerais (%)	6,95	7,54	9,13	7,80
• Extrato etéreo (%)	2,46	2,63	3,63	3,67
• Ingestão estimada EM ⁽³⁾ (megacaloria por dia)	9,97	11,59	12,92	15,05
• Concentração de EM (megacaloria por quilograma de matéria seca)	2,14	2,61	2,47	2,65

⁽¹⁾ PN: plano nutricional; PN1 controle; PN2 tratamento.

⁽²⁾ NDF (%PV): consumo de fibra em detergente neutro (porcentagem do peso vivo).

⁽³⁾ EM: energia metabolizável.

Traço (-): informação não aplicável.

Tabela 2. Seleção de bezerras *Bos indicus* da raça pré-púberes considerando idade, peso, mérito genético médio do grupo.

Tratamento ⁽¹⁾	Número de animais	Idade (dia)	PD ⁽²⁾	MGTe ⁽³⁾	PM120g ⁽⁴⁾	PD210g ⁽⁵⁾	PD365g ⁽⁶⁾	PED365g ⁽⁷⁾	ACABg ⁽⁸⁾	STAYg ⁽⁹⁾	PP30g ⁽¹⁰⁾
PN1	17	198,71	178,31	13,96	0,84	4,47	13,10	0,57	0,01	71,51	63,14
PN2	17	202,00	180,11	15,24	1,13	5,39	15,05	0,50	0,07	72,11	62,67

⁽¹⁾ PN: plano nutricional. PN1: controle. PN2: tratamento.

⁽²⁾ PD: peso a desmama – peso final na data da desmama (kg).

⁽³⁾ MGTe: mérito genético total econômico.

⁽⁴⁾ PM120g: efeito materno do peso aos 120 dias de idade (kg).

⁽⁵⁾ PD210g: efeito direto do peso aos 210 dias de idade (kg).

⁽⁶⁾ PD365g: efeito direto para peso aos 365 dias de idade (kg).

⁽⁷⁾ PED365g: efeito direto para perímetro escrotal aos 365 dias de idade (cm).

⁽⁸⁾ ACABg: acabamento de carcaça (mm).

⁽⁹⁾ STAYg: longevidade (%).

⁽¹⁰⁾ PP30g: probabilidade de parto precoce (%).

Letra g minúsculas, em cada característica, significam diferenças esperadas na progênie calculadas assistidas por valores genômicos.

Após a separação, os dois grupos de animais foram mantidos em um dos dois planos nutricionais (PN1: controle e PN2: tratamento), com 17 fêmeas por tratamento, para avaliar a produção de ovócitos, o desempenho para crescimento e as variáveis de carcaça. Os planos nutricionais de cada tratamento foram aplicados em duas fases, no período seco e no período chuvoso. O tratamento PN1 consistiu em dietas utilizadas na estação seca e na estação das águas, quando os animais apresentaram uma variação de peso entre 170 e 240 kg na estação seca e entre 240 e 300 kg na estação das águas. A concentração de energia (megacaloria por quilograma de matéria seca) e a estimativa de ingestão diária de energia metabolizável (megacaloria por dia) foram calculadas para ganhos de 0,400 e 0,650 kg/dia nas estações seca e das águas, respectivamente (Tabela 1). O PN2 consistiu em dietas com concentrações

de energia metabolizável mais elevadas que o PN1, projetando ganhos de 0,800 kg/dia para as épocas seca e das águas. Com base na estimativa de consumo do volumoso, o PN2 foi calculado para conter 18 e 6,8 megacalorias por quilograma de matéria seca a mais que o PN1 de energia metabolizável, o que, associado ao consumo de pasto ou silagem, permitiu um consumo estimado de 14% em média acima do PN1 de energia metabolizável diária (megacaloria por dia) (Tabela 1).

Na época seca, os animais do PN1 permaneceram em pastos diferidos de braquiária (*Urochloa brizantha* cultivar *Brachiaria brizantha*), com disponibilidade mínima de 2 mil quilogramas por hectare de matéria seca, e os animais do PN2 foram mantidos em confinamento, com cocho de alimentação (fornecido duas vezes ao dia) e água. Na época chuvosa, os animais de cada tratamento permaneceram

em piquetes separados, de tal forma que, a cada semana, os animais de cada piquete eram trocados. Os pastos foram manejados com altura de entrada de 35 a 40 cm e de saída de 20 a 25 cm. As dietas foram formuladas para atingir um ganho de peso de 400 g/dia, de acordo com os programas BR-Corte (Valadares Filho et al., 2016) e National Research Council (2016). Os animais foram pesados com jejum prévio de sólidos de 14 horas, em intervalos de 28 dias.

Ao final do período de avaliação da suplementação, foram mensuradas a área de olho de lombo (AOL), a espessura de gordura subcutânea (EG) e a espessura de gordura na garupa (P8) de cada animal, por meio de ultrassonografia de carcaça. A AOL e a EG foram mensuradas entre a 12ª e a 13ª costelas, transversalmente sobre o músculo *Longissimus dorsi*, enquanto a P8 foi mensurada na garupa, entre os ossos ílio e isquio, na intersecção dos músculos glúteo médio e bíceps femoral. Essas características foram mensuradas utilizando equipamento de ultrassom Aloka 500V (Tóquio, Japão), com probe linear de 17,5 cm e frequência de 3,5 MHz, utilizando-se acoplador de silicone e óleo vegetal como acoplador acústico. O acabamento da carcaça (ACAB) foi calculado considerando o somatório de EG multiplicado por 35% e P8 multiplicado por 65%.

Após 3 meses de suplementação, ou seja, aos 9,5 meses de idade, os animais de ambos os grupos foram submetidos à OPU a cada 21 dias, durante 3 meses, sem prévia sincronização da onda folicular. Antes de cada sessão de OPU, a presença de corpo lúteo nos ovários das novilhas foi avaliada por meio de um aparelho de ultrassom modo B (SSD 500; Aloka, Tóquio, Japão), equipado com uma sonda retal linear de 7,5 MHz, para monitorar o início da puberdade. A aspiração folicular foi realizada utilizando um ultrassom modo B em tempo real (HS 1500; HondaVR, Toyohashi, Japão), equipado com um transdutor convexo de 7,5 MHz (HondaVR, Toyohashi, Japão).

Os COCs recuperados foram classificados quanto à qualidade em graus 1, 2, 3 ou 4, com base no número de camadas, na expansão das células do cumulus e na aparência citoplasmática em termos de cor, homogeneidade e integridade. Apenas os ovócitos de graus 1 a 3, considerados de maior potencial para desenvolvimento em embriões (STOJKOVIC et al., 2001), foram considerados viáveis, e em seguida maturados e utilizados para fecundação. Resumidamente, 30 COCs foram cultivados em um criotubo de 2,0 mL com 600 µL de meio de maturação in vitro coberto com 250 µL de óleo

mineral. O meio de maturação consistiu em TCM199 com sais de Earle (Thermo Fisher Scientific, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, V/V), 0,2 mM de piruvato, 5 µg/mL de hormônio luteinizante, 1 µg/mL de hormônio folículo-estimulante, 75 µg/mL de amicacina e 1 mM de cistamina. Os COCs foram maturados por 22 a 24 horas a 38,5 °C, em 5% de CO₂ e alta tensão de O₂. Em seguida, os COCs foram transferidos para uma solução de 100 µL de meio de fecundação, composto por Tyrode-albumina-lactato-piruvato suplementado com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 0,2 mM de piruvato, 30 µg/mL de heparina, 20 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina, 1 µM de epinefrina e 75 µg/mL de amicacina.

Para a fecundação in vitro (FIV), foi utilizado sêmen comercial convencional de touro Nelore com fertilidade comprovada in vitro. Cada gota de COC foi fertilizada com uma concentração final de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL, por 18 horas a 38,5 °C, 5% de CO₂ e alta tensão de O₂. Os zigotos foram transferidos para soluções (200 µL) de meio fluido sintético modificado do oviduto, suplementado com 2,7 mM de mio-inositol, 0,2 mM de piruvato, 2,5% de SFB (V/V), 5 mg/mL de BSA e 75 µg/mL de amicacina, e cultivados nas mesmas condições das fases de maturação e fecundação. Os embriões foram cultivados por 7 dias, com avaliações no dia 2 para clivagem e no dia 7 para determinação da taxa de produção de blastocistos. Foram mensuradas também a recuperação total de ovócitos, a qualidade dos ovócitos e a quantidade de ovócitos viáveis.

Foi utilizado delineamento experimental casualizado. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico R (2021) (versão 3.5.1). A homogeneidade da variância foi avaliada pelo teste de Levene e a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. A variação no número de COCs entre as sessões de OPU foi determinada considerando-se o aumento da idade dos animais. A análise de variância (Anova) foi utilizada para detectar diferenças estatísticas, e o teste t de Student foi empregado para comparar as médias de cada tratamento. Para comparar as taxas, foram utilizados o teste Anova e o teste t de Student entre os grupos. Adotou-se essa estratégia, pois as variáveis atendiam aos pressupostos necessários para a utilização de testes paramétricos, como distribuição normal e homogeneidade das variâncias. Esses resultados foram confirmados pelo teste de Bonferroni. O nível de 5% de probabilidade foi considerado como limiar de significância para todos os testes estatísticos.

Experimento 2

Neste estudo, 11 fêmeas Nelore PO da Fazenda Asa Branca, GO, sem seleção genética prévia, foram suplementadas dos 7 aos 13 meses de idade com silagem de milho e concentrado energético-proteico, de acordo com a metodologia da dieta PN2 do primeiro experimento. Após 3 meses de suplementação alimentar (10 meses de idade), oito novilhas pré-púberes (com passagem vaginal para guia de OPU) foram submetidas à aspiração folicular (OPU) mensalmente, sem prévia sincronização da onda folicular, durante 4 meses. Ovócitos de cinco vacas adultas também foram obtidos por OPU e usados como grupo controle. As vacas utilizadas já tinham um padrão de população folicular previamente conhecido e produção de embriões in vitro. O sêmen utilizado também possuía histórico de fertilidade no laboratório.

Os ovócitos recuperados foram divididos nos seguintes grupos experimentais para avaliar o benefício do uso da melatonina na competência ovocitária e na produção de embriões de novilhas pré-púberes: (1) ovócitos de novilhas maturados in vitro com melatonina 10^{-9} M; (2) ovócitos de novilhas maturados com melatonina 10^{-9} M e embriões cultivados com melatonina 10^{-9} M; (3) ovócitos de vacas sem melatonina (controle). A recuperação total dos ovócitos, a qualidade dos ovócitos, os ovócitos viáveis e as taxas de blastocistos no sétimo dia de cultivo foram avaliados entre os grupos. A melatonina não foi utilizada para as vacas, pois elas foram usadas apenas como controle do sistema in vitro e como referência para a produção de embriões de um animal adulto (com eixo hipotálamo-hipófise desbloqueado e ciclando), em comparação com a produção de embriões das novilhas pré-púberes (sem corpo lúteo).

Ao final do período, as 11 novilhas foram submetidas ao protocolo de indução da puberdade e inseminadas em tempo fixo (IATF) com o mesmo sêmen utilizado no processo de produção de embriões in vitro (Figura 1). Após 30 dias da inseminação, foi realizado diagnóstico de gestação por ultrassonografia e a taxa de prenhez foi calculada para confirmação da prova de conceito de exploração máxima da fêmea Nelore jovem por FIV e IATF.

Neste experimento, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando o teste Anova detectou diferenças estatísticas, o teste de Tukey foi utilizado para comparar os tratamentos. Todos os testes estatísticos foram realizados considerando o nível de 5% de probabilidade.

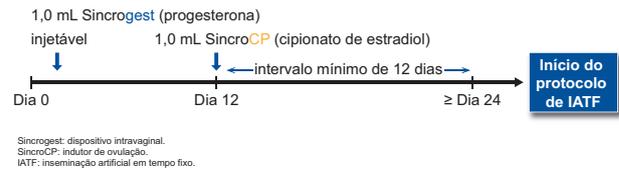


Figura 1. Protocolo de indução de puberdade e inseminação em tempo fixo em fêmeas superprecoces.

Resultados e discussão

Considerando a diferença entre o peso médio inicial e o peso médio final, os animais suplementados com o PN2 apresentaram maior ganho de peso médio que os animais do PN1 ($p = 0,0133$; Tabela 3). O peso acumulado dos animais foi ligeiramente diferente entre os grupos, com os animais do PN2 pesando, aproximadamente, 15 kg a mais que os animais do PN1 ($284,88 \pm 20,19$ x $298,19 \pm 25,15$ para o PN1 e PN2, respectivamente).

Segundo Mousquer et al. (2014), a ciclicidade reprodutiva de fêmeas bovinas é consequência de uma série de eventos hormonais e está mais relacionada ao peso corporal do que à idade, o que foi confirmado por Gregianini et al. (2021) ao avaliar novilhas Nelore com idade média de 12 meses. Nesses estudos, o peso médio das novilhas que engravidaram foi de $287,27 \pm 30,28$ kg, enquanto o das fêmeas vazias foi de $274,84 \pm 29,14$ kg, indicando influência do peso na puberdade sobre a ocorrência de prenhez. Porém, no presente estudo, as fêmeas de ambos os tratamentos não apresentavam corpo lúteo no ovário e permaneceram pré-púberes, ainda que os animais do PN2 tenham atingido o peso sugerido para iniciar a reprodução. Com um desenvolvimento corporal adequado, pode-se utilizar um protocolo hormonal para induzir a puberdade, seguido de inseminação artificial.

Animais com peso corporal mais elevado à maturidade tendem a atingir a puberdade de forma tardia (Lacerda et al., 2018), além de iniciar a deposição de gordura em uma idade mais avançada. Entretanto, o maior PC das novilhas suplementadas com o PN2 reflete em um aumento na velocidade de crescimento e desenvolvimento corporal ainda em menor idade, o que pode antecipar a condição corporal necessária para o desencadeamento da puberdade. Estudos demonstraram que a associação entre o peso corporal e características indicadoras de precocidade sexual, como a probabilidade de parto precoce e/ou idade ao primeiro parto, na raça Nelore é de baixa a moderada, mas favorável, especialmente quando avaliada em idades mais jovens (Kluskaa et al., 2018). Isso provavelmente ocorre porque animais mais jovens, com maior taxa

de crescimento, apresentam rápido desenvolvimento corporal, incluindo início antecipado da deposição de gordura, tecido precursor de hormônios que levam ao desenvolvimento do aparelho reprodutivo e à maturidade sexual (Pires et al., 2017; Andrade et al., 2020; Gregianini et al., 2021; Brunet et al., 2022). Esses relatos corroboram os resultados obtidos no presente estudo e sugerem que melhorias na estratégia nutricional que levem a um maior peso corporal possibilitam a produção de novilhas com maior precocidade e fertilidade sexual, em menor idade.

Os resultados das análises das características morfométricas estão apresentados na Tabela 4 e na Figura 2. Os valores de AOL não diferiram

entre os dois grupos de tratamento. Os animais suplementados com o PN2 tiveram média para EG de $3,70 \pm 0,59$ mm, significativamente maior que a dos animais do PN1 ($3,11 \pm 0,48$ mm; $p=0,013$). Da mesma forma, a P8 média dos animais do PN2 foi significativamente maior que a dos animais do PN1, com valor de 1,11 mm a mais ($p = 0,001$). Os animais do PN2 apresentaram melhor acabamento de carcaça em comparação aos animais do PN1 ($p < 0,0001$). Assim, animais que receberam maior oferta de energia (PN2) apresentam maior acúmulo de gordura em comparação àqueles alimentados com menor aporte de energia (PN1), justificando também os resultados obtidos quanto ao maior número de ovócitos recuperados e viáveis (Tabela 3).

Tabela 3. Ganho de peso médio mensal e diferença entre pesos iniciais e finais dos tratamentos de suplementação alimentar PN1 e PN2 em novilhas *Bos indicus* da raça Nelore pré-púberes.

Peso	Plano nutricional ⁽¹⁾		Valor de P
	PN1	PN2	
Peso 0	163,13 ± 18,42	162,31 ± 16,96	0,4484
Peso 1	180,12 ± 18,02	178,31 ± 16,00	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
Ganho de peso ⁽²⁾	120,71 ± 13,81 b	135,88 ± 18,55 a	0,0133

⁽¹⁾ PN1: controle. PN2: tratamento.

⁽²⁾ Diferença entre o peso médio inicial (peso 0) e peso médio final (P7) entre os tratamentos PN1 e PN2.

Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Tabela 4. Parâmetros (médias ± desvio-padrão) do desenvolvimento corporal de novilhas *Bos indicus* da raça Nelore pré-púberes submetidas a dois planos nutricionais.

Parâmetro	Plano nutricional ⁽¹⁾		Valor de P
	PN1	PN2	
Área de olho de lombo (cm ²)	50,16 ± 2,13	48,78 ± 2,25	0,075
Espessura de gordura subcutânea (mm)	3,11 ± 0,48 b	3,70 ± 0,59 a	0,013
Espessura de gordura na garupa (mm)	4,12 ± 0,99 b	5,23 ± 0,56 a	0,001
Acabamento (mm)	3,68 ± 0,64 b	4,70 ± 0,48 a	0,001

⁽¹⁾ PN1: controle. PN2: tratamento.

Letras minúsculas na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

Foto: Carlos Frederico Martins

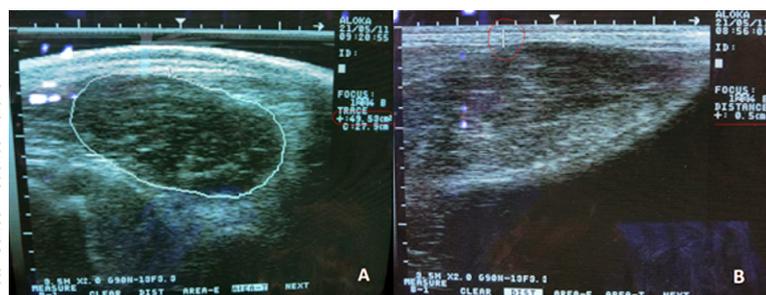


Figura 2. Imagens da área de olho de lombo (A) e espessura de gordura (B) mensuradas por ultrassonografia em novilhas *Bos indicus* da raça Nelore pré-púberes suplementadas com o plano nutricional 2.

A gordura corporal é importante para o desencadeamento da puberdade e para atingir a maturidade sexual, pois, associada à taxa de ganho de peso, atua como um indicador da condição corporal, modulando a frequência e os pulsos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) no sistema nervoso central, iniciando a atividade do eixo hipotalâmico e desencadeando a puberdade (Randel; Welsh, 2013). Animais alimentados com o PN2 não só apresentavam maior gordura corporal do que os animais do PN1, mas provavelmente também apresentavam maior proporção de gordura visceral, pois é alta a correlação entre gordura de acabamento e gordura visceral quando medidas por ultrassonografia (Ribeiro et al., 2008). O conteúdo total de gordura corporal pode antecipar a puberdade em novilhas. Segundo Basarab et al. (2011), a gordura corporal pode ser responsável por diferenças metabólicas e na maturação reprodutiva de animais jovens.

Foi observado maior crescimento corporal e deposição de gordura nos animais suplementados com o PN2, que apresentou maior concentração energética, sendo formuladas para maiores taxas de ganho de peso. Este comportamento pode ter influenciado positivamente o aumento do número de ovócitos viáveis, levando ao mesmo potencial de desenvolvimento embrionário que os ovócitos de vacas adultas. As novilhas alimentadas no PN1 tiveram o comportamento esperado para o plano nutricional quanto ao ganho de peso. Por outro lado, espera-se que novilhas alimentadas com dietas que não atendam às suas exigências nutricionais produzam ovócitos de qualidade inferior e taxas reduzidas de clivagem embrionária e de blastocistos em comparação com animais com escore de condição corporal moderado alimentados com dietas que atendem às suas necessidades. Da mesma forma, o excesso de peso e de gordura na carcaça de novilhas está correlacionado com embriões de baixa qualidade e taxas de prenhez reduzidas (Horn et al., 2022).

Segundo Ashworth et al. (2009), o aporte nutricional adequado aumenta a capacidade reprodutiva de novilhas por meio da melhoria na qualidade dos gametas e da competência embrionária. Por outro lado, o elevado consumo de alimento pode levar à obesidade e à redução do desempenho desses animais (Bagley, 1993). Os efeitos da obesidade sobre a qualidade do ovócito e a fertilidade são complexos. No entanto, há relatos de que a obesidade pode levar ao dano mitocondrial, à resposta ao estresse do retículo endoplasmático e à síntese hormonal desregulada em células da granulosa, enquanto nenhuma dessas alterações ocorre em indivíduos com peso corporal normal (Si et al., 2021). As células da

granulosa desempenham um papel importante no desenvolvimento de ovócitos e folículos, incluindo a secreção de nutrientes e hormônios essenciais para o crescimento folicular, proporcionando um microambiente adequado para a meiose e a maturação do ovócito (Komatsu; Masubuchi, 2018). Outro fator que pode levar à má qualidade do ovócito em indivíduos com excesso de peso e gordura corporal é a exposição das células ovarianas a altos níveis de ácidos graxos. Essa exposição pode resultar em uma resposta inflamatória nos folículos ovarianos, produção excessiva de andrógenos ovarianos através da oxidação ineficaz de ácidos graxos livres nas mitocôndrias (Gervais et al., 2015), resistência à insulina (Xu et al., 2019), danos oxidativos ao DNA, diminuição dos níveis de estradiol, baixas taxas de ovulação e qualidade ovocitária comprometida (Chaube et al., 2014; Si et al., 2021). No presente estudo, o PN2 foi suficiente para promover desenvolvimento corporal adequado e deposição moderada de gordura, sem levar a hiper-nutrição e prejuízos ao desempenho reprodutivo dos animais.

No experimento 1, as novilhas Nelore pré-púberes que receberam a dieta do PN2 apresentaram 49% mais ovócitos recuperados que os animais do PN1 ($p = 0,018$; Tabela 5). O número total de ovócitos viáveis por OPU foi aproximadamente 42% maior nos animais do grupo suplementado com PN2 em comparação ao suplementado com PN1 ($p = 0,049$; Tabela 5).

Tabela 5. Número de ovócitos recuperados e viáveis (média \pm desvio-padrão) obtidos por aspiração intrafolicular guiada por ultrassom de novilhas *Bos indicus* da raça Nelore pré-púberes alimentadas com diferentes planos nutricionais (PN).

Variável	Plano nutricional ⁽¹⁾		Valor de P
	PN1	PN2	
Ovócitos recuperados	99,00 \pm 19,85 b	148,25 \pm 20,76 a	0,018
Ovócitos viáveis	79,75 \pm 14,82 b	113,25 \pm 21,40 a	0,049

⁽¹⁾ PN1: controle. PN2: tratamento.

Números com letras minúsculas na mesma linha apresentam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$).

No presente estudo, observou-se que o número de COCs recuperados por OPU foi 1,49 vezes maior, com 1,42 vezes mais ovócitos viáveis em novilhas Nelore pré-púberes alimentadas com o PN2, que continha maiores níveis de EM. Embora não tenha sido mensurado, esses achados indicam indiretamente que uma maior população folicular estava presente nos ovários das novilhas suplementadas com maior nível de EM, principalmente porque foi

observada uma baixa variação no número de COCs entre as OPU. Esses resultados podem ser atribuídos aos efeitos positivos do aumento da energia na dieta, levando ao maior desenvolvimento corporal, à moderada deposição de gordura e à maior disponibilidade de metabólitos, melhorando o equilíbrio hormonal em novilhas pré-púberes. Segundo Sartori et al. (2017), fatores de manejo, como tipo de dieta, consumo de alimento e ingestão de energia, têm grande impacto na quantidade e qualidade do ovócito. Esses fatores podem afetar os níveis circulantes de insulina e IGF-1, e estão diretamente envolvidos na função do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, afetando o desempenho reprodutivo, como observado neste estudo. O número de ovócitos viáveis foi superior ao relatado por Silva (2022a), que obteve $20,60 \pm 5,12$ ovócitos viáveis por OPU em novilhas Nelore pré-púberes da mesma idade dos animais deste estudo. Não houve diferença significativa na taxa de clivagem entre os tratamentos ($p = 0,57$; Tabela 6). Entretanto, os animais suplementados com o PN2 apresentaram taxa de blastocisto D7 superior à dos animais suplementados com o PN1 ($p=0,047$; Tabela 6).

Tabela 6. Taxas de clivagem e blastocistos de novilhas *Bos indicus* da raça Nelore pré-púberes alimentadas com diferentes planos alimentares.

Variável	Plano nutricional ⁽¹⁾		Valor de P
	PN1	PN2	
Taxa de clivagem	82,4 (206/250)	81,9 (295/360)	0,57
Taxa de blastocisto	24,4 (61/250)	29,7 (108/360)	0,047

⁽¹⁾PN1: controle. PN2: tratamento.

Embora tenha sido relatado que novilhas pré-púberes possam produzir embriões viáveis (Taneja et al., 2000), ovócitos de fêmeas jovens apresentam menor capacidade de desenvolvimento embrionário do que ovócitos de vacas adultas (Presicce et al., 1997; Majerus et al., 1999). Esse comportamento pode ser atribuído a diferenças citoplasmáticas (Salamone et al., 2001) e/ou nucleares (Aston et al., 2006). Além disso, sabe-se que os ovócitos de novilhas pré-púberes têm um número menor de transcritos do que os de fêmeas bovinas púberes (Dorji et al., 2012). Por outro lado, os animais que consumiram maior nível de EM provavelmente apresentaram maior produção de propionato e, conseqüentemente, mais IGF-1 e progesterona, o que pode ter alterado o desenvolvimento do blastocisto nas novilhas. Um efeito positivo que apoia essa teoria é que os animais do PN2 produziram 43% mais embriões

do que os do PN1 (Tabela 6). Esses resultados corroboram a teoria de Santos et al. (2008), que afirmaram que o manejo nutricional pode influenciar a capacidade dos ovócitos dentro dos folículos e dos óvulos fecundados, levando a embriões com alto potencial de desenvolvimento.

A maior taxa de blastocistos D7 das novilhas do PN2, em comparação às do PN1, indica um efeito benéfico da oferta de dietas ricas em energia em um curto período, podendo levar ao aumento da produção de hormônios, como a insulina. No entanto, é importante ressaltar que a ingestão elevada ou excessiva de energia durante um longo período tem um efeito negativo na taxa de blastocistos (Baruselli et al., 2012). A taxa de formação de blastocistos de novilhas do PN2 foi superior à relatada por Silva (2020), que obteve valores de 19,2% avaliando novilhas Nelore com 12 mês de idade. A taxa de produção de blastocistos encontrada no presente estudo também foi superior à relatada por Baruselli et al. (2016), com valores de 20,2% em novilhas pré-púberes entre 8 e 12 meses de idade, e por Silva (2022a), que relatou uma taxa de blastocisto de 27,1% em novilhas Nelore com 13 meses de idade.

Quando novilhas pré-púberes sem seleção genética prévia foram suplementadas com a dieta PN2, não foram observadas diferenças estatísticas significativas no número de ovócitos graus 1, 2, 3 e 4 entre as categorias de novilhas pré-púberes e vacas adultas (Tabela 7). Também não foram encontradas diferenças no número de ovócitos recuperados e viáveis em função da categoria de fêmeas avaliadas, indicando um benefício da suplementação alimentar. Na Figura 3, estão apresentadas imagens de ovócitos selecionados para maturação e embriões em D7 de novilhas Nelore pré-púberes suplementadas com o PN2.

Tabela 7. Número de ovócitos totais e viáveis recuperados em novilhas *Bos indicus* da raça Nelore pré-púberes suplementadas e vacas.

Variável	Novilha pré-púbere	Vaca	Valor de P
Ovócitos recuperados	$28,47 \pm 5,80$	$32,02 \pm 14,21$	0,627
Ovócitos viáveis	$23,62 \pm 5,58$	$25,11 \pm 11,78$	0,805
Ovócitos grau 1	$2,41 \pm 1,12$	$1,66 \pm 0,56$	0,216
Ovócitos grau 2	$14,57 \pm 6,26$	$12,77 \pm 7,72$	0,696
Ovócitos grau 3	$6,65 \pm 1,53$	$4,82 \pm 1,70$	0,112
Ovócitos grau 4	$4,84 \pm 5,80$	$6,90 \pm 1,87$	0,513

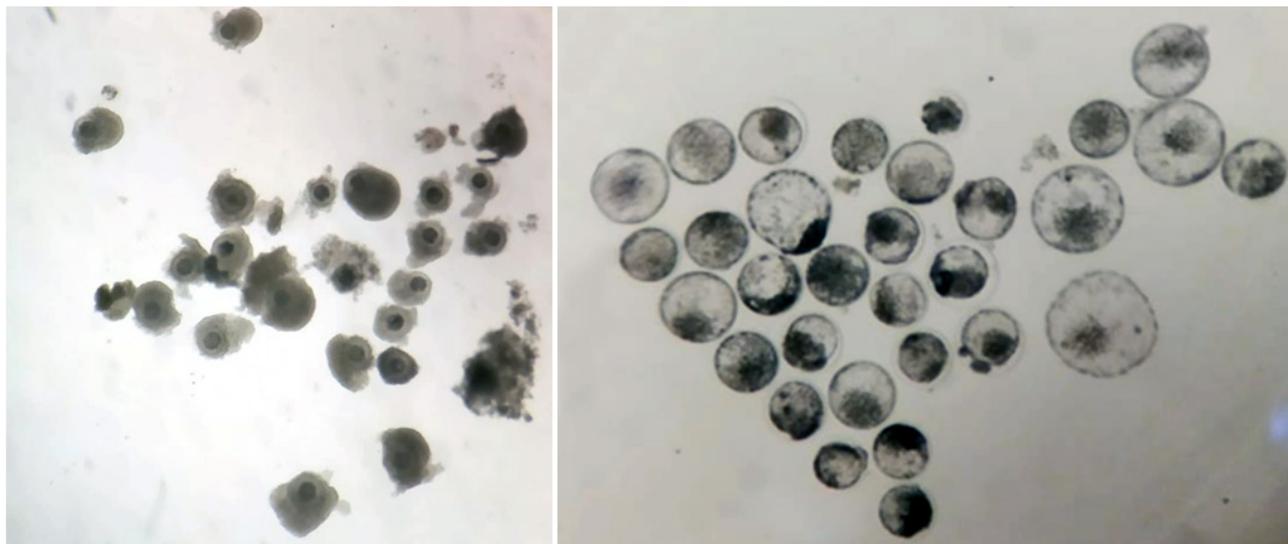


Foto: Carlos Frederico Martins

Figura 3. Ovócitos selecionados para maturação e embriões em D7 de novilhas *Bos indicus* da raça Nelore pré-púberes suplementadas com o plano nutricional 2.

Os resultados obtidos demonstram um efeito positivo da suplementação nutricional no desempenho reprodutivo de fêmeas jovens, associado a um melhor desenvolvimento corporal (Tabela 4). Como mencionado, o nível alimentar tem grande impacto na qualidade dos ovócitos (Sartori et al., 2017). Assim, caso as exigências nutricionais não sejam supridas, isso pode atrasar a puberdade e o desenvolvimento do sistema reprodutor (Day et al., 1987). Por outro lado, o PN2 utilizado foi capaz de promover o adequado desenvolvimento das novilhas avaliadas. Fêmeas alimentadas com maior aporte nutricional apresentam maiores níveis de IGF-1, hormônio fundamental para a função folicular ovariana normal, e isso pode explicar a puberdade precoce em novilhas (Catussi et al., 2023), além do número similar de ovócitos viáveis entre novilhas pré-púberes e vacas adultas obtido neste estudo.

Além disso, quando ovócitos e embriões de novilhas pré-púberes foram cultivados adicionalmente com melatonina a 10^{-9} M, observou-se que a taxa de blastocistos no D7 foi superior nesse tratamento em comparação ao uso da melatonina apenas na maturação ovocitária (Tabela 8), com valores similares aos de vacas adultas. Esses achados destacam um efeito positivo da melatonina no cultivo de embriões de novilhas pré-púberes, que produziram 13% mais embriões do que aquelas que tiveram a melatonina apenas na maturação ovocitária. Esse comportamento pode ser atribuído ao efeito que a suplementação de melatonina em diferentes meios de cultura de embriões bovinos *in vitro* exerce sobre a redução do número de células apoptóticas e do estresse oxidativo celular, levando a um melhor no

desenvolvimento e na qualidade dos embriões (Marques et al., 2021), mesmo com ovócitos oriundos de fêmeas pré-púberes.

O presente estudo se caracteriza como o primeiro relato do efeito positivo da melatonina na fecundação *in vitro* de ovócitos provenientes de fêmeas pré-púberes em sistema de alta tensão de O_2 . O uso da melatonina melhorou a competência ovocitária e aumentou as taxas de embriões nessa categoria, de forma similar à produção de embriões na categoria de vacas adultas (Tabela 8). A taxa de blastocistos de 38% neste estudo foi superior aos achados de Silva et al. (2022b) para novilhas de 13 meses (27% de blastocistos) e novilhas de 25 meses (35% de blastocistos), indicando uma associação benéfica entre uma abordagem de manejo nutricional e uma abordagem laboratorial com o uso da melatonina em ovócitos de fêmeas jovens Nelore (10 a 14 meses).

Além disso, a estratégia de suplementação nutricional foi importante para o desenvolvimento corporal das novilhas pré-púberes, que alcançaram peso médio de $290,82 \pm 53,9$ kg aos 13 meses de idade. Isso permitiu a indução da puberdade, a inseminação artificial e o alcance de uma taxa de prenhez de 54,40% (Figura 4). O resultado de prenhez obtido neste estudo foi superior ao relatado por Freitas (2015), que registrou 43% de prenhez em novilhas Nelore de 14 meses, após indução da puberdade e inseminação artificial em tempo fixo. Apesar do pequeno número de novilhas pré-púberes inseminadas, esse resultado configura-se como uma prova de conceito da exploração máxima da genética de uma fêmea jovem por meio da fecundação *in vitro* e, em seguida, pela inseminação artificial.

Tabela 8. Taxa de clivagem e blastocistos de novilhas *Bos indicus* da raça Nelore pré-púberes com diferentes tratamentos usando melatonina.

Tratamento	Ovócito	Taxa de clivagem (%)	Taxa de blastocisto (%)
Novilhas pré-púberes (melatonina 10 ⁻⁹ M na maturação ovocitária)	390	77,69% (303/390)	25,38 (99/390) b
Novilhas pré-púberes (melatonina 10 ⁻⁹ M na maturação ovocitária e cultivo embrionário)	362	85,35% (309/362)	38,12 (138/362) a
Vacas (controle)	237	82,29% (237/288)	41,66 (120/288) a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas (P < 0,05).

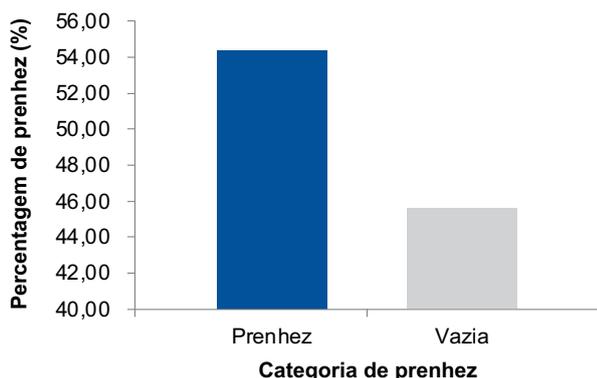


Figura 4. Percentagem de novilhas precoces (14 meses) inseminadas em tempo fixo (IATF) após suplementação alimentar que foram diagnosticadas como prenhes.

Conclusões

1) Novilhas Nelore pré-púberes que receberam dietas com maior densidade energética (PN2) durante a recria apresentaram aumento no número de ovócitos recuperados, ovócitos viáveis e embriões produzidos in vitro. Além disso, essas novilhas mostraram maior peso e deposição de gordura corporal, permitindo que as fêmeas atingissem o peso e a condição corporal sugeridos para a entrada na reprodução aos 12–14 meses de idade. O uso de planos nutricionais com maior densidade energética por um período durante a fase que antecede a puberdade de novilhas Nelore é uma estratégia indicada para maximizar a eficiência reprodutiva, com aumento na produção de embriões e melhorias na preparação

das fêmeas para um programa de inseminação artificial.

2) O uso de melatonina durante a maturação ovocitária e o cultivo embrionário de ovócitos oriundos de novilhas pré-púberes melhora ainda mais a taxa de blastocistos no D7. Dessa forma, destaca-se a importância do cuidado nutricional no início do crescimento da fêmea, bem como o uso da melatonina para a produção de embriões em sistema de alta tensão de oxigênio, controlando radicais livres e melhorando a qualidade embrionária.

Agradecimentos

À Embrapa, pelo apoio financeiro; à Fazenda Asa Branca, pelo fornecimento das bezerras Nelore utilizadas no segundo experimento.

Referências

- AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU PLESSIS, S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 112, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-112>.
- AMIN, R. U. Nutrition: its role in reproductive functioning of cattle—a review. **Veterinary Clinical Science**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.
- ANDRADE, E. F.; FERREIRA, D. F.; SANTOS, P. E. F. dos; EUSTÁQUIO FILHO, A. Main factors that affect the precocity of Nelore heifers and the classification of the early production system: a review. **Recital**, v. 2, n. 3, p. 57-72, 2020.
- ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1624-1632, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1624>.
- 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. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3351-3361, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0184>.
- ASTON, K. I.; LI, G-P.; HICKS, B. A.; SESSIONS, B. R.; PATE, B. J.; HAMMON, D. S.; BUNCH, T. D.; WHITE, K. L. The developmental competence of bovine nuclear

transfer embryos derived from cow versus heifer cytoplasts. **Animal Reproduction Science**, v. 95, n. 3-4, p. 234-243, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.10.011>.

BAGLEY, C. P. Nutritional management of replacement beef heifers: a review. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 11, p. 3155-3163, 1993. DOI: <https://doi.org/10.2527/1993.71113155x>.

BALDASSARRE, H.; CURRIN, L.; MICHALOVIC, L.; BELLEFLEUR, A. M.; GUTIERREZ, K.; MONDADORI, R. G.; GLANZNER, W. G.; SCHUERMANN, Y.; BOHRER, R. C.; DICKS, N.; LOPEZ, R.; GRAND, F. X.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; GOURDON, J.; BORDIGNON, V. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.005>.

BARUSELLI, P.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; MENDANHA, M. F.; BÓ GA. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s4, p. 134-141, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02067.x>.

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. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 264-272, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR861>.

BASARAB, J. A.; GOLAZO, M. G.; AMBROSE, D. J.; NOVAK, S.; MCCARTNEY, D.; BARON, V. S. Residual feed intake adjusted for backfat thickness and feeding frequency is independent of fertility in beef heifers. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 91, n. 4, p. 573-584, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjas2011-010>.

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.; BASURELLI, P. S. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.08.001>.

BELHADJ SLIMEN, I.; NAJAR, T.; GHRAM, A.; ABDERRABBA, M. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**,

v. 100, n. 3, p. 401-412, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.12379>.

BRUNES, L. C.; BALDI, F.; COSTA, M. F. O.; QUINTANS, G.; BANCHERO, G.; LOBO, R. B.; MAGNABOSCO, C. U. Early growth, backfat thickness and body condition has major effect on early heifer pregnancy in Nelore cattle. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191559>.

CANFIELD, R. W.; BUTLER, W. R. Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, n. 3, p. 323-330, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(90\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0739-7240(90)90038-2).

CARDOSO, C. R.; ALVES, B. R. C.; WILLIAMS, G. L. Neuroendocrine signaling pathways and the nutritional control of puberty in heifers. **Animal Reproduction**, v. 15, ns. 1, p. 868-878, 2018. Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium. DOI: <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0013>.

CATUSSI, B. L. C.; de MELO, C.; SILVA, L. G. da; ABREU, L. A. de; KOURY FILHO, W.; LOBO, R. B.; D'OCCHIO, J.; BARUSELLI, P. S. Influence of nutrition and genetic selection for puberty on the reproductive response of Nelore heifers submitted to fixed-time AI and oocyte recovery with in vitro fertilization. **Livestock Science**, v. 274, p. 105263, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2023.105263>.

CHAGAS, L. M.; BASS, J. J.; BLACHE, D.; BURKE, C. R.; KAY, J. K.; LINDSAY, D. R.; LUCY, M. C.; MARTIN, G. B.; MEIER, S.; RHODES, F. M.; ROCHE, J. R.; THATCHER, W. W.; WEBB, R. Invited review: new perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4022-4032, 2007. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2006-852>.

CHAUBE, S. K.; SHRIVASTAV, T. G.; TIWARI, M.; PRASAD, S.; TRIPATHI, A.; PANDEY, A. K. Neem (*Azadirachta indica* L.) leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals. **SpringerPlus**, v. 3, [e]464, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-464>.

CURRIN, L.; BALDASSARRE, H.; BORDIGNON, V. In vitro production of embryos from prepubertal holstein cattle and mediterranean water buffalo: problems, progress and potential. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2275, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11082275>.

D'OCCHIO, M. J.; BARUSELLI, P. S.; CAMPANILE, G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: a review. **Theriogenology**, v. 125, p. 277-284, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.010>.

- DAVIS, T. C.; AMIRALTA, K. E.; STEWART, J. W.; GLEASON, C. B.; DIAS, N. W.; TIMLIN, C. L.; SEEKFORD, Z. K.; EALY, A. D.; MERCADANTE, V. R. G.; WHITE, R. R. Effect of dietary energy source on pregnancy rates and reproductive physiology of pastured beef heifers. **Frontiers in Animal Science**, v. 4, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fanim.2023.1170377>.
- DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P. L.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 5, p. 1054-1065, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod37.5.1054>.
- DORJI; OHKUBO, Y.; MIYOSHI, K.; YOSHIDA, M. Gene expression differences in oocytes derived from adult and prepubertal japanese black cattle during In Vitro Maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 3, p. 392-402, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01887.x>.
- ELLIFF, F. M.; GUIMARÃES, E. C.; FÉRES, L. F.; BAYEUX, B. M.; COLLI, M. H. A.; BARUSELLI, P. S. 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, n. 1, p. 191, 2019.
- EUCLIDES, V. P. B.; MEDEIROS, S. R. de. **Valor nutritivo das principais gramíneas cultivadas no Brasil**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003.
- FREITAS, B. G. **Influência do desenvolvimento corporal na resposta aos programas de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo em novilhas Nelore de 14 meses de idade**. 2015. 86 f. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GERVAIS, A.; BATTISTA, M-C.; CARRANZA-MAMAME, B.; LAVOIE, H. B.; BAILLARGEON, J. P. Follicular fluid concentrations of lipids and their metabolites are associated with intraovarian gonadotropin-stimulated androgen production in women undergoing in vitro fertilization. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 5, p. 1845-1854, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3649>.
- GREGIANINI, H. A. G.; CARNEIRO JUNIOR, J. M.; PINTO NETO, A.; COSTA FILHO, L. C. C. da; GREGIANINI, J. T. F.; PINHEIRO, A. K.; TRENKEL, C. K. G. Precocidade sexual de novilhas Nelore em rebanho sob seleção no Estado do Acre. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e16310413945, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13945>.
- GUERREIRO, B. M. **Produção in Vitro de embriões de doadoras pré-púberes da Raça Holandesa**. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GUTIÉRREZ-AÑEZ, J. C.; LUCAS-HAHN, A.; HADELER, K. G.; ALDAG, P.; NIEMANN, H. Melatonin enhances in vitro developmental competence of cumulus-oocyte complexes collected by ovum pick-up in prepubertal and adult dairy cattle. **Theriogenology**, v. 161, p. 285-293, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.011>.
- HORN, E. J.; READ, C. C.; EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; RHINEHART, J. D.; PAYTON, R. R.; CAMPAGNA, S. R.; KLABNIK, J. L.; CLARK, H. M.; MYER, P. R.; MCLEAN, K. J.; MOOREY, S. E. Preovulatory follicular fluid and serum metabolome profiles in lactating beef cows with thin, moderate, and obese body condition. **Journal of Animal Science**, v. 100, n. 7, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/jas/skac152>.
- IMAKAWA, K.; DAY, M. L.; ZALESKY, D. D.; CLUTTER, A.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Effects of 17 β -Estradiol and Diets Varying in Energy on Secretion of Luteinizing Hormone in Beef Heifers. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 3, p. 805-815, 1987. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1987.643805x>.
- KLUSKAA, S.; OLIVIERI, B. F.; BONAMY, M.; CHIAIA, L. J.; FEITOSA, F. L. B.; BERTON, M. P.; PERIPOLLI, E.; LEMOS, M. V. A.; TONUSSI, R. L.; LOBO, R. B.; MAGNABOSCO, C. U.; CROCE, F. DI, OSTERSTOCK, J.; PEREIRA, A. S. C.; MUNARI, D. P.; BEZERRA, L. A.; LOPES, F. B.; BALDI, F. Estimates of genetic parameters for growth, reproductive, and carcass traits in Nelore cattle using the single step genomic BLUP procedure. **Livestock Science**, v. 216, p. 203-209, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.08.015>.
- KOMATSU, K.; MASUBUCHI, S. Mouse oocytes connect with granulosa cells by fusing with cell membranes and form a large complex during follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 3, p. 527-535, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/iy072>.
- LACERDA, V. V.; CAMPOS, G. S.; ROSO, V. M.; SOUZA, F. R. P.; BRAUNER, C. C.; BOLIGON, A. A. Effect of mature size and body condition of Nelore females on the reproductive performance. **Theriogenology**, v. 118, p. 27-33, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.036>.
- LANDRY, D. A.; BELLEFLEUR, A. M.; LABRECQUE, R.; GRAND, F. X.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1240-1246, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.036>.
- 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. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00209-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00209-5).

MARQUES, T. C.; SANTOS, E. C. D. S.; DIESEL, T. O.; MARTINS, C. F.; CUMPA, H. C. B.; LEME, L. O.; DODE, M. A. N.; ALVES, B. G.; COSTA, F. P. H.; OLIVEIRA, E. B.; GAMBARINI, M. L. Blastocoel fluid removal and melatonin supplementation in the culture medium improve the viability of vitrified bovine embryos. **Theriogenology**, v. 160, p. 134-141, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.028>.

MCEVOY, T. G.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P.; FINDLAY, P. A.; PALMER, R. M.; ROBERTSON, I. S. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 2, p. 89-107, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(95\)01392-D](https://doi.org/10.1016/0378-4320(95)01392-D).

MOUSQUER, C. J.; FERNANDES, F. F. D.; FERNANDES, G. A.; de CASTRO, W. J. R.; HOFFMAN, A.; SIMIONI, T. A.; MOUSQUER, A. J.; GOMES, R. C. P. Desempenho reprodutivo de matrizes Nelore. **Pubvet**, v. 8, n. 3, 2014. DOI: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v8n3.1666>.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 8th ed. Washington, DC: National Academy of Sciences, 2016.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 118, n. 2, p. 303-13, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1530/reprod/118.2.303>.

PIRES, B. C.; THOLON, P.; BUZANKAS, M. E.; SBARDELLA, A. P.; ROSA, J. O.; SILVA, L. O. C. da; TORRES JUNIOR, R. A. de A.; MUNARI, D. P.; ALENCAR, M. M. de. Genetic analyses on bodyweight, reproductive, and carcass traits in composite beef cattle. **Animal Production Science**, v. 57, n. 3, p. 415-421, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1071/AN15458>.

PRESICCE, G. A.; JIANG, S.; SIMKIN, M.; ZHANG, L.; LOONEY, C. R.; GODKE, R. A.; YANG, Z. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 2, p. 386-392, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.2.386f>.

R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R. Foundation for Statistical Computing, 2021. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 28 mar. 2021.

RANDEL, R. D.; WELSH, T. H. Joint alpha-beef species symposium: interactions of feed efficiency with beef heifer reproductive development. **Journal of Animal**

Science, v. 91, n. 3, p. 1323-1328, 2013. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5679>.

RIBEIRO, F. R. B.; TEDESCHI, L. O.; STOUFFER, J. R.; CARTENS, G. E. Technical note: a novel technique to assess internal body fat of cattle by using real-time ultrasound. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 3, p. 763-767, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0560>.

SALAMONE, D. F.; DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; ROBI, J. M.; DUBY, R. T. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1761-1768, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1761>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.010>.

SARTORI, R.; SPIES, C.; WILTBANK, M. C. Effects of dry matter and energy intake on quality of oocytes and embryos in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 1, p. 58, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD16395>.

SI, C.; WANG, N.; WANG, M.; LIU, Y.; NIU, Z.; DING, Z. TMT-based proteomic and bioinformatic analyses of human granulosa cells from obese and normal-weight female subjects. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 19, n. 1, p. 75, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00760-x>.

SILVA, L. G. D. **Produção in vitro de embriões de novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade tratadas ou não com FSH**. 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo.

SILVA, M. E. R. **Efeito da indução de puberdade em novilhas de corte sobre a taxa de gestação ao final da estação de monta**. 2022a. 57 f. Trabalho de conclusão de curso (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia.

SILVA, M. O.; BORGES, M. S.; FERNANDES, L. G.; RODRIGUES, N. N.; WATANABE, Y. F.; JOAQUIM, D. C.; OLIVEIRA, C. S.; DA FEUCHARD, V. L. S.; DOS CYRILLO, J. N. S. G.; MERCADANTE, M. E. Z.; MONTEIRO, F. M. Effect of Nelore (*Bos indicus*) donor age on in vitro embryo production and pregnancy rate. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, n. 9, p. 980-988, 2022b. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.14164>.

SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S. Influence of cortisol on insulin- and insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-induced steroid production and on IGF-1 receptors in cultured bovine granulosa cells and thecal

cells. **Endocrine**, v. 9, n. 2, p. 153-162, 1998.
DOI: <https://doi.org/10.1385/ENDO:9:2:153>.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>.

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. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor nimal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 206-213, 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.206>.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MEIKLE, A.; KAMIMURA, S.; BILBY, T.; KOWALSKI, A. A.; BADINGA,

L.; PERSHING, R.; BARTOLOME, J.; SANTOS, J. E. Regulation of embryo survival in cattle. **Reproduction**, v. 61, p. 253-66, 2003. Supplement.

VALADARES FILHO, S. C.; LOPES, S. A.; CHIZZOTTI, M. L. **BR Corte**: nutrient requirements of Zebu and crossbred. 3. ed. Viçosa: UFV, DZO, 2016.

VALADARES FILHO, S. C.; LOPES, S. A.; CHIZZOTTI, M. L. **Feed composition tables for ruminants**. Viçosa: UFV, DZO, 2018.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 535-547, 2000.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00102-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00102-0).

XU, L.; WANG, W.; ZHANG, X.; KE, H.; QIN, Y.; YOU, L.; LI, W.; LU, G.; CHAN, W. Y.; LEUNG, P. C. K.; ZHAO, S.; CHEN, Z. J. Palmitic acid causes insulin resistance in granulosa cells via activation of JNK. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 62, n. 4, p. 197-206, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1530/JME-18-0214>.