

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



TESE

**TEMPERATURA INTERNA E DESEMPENHO REPRODUTIVO DE
NOVILHAS E VACAS DE CORTE COM CRIA AO PÉ SUPLEMENTADAS
COM METIONINA PROTEGIDA**

José Henrique Echenique Dominguez

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D671t Dominguez, Jose Henrique Echenique

Temperatura interna e desempenho reprodutivo de novilhas e vacas de corte com cria ao pé suplementadas com metionina protegida / Jose Henrique Echenique Dominguez ; Francisco Augusto Burket Del Pino, orientador ; Eduardo Schimitt, coorientador. — Pelotas, 2019.

66 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Amino ácidos. 2. Bovinos de corte. 3. IATF. 4. Reprodução. 5. Termorregulação. I. Pino, Francisco Augusto Burket Del, orient. II. Schimitt, Eduardo, coorient. III. Título.

CDD : 636.213

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

José Henrique Echenique Dominguez

**Temperatura interna e desempenho reprodutivo em novilhas e vacas de corte
com cria ao pé suplementadas com metionina protegida**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Produção Animal)

Orientador: Francisco Augusto Burket Del Pino

Coorientador: Eduardo Schmitt

Pelotas, 2019

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 20 de fevereiro de 2019

Banca examinadora:

Dr. Francisco Augusto Burket Del Pino – Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (presidente da banca).

Dr. Eduardo Schmitt – Doutor em Medicina Veterinária pela Faculdade de Veterinária- Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Mozer Manetti de Ávila – Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Thomaz Lucia Jr – Doutor em Medicina Veterinária pela University of Minnesota.

Dr. Cassio Cassal Brauner – Doutor em Zootecnia pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - Universidade Federal de Pelotas.

Agradecimentos

São muitos os agradecimentos que se tornam necessários neste momento:

- Primeiramente, ao meu orientador prof. Francisco Del Pino, pela oportunidade de ser seu orientado e ao auxílio prestado durante todo o doutorado.
- Ao prof. Eduardo Schmitt, pelo apoio e ajuda durante todas as etapas deste doutorado, desde a elaboração do projeto até a condução dos experimentos a campo e as posteriores análises dos resultados.
- Aos meus colegas Ederson, Matheus, Jorge, Evandro, Larissa, Jessica, Leonardo, Murilo, Lueli e Fabrício, que participaram dos projetos a campo, assim como a todos os membros do NUPEEC que auxiliaram de uma forma ou outra.
- Aos proprietários da Estância Amaricá, município de São Gabriel, e da Agropecuária Arroio Grande, município de Arroio Grande, as quais, abriram as portas para nós e possibilitaram a realização dos experimentos a campo; e às equipes de campo destes dois estabelecimentos, que sempre foram muito prestativas durante as “lidas” na mangueira.
- As empresas Adiseo e Brasão do Pampa que forneceram os produtos para a realização deste trabalho e à CAPES como fonte financiadora da pesquisa.
- À minha família, um agradecimento especial, pelo apoio demonstrado a esta escolha pessoal, principalmente ao meu pai.
- A todos deixo o meu muito obrigado pelo companheirismo e pela convivência, durante este período de estudo e trabalho, que não se sintam excluídos nem esquecidos.

“.....la práctica no se enseña sino que se aprende por experiencia.”

Engº Agrônomo Milton Carambula

Resumo

DOMINGUEZ, José Henrique Echenique **Temperatura interna e desempenho reprodutivo em novilhas e vacas de corte com cria ao pé suplementadas com metionina protegida** 2019. 66p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

A presente tese é composta por dois artigos e tem por objetivo avaliar a influência do fornecimento do aminoácido essencial metionina protegido da degradação rumenal para vacas de corte com cria ao pé e novilhas, criadas sob regime alimentar de pastagens naturais, durante a estação reprodutiva, e mensurar seu efeito sobre a temperatura interna destes animais e o seu desempenho reprodutivo. A metionina é um dos primeiros aminoácidos a apresentar deficiência em animais alimentados exclusivamente a pasto. No primeiro artigo, avaliou-se as novilhas de 2 anos de idade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos. Os parâmetros avaliados foram: ganho de peso e ganho médio diário, a temperatura interna dos animais, o crescimento folicular e a taxa de prenhez. Avaliou-se, também, nas novilhas, as perdas embrionárias no começo da gestação através da realização de dois exames de diagnóstico de gestação, aos 30 e 60 dias após a inseminação artificial. Os grupos foram divididos de acordo com o peso e escore de condição corporal. Ao longo do dia, foi encontrada temperatura interna menor nas novilhas tratadas com metionina, durante o período da sincronização da ovulação ($38,77^{\circ}\text{C}$ x $38,99^{\circ}\text{C}$ $P \leq 0,0001$); o diâmetro dos folículos também foi maior no grupo tratado ($11,6\text{ mm}$ x $10,8\text{ mm}$; $P=0,06$), embora não significando aumento na prenhez da inseminação artificial e perdas embrionárias. O peso vivo final e o ganho médio diário também foram maiores no grupo que recebeu a suplementação com metionina ($398,5\text{ kg}$ x $389,2\text{ kg}$; GMD- $0,706\text{ kg/dia}$ GM e $0,637\text{ kg/dia}$ GC). Houve diferença de ganho de peso nas pesagens realizadas com temperaturas ambientais maiores. Os resultados obtidos permitem sugerir o uso deste tipo de suplementação durante a época reprodutiva, quando as pastagens não conseguem suprir todas as exigências nutricionais das categorias em questão. No segundo experimento, trabalhou-se com vacas adultas, com terneiros de 30 - 60 dias de idade, fazendo-se as mesmas avaliações. Foi encontrada uma temperatura interna menor nas vacas tratadas com metionina, durante o período da sincronização da ovulação ($38,73^{\circ}\text{C}$ x $38,85^{\circ}\text{C}$), principalmente no último dia do protocolo. O diâmetro folicular foi menor no D10 ($8,5\text{ mm}$ x $9,73\text{ mm}$), mas a taxa de prenhez não apresentou diferença estatística entre os grupos ($58,8\%$ x $59,6\%$ para o grupo metionina e controle, respectivamente). Os animais dos dois grupos perderam peso, devido às condições atmosféricas desfavoráveis que ocorreram no período, as quais acabaram influenciando para baixo o consumo da suplementação dos grupos.

Palavras -Chave :

Aminoácidos, bovinos de corte, IATF, reprodução, termorregulação

Abstract

DOMINGUEZ, José Henrique Echenique **Internal temperature and reproductive performance in heifers and cows with calves supplemented with protected methionine** 2019. 66p. Thesis (Doctorate) - Graduate Program in Animal Science. Federal University of Pelotas, Pelotas-RS

The present thesis is composed by two articles whose objective is to evaluate the influence of the supply of the essential amino acid methionine protected from the rumen degradation to cows with calves and heifers, raised under diet of natural pastures, during the reproductive season and to measure its effect on the internal temperature of these animals and their reproductive performance. Methionine is one of the first amino acids to be deficient in animals fed exclusively on grass. In the first article the 2-year-old heifers were evaluated. The experimental design was completely randomized, with two treatments. The evaluated parameters were weight gain and mean daily gain, the internal temperature of the animals, the follicular growth and the pregnancy rate. In the heifers, embryonic losses were evaluated at the beginning of gestation through two diagnostic tests at 30 and 60 days after artificial insemination. The groups were divided according to body weight and body condition score. An internal temperature was found throughout the day, lower in heifers treated with methionine during the period of ovulation synchronization (38.77°C x 38.99°C ; $P \leq 0.0001$), the diameter of the follicles was also higher in the treated group (11.6 mm x 10.8 mm ; $P = 0.06$), although this did not mean an increase in the pregnancy of artificial insemination and embryonic losses. The final live weight and mean daily gain were also higher in the methionine supplementation group (398.5 kg x 389.2 kg ; GMD 0.706 kg / day GM and 0.637 kg / day GC). There was a difference in weight gain in weighing performed at higher ambient temperatures. The results allow to suggest the use of this type of supplementation during the reproductive season, when pastures can not meet all the nutritional requirements of these categories. In the second experiment, we worked with adult cows, with calves from 30 - 60 days of age, if the same evaluations were done. A lower internal temperature was found in methionine-treated cows during the period of ovulation synchronization (38.73°C x 38.85°C), especially on the last day of the protocol, but the follicular diameter was lower in D10 (8.5 mm x 9.73 mm) in methionine-treated cows, but the pregnancy rate had no statistical difference between the groups (58.8% vs. 59.6% for the methionine and control groups, respectively). The animals of the two groups lost weight, due to the unfavorable atmospheric conditions that occurred in the period, which ended up influencing down consumption of the supplementation of the groups.

Key words:

Amino acids, cattle beef, FTAI, reproduction, thermoregulation

Lista de abreviaturas

°C	Graus Celsius
AGNE	Ácidos Graxos não Esterificados
BE	Benzoato de Estradiol
cab	Cabeças
DIV	Dispositivo Intra- vaginal
ECC	Estado de Condição Corporal
FSH	Hormônio Folículo estimulante
g	Gramas
GC	Grupo Controle
GM	Grupo Metionina
GMD	Ganho médio diário
Gnrh	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
ha	Hectares
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IM	Intra-muscular
kg	Quilogramas
LH	Hormônio Luteinizante
MHA	Metionina Hidroxi Análogo
mm	Milímetros
MS	Matéria Seca
NRC	Nutrient Requeriment of Beef Cattle
RPM	Metionina protegida da degradação ruminal
T °C	Temperatura Ambiente
THI	Índice de temperatura e umidade
UCP 1	Proteína Desaclopadora 1
ZTC	Zona de Conforto Térmico

Sumário

Introdução	13
Revisão Bibliográfica	14
Referências Bibliográficas	22
Artigo 1	26
Resumo	27
Introdução	29
Material e Métodos	30
Resultados	34
Discussão.....	36
Conclusão	38
Referências Bibliográficas	39
Artigo 2	48
Resumo	49
Introdução	51
Material e Métodos	52
Resultados	55
Discussão	56
Conclusão	58
Referências Bibliográficas	59
Considerações finais	66

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1	Cronograma das atividades realizadas	44
Figura 2	Ganho de peso das novilhas durante o período do experimento nos lotes sem suplementação (GC) e no lote suplementado com metionina (GM).....	44
Figura 3	Temperatura interna de novilhas com suplementação (GM) e sem suplementação com metionina (GC) durante os dias de um protocolo de sincronização de cio e o THI no mesmo período.....	45
Figura 4	Crescimento folicular das novilhas durante os dias D8-D9-D10 do protocolo de sincronização de cio com suplementação (GM) e sem suplementação de metionina (GC).....	45

Artigo 2

Figura 1	Cronograma das atividades realizadas.....	61
Figura 2	Temperatura interna das vacas suplementadas com metionina (GM) e sem metionina (GC) durante os dias de um protocolo de sincronização de cio e o THI no mesmo período	61
Figura 3	Crescimento folicular das vacas do grupo sem suplementação (GC) e suplementadas com metionina (GM) nos dias 8 e 10 de um protocolo de IATF	62
Figura 4	Taxa de crescimento folicular entre o GC e o GM durante D8 e D10 do protocolo de sincronização da ovulação.....	62
Figura 5	Evolução do peso vivo das vacas dos grupos sem suplementação (GC) e suplementadas com metionina (GM) durante o período experimental.....	63

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Resultado médio das análises bromatológicas das pastagens durante o período experimental e disponibilidade forrageira	46
Tabela 2	Níveis de garantia da composição do sal mineral utilizado.....	46
Tabela 3	Resultados da avaliação do sêmen utilizado para a IATF das novilhas durante o experimento.....	47
Tabela 4	Valores de THI mínimo, médio e máximo durante o período de sincronização do estro.....	47
Tabela 5	Taxa de prenhez das novilhas do Grupo Metionina e Grupo Controle aos 30 e aos 60 dias após IATF.....	47

Artigo 2

Tabela 1	Resultado médio das análises bromatológicas das pastagens durante o período experimental e disponibilidade forrageira	64
Tabela 2	Níveis de garantia da composição do sal mineral utilizado.....	64
Tabela 3	Consumo de sal mineral dos grupos Controle (GC) e Metionina (GM) durante o período do experimento (g/cabeça/dia)	65
Tabela 4	Taxa de prenhez aos 30 dias após a IATF.	65

Introdução

Radiação solar, umidade relativa do ar, temperatura e velocidade do vento são fatores climáticos e ambientais capazes de modular o comportamento e o metabolismo de animais de produção (DIKMEN et al, 2009). Estes fatores podem interferir na produção dos bovinos de corte, tanto por uma ação direta em mecanismos fisiológicos, como aumentando a predisposição a enfermidades secundárias ao estresse térmico, como problemas de casco, mastite, acidose rumenal, (BAUMGARD et al., 2011) e, também, indiretamente, aumentando a susceptibilidade a doenças pela diminuição da imunidade (BARBOSA et al., 2004). Durante os períodos de condições climáticas adversas, têm sido relatadas modificações no consumo de alimentos, alterações no ganho de peso devido a alterações fisiológicas do trato digestivo, equilíbrio ácido-básico e, ainda, nas concentrações hormonais (ARIAS et al., 2008), diminuição do consumo e, por consequência, do crescimento e ganho de peso em bovinos corte (ST-PIERRE et al., 2003; GAUGHAN et al., 2008). Estas alterações metabólicas também afetam a parte reprodutiva dos animais de produção, reduzindo a taxa de prenhez, viabilidade espermática entre outros (BIGGERS et al., 1987; COSTA E SILVA et al., 2010).

Nas últimas duas décadas, tem se pesquisado a existência de relação entre nutrição e fertilidade em ruminantes. Mudanças na dieta podem causar alterações, de forma rápida, em uma série de fatores humorais que provocam alterações em vias de sinalização endócrina e metabólica cruciais para a reprodução. Um dos aminoácidos que mais rapidamente se torna limitante para a produção e reprodução de bovinos criados exclusivamente no regime de pasto é a metionina (CLEMENTS et al., 2017). Atualmente, a suplementação com aminoácidos protegidos da degradação rumenal, principalmente o fornecimento de metionina e lisina, está sendo estudada como uma forma de prevenir ou minimizar os efeitos do estresse térmico na produção e reprodução de bovinos de corte. Porém, como os bovinos de corte são criados quase exclusivamente em regime extensivo, há muita dificuldade em se fazer avaliações mais precisas dos animais para quantificar estes mecanismos.

Em bovinos leiteiros, já é conhecido que o estresse térmico diminui a ingestão de matéria seca, o tempo de ruminação, além de atuar diretamente no metabolismo, modulando a partição de nutrientes para produção leiteira, qualidade e composição do leite, com impactos no crescimento corporal (BAUMGARD et al., 2014). No gado de

corte também acontecem os mesmos efeitos, porém a mensuração destas perdas é mais difícil devido à capacidade adaptativa de cada raça, já que cada uma possui grau diferente de adaptação ao calor (HAMMOND et al., 1998) e pelas condições extensivas em que são comumente criados estes animais. Observa-se também carência de estudos regionalizados que levem em consideração o manejo nutricional e sanitário adotado na região sul do Brasil.

No Rio Grande do Sul, as condições climáticas influenciam as pastagens e a estação reprodutiva dos rebanhos de corte é feita na época com mais disponibilidade de forragem, justamente a época em que são registradas as temperaturas ambientais mais altas (o fim da primavera e o verão). Como os bovinos criados nesta região são predominantemente de origem europeia e, segundo Pires et al. (1999), a faixa de conforto térmico para bovinos europeus varia entre 13-18°C e umidade do ar entre 50-80%, é muito fácil os bovinos estarem vulneráveis aos prejuízos causados pelo aumento da temperatura corporal, a qual pode influenciar negativamente os processos metabólicos que regulam as atividades produtivas e reprodutivas das fêmeas bovinas (FAYLON et al., 2015; SEJIAN et al., 2018).

Com este trabalho, buscou-se avaliar os efeitos da suplementação com metionina protegida sobre o desempenho reprodutivo de novilhas e vacas com cria ao pé.

Revisão bibliográfica

Sabe-se que o desempenho satisfatório dos bovinos é dependente de uma faixa de temperatura denominada zona de conforto térmico (ZTC), que corresponde a limites de temperatura (10 e 27°C) nos quais o animal encontra-se em homeostase, sem a necessidade de uso de artifícios termorreguladores. Quando os animais se encontram na ZTC, os custos fisiológicos são mínimos e a produtividade aumenta (SILVA, 2000).

Os fatores ambientais afetam de forma direta e indireta os animais, estando eles estabulados ou a céu aberto. Neste último caso, a elevada incidência de radiação solar, associada às altas temperaturas, pode gerar desconforto térmico e estresse por calor, conforme a tolerância do animal (ALVES, 2012). Do ponto de vista bioclimático, mesmo para animais cruzados, considerados tolerantes ao calor, podem ocorrer alterações comportamentais e fisiológicas (PEREIRA et al., 2008).

A dissipação do calor corporal para o meio ambiente é regulada por processos físicos, que podem ser divididos em dois grupos: métodos não evaporativos (condução, convecção e radiação) e métodos evaporativos (sudorese e frequência respiratória). Outras respostas dos animais para a dissipação de calor são as comportamentais (PEREIRA, 2005). O primeiro mecanismo acionado para ajuste da termorregulação é a vasodilatação periférica, dissipando o calor principalmente por radiação e convecção. O segundo é a termólise evaporativa que intensifica a sudação e a evaporação respiratória através da ofegação (VILELA et al., 2013). Como respostas comportamentais as vacas reduzem a ingestão de alimentos e sua movimentação, aumentam a ingestão de água, buscam por sombra, isolam-se de companheiras, estendem os membros a fim de aumentar a superfície de troca e relutam em montar umas nas outras, quando em cio (PIRES et al., 1999).

A hipertermia ocorre quando o fluxo de calor perdido para o ambiente é menor que o calor produzido pelo organismo. A susceptibilidade dos bovinos ao estresse calórico aumenta à medida que o binômio umidade relativa-temperatura ambiente ultrapassa a ZTC, o que dificulta a dissipação de calor para o ambiente, aumentando a temperatura corporal e provocando um efeito negativo sobre o desempenho animal (PIRES, 2006).

Um dos primeiros sinais apresentados por uma fêmea bovina submetida a uma situação de estresse térmico é a redução da ingesta de matéria seca, para diminuir a sua taxa metabólica e as reações exotérmicas (BROWN- BRANDL, 2018). Se a exposição a altas temperaturas do ar for prolongada, ocorre também um declínio na secreção de hormônios (hormônio do crescimento, catecolaminas e glicocorticoides). Estes eventos tendem a reduzir a produção de calor metabólico e podem ser responsáveis por modificações na função hepática, no metabolismo energético, proteico e de lipídeos (NARDONE et al., 2010) na tentativa de manter o equilíbrio térmico.

Uma rota normal para suprir as deficiências provocadas pela redução da ingesta seria a utilização das reservas do tecido adiposo, via mobilização de ácidos graxos não esterificados (AGNE), porém, em vacas em estresse térmico, esta não é a via principal para produção de energia (BAUMGARD et al., 2013).

Em estudos com vacas estressadas termicamente e outras em termo neutralidade (*pair feeding*), Baumgard et al. (2013) comprovaram tal situação, pois as vacas em termo neutralidade apresentavam maior índice sérico de AGNE, mesmo com redução da ingestão de matéria seca. Vacas estressadas pelo calor têm um metabolismo pós-

absortivo alterado, se compararmos com vacas em situações de termo neutralidade. Mesmo quando ambos os grupos apresentam um estágio energético negativo, a redução da circulação de AGNE encontrada em vacas estressadas termicamente é explicada, em parte, pelo aumento dos níveis séricos de insulina que é um potente antilipolítico. A não utilização dos AGNE do tecido adiposo é uma estratégia dos bovinos para minimizar a produção de calor metabólico (WHEELLOCK et al., 2010). Muitas vezes, porém, este bloqueio também é responsável pela hipoglicemia induzida pelo calor, frequentemente relatada em vários modelos de estresse térmicos (BAUMGARD et al., 2014), alterando a prioridade de utilização da glicose pelos tecidos.

Uma vaca em estresse calórico sofre mudanças fisiológicas na sua circulação sanguínea, a qual é alterada devido à vasodilatação periférica. Nesta situação há um redirecionamento do fluxo sanguíneo para a circulação da periferia a fim de realizar as trocas de calor e baixar a temperatura corporal (WAKAIO et al., 2015). A menor vascularização dos órgãos genitais, associada a outros fatores da situação de estresse, como aumento da produção de cortisol, vai provocar uma interferência sobre o crescimento folicular (MACEDO et al., 2012). Esta situação afeta o crescimento do pool de pequenos folículos antrais, reduz o tamanho dos folículos dominantes nas ondas foliculares e a duração do período de emergência (ROTH, 2015). Uma menor duração da dominância do folículo pré-ovulatório está negativamente associada com a taxa de concepção e interfere diretamente na qualidade oocitária, bem como na manifestação do estro (CASTAÑO et al., 2014; SCHULLER et al., 2014), na sobrevivência embrionária, principalmente em consequência da diminuição do corpo lúteo, na interferência na síntese de proteínas pelo embrião e na redução na produção de *interferon-tau*, o que vai dificultar o reconhecimento materno e a nutrição do conceito durante este período (GARCÍA-ISPIERTO et al., 2007). Tais alterações estão relacionadas com perdas embrionárias precoces, influenciadas pela ação dos fatores climáticos no período de sete dias antes até três dias após a inseminação artificial.

A temperatura corporal mais elevada pode influenciar os processos metabólicos que regulam as atividades reprodutivas das vacas. Em um estudo conduzido por Biggers et al., (1987), conseguiu-se determinar o efeito do estresse térmico, em vacas Hereford e Hereford x Angus no desenvolvimento embrionário precoce e sua posterior sobrevivência. Foram encontrados embriões com significativa redução de peso e tamanho e menor taxa de prenhez em vacas que sofrem estresse térmico, do que nas vacas do grupo controle que não passaram por este estresse.

Uma das formas utilizadas pelos pesquisadores para quantificar a ação dos agentes climáticos sobre os animais de produção é a utilização do índice de temperatura e umidade (THI). Este índice, desenvolvido por Thom et al. (1958) para humanos foi, posteriormente, adaptado para bovinos por outros pesquisadores. O THI relaciona a temperatura ambiente e a umidade do ar juntamente com constantes matemáticas, formando 4 faixas que definem os níveis de estresse térmico: a) normal, THI menor que 74; b) alerta, THI de 74 – 79; c) perigo, THI de 80- 84; d) emergência, THI maior que 84 (BROWN- BRANDL, 2018). Quanto maior este valor, maior será a situação de estresse térmico a que o animal está sujeito.

Os efeitos negativos do estresse térmico sobre a reprodução já aparecem em THI próximos de 73 e os dias que antecedem ao serviço são os mais críticos. A exposição de uma fêmea, por no mínimo uma hora, a um THI igual a 73 ou mais no dia da inseminação ou monta natural já aumenta o risco de não concepção em cinco pontos percentuais (SCHULLER et al., 2014). Um índice THI maior que 80, no dia três antes da inseminação artificial, diminuiu a concepção de 30,6% para 23% (GARCÍA-ISPIERTO et al., 2007).

A exposição de vacas Gir ao estresse térmico ocasionou um efeito deletério no crescimento folicular ovariano, nas concentrações hormonais e na competência do oócito, comprovando os efeitos danosos que tal exposição em longo prazo pode provocar em bovinos *Bos taurus indicus* (TORRES JUNIOR et al., 2008). Neste trabalho de Torres Junior et al.(2008), as vacas expostas a esta situação tiveram períodos mais longos de atividade não-cíclica (Progesterona <1 ng /mL), além de ciclos estrais mais curtos. Embora o estresse térmico não tivesse efeito significativo na taxa de clivagem dos embriões, reduziu o desenvolvimento de blastocisto depois que os animais passaram por condições controladas de estresse calórico e posteriormente foram soltos no campo, de onde vinham para a aspiração folicular uma vez por semana.

Uma comparação entre vacas da raça Holandês puras e vacas F1 Holandês x Gir, feita por Alves et al.(2014), apresentou resultados desfavoráveis nos animais cruzados, na época do verão, obtendo um número menor de oócitos viáveis, aos 30, 60 e 90 dias pós-parto, nesta estação do que no inverno. Neste sentido, estudos demonstraram que os fatores ambientais podem interferir no desenvolvimento embrionário entre o 4º e o 8º dia pós-concepção, quando ocorrem os processos de diferenciação e proliferação celular (TAKAHASHI, 2011).

Muitos dos efeitos do estresse térmico identificados em gado de leite, também estão presentes em gado de corte, embora em menor grau, devido à menor produção de calor corporal, mesmo que a época tradicional de reprodução das fêmeas de corte no Sul do Brasil seja a que apresenta temperaturas ambientais mais altas (primavera – verão).

De acordo com os estudos de Baumgard et al.(2013), as alterações nas rotas metabólicas, em animais estressados termicamente, que passam a utilizar a rota da proteólise para fornecimento de energia, em vez da lipólise, abriu a possibilidade para introdução de novos elementos nas dietas destes animais que tendem a auxiliar tal fornecimento de energia. A metionina é um aminoácido essencial, envolvido em muitas rotas metabólicas, incluindo a síntese de fosfolipídios, carnitina, creatina e poliaminas (BEQUETTE et al., 1998). Além de ser usada para a síntese de proteínas, a metionina pode fornecer grupamentos metil para diferentes reações e oferecer grupamentos de enxofre para a síntese de cistina.

De acordo com o NRC de 2001 para bovinos de corte, a exigência de metionina para a manutenção de vacas com cria ao pé de 500 kg, criadas em campo nativo, com 10% de proteína bruta, é de 24 g/dia. Bovinos em pastejo obtêm a maior parte de seus requerimentos a partir da proteína microbiana do rúmen, todavia pode ser necessária a suplementação destes animais. Normalmente, o primeiro aminoácido limitante na produção de bovinos, tanto de corte, como de leite, é a metionina, em especial quando os aminoácidos têm como fonte predominante a proteína microbiana absorvida no intestino delgado e algumas evidências, sugerem que há um aumento no requerimento de metionina para vacas gestantes (CLEMENTS et al., 2017).

Um dos métodos utilizados para suplementar metionina para ruminantes é protegê-la da absorção rumenal, permitindo assim que seja absorvida diretamente pelo intestino delgado. Suplementos de metionina estão disponíveis em várias formas, porém fontes de aminoácidos livres são mais caras. As formas protegidas da degradação rumenal, com revestimento físico de lipídeos e polímeros pH-sensíveis ou formas análogas ligadas a grupos hidroxila ou isopropanol, são bem efetivas (CLEMENTS et al., 2017). Os produtos que são protegidos da degradação rumenal apresentam em sua superfície compostos que, em contato com o pH ácido do abomaso, vão liberar a metionina para ser absorvida no intestino delgado. Existem no mercado produtos com diferentes níveis de proteção da degradação rumenal.

Pesquisadores buscam relacionar os efeitos da suplementação de metionina, na forma protegida da degradação rumenal (RPM – *Rumem Protected Methionine*), em fêmeas bovinas, através de vários parâmetros reprodutivos como: taxa de ovulação, tamanho de folículos ovarianos, taxa de prenhez, entre outras. Fuquay (1975) encontrou tendência de aumento da concepção ao primeiro serviço, em vacas leiteiras suplementadas com 25g de metionina/dia no início da lactação. Polan (1991) e Bobe (1997) observaram que a suplementação com RPM não alterou o número de serviços por concepção e o intervalo entre partos, em vacas leiteiras.

Alonso et al. (2008) avaliando os efeitos da suplementação de metionina, uréia e melaço na dinâmica ovariana em novilhas (*Bos taurus x Bos indicus*), encontraram maior porcentagem de folículos ovarianos maiores que 9 mm no grupo suplementado comparado ao grupo controle (26,7% x 6,4%), durante o período de suplementação. Após o final da suplementação, a porcentagem de fêmeas com folículos maiores que 9 mm foi de 60% x 18,8% no grupo suplementado e no controle, respectivamente. A porcentagem de ovulação, após o período de sincronização, foi de 86,7%, no grupo suplementado e 62,5%, no grupo controle.

Titi et al. (2013) não encontraram diferenças na taxa de prenhez, no número médio de serviços e no intervalo entre partos em vacas primíparas que receberam suplementação de RPM. Em contraste, Ardalan et al. (2010), que avaliaram os efeitos da suplementação de metionina e colina, ambas na forma protegida da degradação rumenal, sobre o desempenho reprodutivo de vacas holandesas, encontraram diferença significativa na taxa de serviço/concepção (3 serviços/concepção para o grupo controle e 2,2 e 2,4 serviços/concepção para os grupos tratamentos) e no intervalo parto-concepção (115,4 x 88,6 e 106,6 dias para o controle e para os tratamentos com metionina e colina, respectivamente).

No começo da fase de alongamento do embrião dentro do útero, ocorrem modificações nas concentrações dos aminoácidos no histotrofo. As maiores variações das concentrações de aminoácidos (10 vezes mais, em média) são observadas na metionina, na histidina e na lisina no lúmen do útero de ovelhas prenhes, comparadas com as não prenhes (GAO et al., 2009).

Um dos benefícios da metionina, relacionados à reprodução, aparece nos primeiros dias de implantação embrionária no ambiente uterino através do histotrofo, produzido por glândulas endometriais, que vai fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento do conceito até a sua placentação (WILT BANK et al., 2017).

Uma das hipóteses que explica a associação entre metionina e melhor desempenho reprodutivo, propõe que o referido aminoácido exerce efeito sobre embriões pré-implantados. Acosta et al. (2016) verificaram aumento no acúmulo de lipídeos nos embriões de vacas que receberam a suplementação de metionina na dieta. Neste estudo, os pesquisadores encontraram maior expressão do gene LOC510193 (Apolipoproteína L, 3-like), envolvido no transporte e metabolismo de lipídios. Tal aumento pode ser explicado pelo fato de a suplementação com metionina estimular a retirada de triacilglicerol do fígado, aumentando os níveis de ácidos graxos na corrente sanguínea (MARTINOV et al., 2010). Assim, o maior acúmulo de lipídios no interior de embriões pode ser benéfico para o aumento da sua capacidade de sobrevivência.

A suplementação de metionina em uma formulação que impossibilite a degradação pela microbiota ruminal aumenta sua biodisponibilidade (GRAULET et al., 2005). Com uma maior disponibilidade deste aminoácido, ele poderá ser convertido a S-adenosil-L-metionina (SAM), molécula biológica de maior relevância em doação de grupamentos metil, essencial para o mecanismo de metilação do DNA e regulação da expressão gênica (MARTINOV et al., 2010). A metilação de regiões do DNA é uma das modificações epigenéticas envolvidas na regulação da expressão gênica que podem afetar o desempenho animal (OSÓRIO et al., 2016). Este processo, por sua vez, é um importante mecanismo para a regulação da expressão ou silenciamento de genes.

Peñagaricano et al. (2013) investigaram as influências genômicas da suplementação com metionina, através da recuperação de embriões de alta qualidade provenientes de vacas suplementadas ou não com metionina protegida da degradação ruminal. Um total de 276 genes foi expresso com diferenças significativas em embriões de vacas suplementadas com metionina (RPM). O marcado silenciamento da grande maioria dos genes é explicado pelo autor como uma resposta esperada, visto a correlação direta entre o incremento nas concentrações de metionina e o aumento da metilação do DNA. Mudanças na expressão de genes causadas por tais alterações podem causar morte ou defeitos no desenvolvimento embrionário, bem como afetá-lo de maneira positiva, na fase de pré-implantação (ACOSTA et al., 2016).

A suplementação de metionina pode melhorar o crescimento dos animais, conforme Gomez et al. (2010), os quais encontraram peso final maior em novilhas que receberam a suplementação com metionina em comparação ao grupo controle. Além disso, foi observada maior ingestão de matéria seca, bem como melhora na conversão alimentar nos animais que receberam a suplementação.

O manejo alimentar de vacas antes e depois do parto é um ponto-chave para permitir um desempenho ideal, tanto na produção de leite, quanto na reprodução subsequente. Uma subnutrição energética e proteica no final da gestação e durante a lactação pode resultar em períodos de anestro mais longos e em decréscimo na fertilidade de vacas de corte (DIAS et al., 2010). Várias barreiras têm que ser vencidas para que uma vaca em amamentação entre novamente em cio e possa emprenhar outra vez. Uma delas é o reflexo da mamada (ou a ordenha em vacas leiteiras) que tem efeito sobre o retorno da ciclicidade após o parto, em vacas de corte. A relação entre a mãe e sua cria pode desencadear um processo neuroendócrino que atrasa o retorno ao estro na maioria das fêmeas (SANTOS et al., 2003). Estes fatores provocam uma inibição do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, impedindo a liberação dos hormônios GnRH, FSH e LH e/ou uma resposta negativa dos folículos nos ovários (YAVAS et al., 2000).

A oferta de forragem e sua qualidade também vão interferir, aumentando ou diminuindo o anestro pós-parto das vacas com cria ao pé, uma vez que a sua demanda metabólica é maior do que em novilhas ou vacas solteiras que serão colocadas em reprodução, pois vacas com cria necessitam mais energia para a produção de leite. O nível de proteína na pastagem influencia diretamente a resposta animal, sendo que níveis abaixo de 7% de proteína já afetam negativamente a microbiota rumenal, comprometendo seu desenvolvimento e o desempenho animal. Outros fatores como raça, idade, número de partos, produção de leite e partos distócicos podem aumentar a duração do anestro pós-parto (MONTIEL, 2005).

Existem poucos estudos sobre os benefícios da suplementação estratégica com metionina em relação à reprodução e a termorregulação em vacas e novilhas de corte (CLEMENTS et al, 2017), criadas sobre regime alimentar a pasto, o que permite várias oportunidades para o desenvolvimento de novos projetos experimentais.

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da suplementação com metionina protegida durante períodos de alta temperatura e umidade sobre a taxa de concepção, prenhez, perdas embrionárias e a temperatura interna de novilhas e vacas de corte com crias ao pé.

Referências Bibliográficas

- ACOSTA, D.A.V. et al. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on the preimplantation embryo in Holstein cows. **Theriogenology** v. 85, n. 9, p. 1669-1679, 2016.
- ALONSO, L. et al. Effect of ruminally protected Methionine on the productive and reproductive performance of grazing Bos indicus heifers raised in the humid tropics of Costa Rica. **Tropical Animal Health And Production** v. 40, n. 8, p. 667-672, 2008.
- ALVES, B.G. et al. Ovarian activity and oocyte quality associated with the biochemical profile of serum and follicular fluid from Girolando dairy cows postpartum **Animal Reproduction Science** v.146, p. 117-125, 2014.
- ALVES, F.V. O componente animal em sistemas de produção em integração. In: Bungenstab D.J. Sistemas de Integração lavoura-pecuária-floresta: a produção sustentável. **Embrapa 2 ed**, p. 143-154, 2012.
- ARDALAN, M. et al. Effect of rumen-protected choline and methionine on physiological and metabolic disorders and reproductive indices of dairy cows **Journal Animal Physiology Animal Nutrition** (Berl) v.94, p. 259-265, 2010.
- ARIAS, R.A. et al. Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne e leche **Archivos de Medicina Veterinaria** v.40, p. 7-22, 2008.
- BARBOSA, O. R. et al. Efeitos da sombra e da aspersão de água na produção de leite de vacas da raça Holandesa durante o verão. **Acta Scientiarum Animal Sciences** v.26, n. 01, p. 115-122, 2004.
- BAUMGARD, L.H. et al. Post absorptive carbohydrate adaptations to heat stress and monensin supplementation in lactating Holstein cows **Journal of Dairy Science** v. 94, p. 5620–5633, 2011.
- BAUMGARD, L.H. et al. Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics **Annual Review Animal Biosciences** v1, p. 311–337, 2013.
- BAUMGARD, L.H. et al. Feeding and Managing cows to minimize heat stress **Tri-State Dairy Nutrition Conference** p. 63-74, 2014.
- BEQUETTE, B.B.J., et al Current concepto of amino acid and protein in the mammary gland of the lactating ruminant. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n.9, p. 2540- 2559, 1998.
- BIGGERS, B.G., et al. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. **Journal of Animal Science** v.64, p. 1512 -1518, 1987.

- BOBE. G Effects of dietary supplementation with protected methionine on reproductive efficiency of dairy cows. **Dairy Report**-Iowa State University, 1997
- BROWN-BRAND, T.M. Understanding heat stress in beef cattle **Revista Brasileira de Zootecnia** v.47, e20160414, 2018.
- CASTAÑO, F.A. et al. Impacto del estrés calórico sobre la actividad reproductiva em bovinos y consideraciones para mitigar sus efectos sobre la reproduccion **Revista Biosalud** v.13,n.2, p. 84-94, 2014.
- CLEMENTS, A.R. et al. Effects of supplementing methionine hydroxy analog on beef cow performance, milk production, reproduction, and preweaning calf performance **Journal of Dairy Science** v 95, p. 5597–5605, 2017.
- COSTA E SILVA, E. V. et al. Efeito do manejo e de variáveis bioclimáticas sobre a taxa de gestação em vacas receptoras de embriões. **Ciência Animal Brasileira** v.11, n. 02, p. 280-291, 2010.
- DIAS, J.C. et al. Alguns aspectos da interação nutrição-reprodução em bovinos: energia, proteína, minerais e vitaminas **PUBVET** v. 4, n. 5, Ed. 110, Art. 738, 2010.
- DIKMEN, S. et al. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment **Journal of Dairy Science** v. 92, p. 109-116, 2009.
- FAYLON, M.P. et al. Effects of acute heat stress on lipid metabolism of bovine primary adipocytes **Journal of Dairy Science** v 98, p. 8732–8740, 2015.
- FUQUAY J. et al. Effect of methionine hydroxyl analog on postpartum interval and reproductive efficiency in dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 58, p. 139, 1975.
- GARCÍA-ISPIERTO, I. et al. Climate factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeaster Spain. **Theriogenology** v. 67, p. 1379- 1385, 2007.
- GAO H. et al. Select nutrientes in the ovine uterine lumen. In Amino acids, glucose and ions in uterine lumenal flushing of cyclic and pregnant ewes **Biology of Reproduction** v.80, p.86-93, 2009.
- GAUGHAN, J.B. et al. A new heat load index for feedlot cattle. **Journal of Animal Science** v. 86, p. 226-234, 2008.
- GRAULET, B. et al. Methionine availability in plasma of dairy cows supplemented with methionine hydroxy analog isopropyl ester. **Journal of Dairy Science**, v.88, n. 10, p. 3640-3649, 2005.

- GOMEZ, A. et al. Effect of supplementation with urea, blood meal, and rumen-protected methionine on growth performance of Holstein heifers grazing kikuyu pasture. **Tropical Animal Health And Production** v. 43, n. 3, p. 721-724, 2010.
- HAMMOND, A. C. et al. Heat tolerance in Tuli, Senepol and Brahmansired F1 Angus heifers in Florida. **Journal of Animal Science** v. 76, p. 1568 –1577. 1998.
- MACEDO, G.G. et al. Efeito do estresse na eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.1, p.10-17, 2012.
- MARTINOV, M.V. et al. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1804, p. 89-96, 2010.
- MONTIEL, F. et al. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review **Animal Reproduction Science** v.85, p. 1–26, 2005.
- NARDONE, A. et al. Effects of climates changes on animal production and sustainability of livestock systems **Livestock Science** v.130, p. 57-69, 2010.
- NRC Nutrient requirements of beef cattle 7th rev. ed. **National Academies Press**, Washington, DC, 2001.
- OSÓRIO, J.C. et al., Hepatic global DNA and peroxisome proliferator-activated receptor alpha promoter methylation are altered in peripartal dairy cows fed rumen-protected methionine **Journal of Dairy Science** v.99 p. 234-244, 2016.
- PEÑAGARICANO, F. et al. Effect of maternal methionine supplementation on the transcriptome of bovine preimplantation embryos. **PLOS ONE** v. 8, n. 8, p. 72302, 2013.
- PEREIRA, A.M.F. et al. Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. **International Journal Biometeorology**, v.52, p. 199-208, 2008.
- PEREIRA, C.C.J. Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal. Belo Horizonte: **FEPMVZ**. p. 195, 2005.
- PIRES, M.F.A et at. Estresse calórico em Bovinos de Leite. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia** n. 29, p. 23-37, 1999.
- PIRES, M. F. A. Manejo nutricional para evitar o estresse calórico, EMBRAPA Juiz de Fora, **Comunicado Técnico 52**, p. 1- 4, 2006.
- POLAN, C.E. et al. Response of Dairy Cows to Supplemental Rumen-Protected Forms of Methionine and Lysine. **Journal of Dairy Science** v.74, p. 2997-3013, 1991.

- ROTH, Z. Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function **Journal of Animal Science** v.93, p. 2034–2044, 2015.
- SANTOS, F.D. et al. Influência do bezerro na duração do anestro em vacas de corte. **Ciências Agrárias Saúde** Andradina, v.3, n.2: 48-53, 2003.
- SCHÜLLER, L.K. et al. Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature–humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices **Theriogenology** v.81, p. 1050–1057, 2014.
- SEJIAN, V. et al. Review: Adaptation of animals to heat stress **Animal** p.1-14 2018 doi:10.1017/S1751731118001945.
- SILVA, R.G. Introdução à bioclimatologia animal Ed. Nobel. São Paulo. p. 286, 2000.
- ST-PIERRE, N.R., et al. Economic losses from heat stress by US Livestock Industries **Journal of Dairy Science** v.86. (E.Suppl.) p. 52–77, 2003.
- TAKAHASHI, M. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals **Reproductive Medicine and Biology** v.11, p. 37-47, 2011.
- THOM, E.C. Cooling degrees - days air conditioning, heating, and ventilating. Transactions of the ASAE, v.55, n.7, p.65-72, 1958.
- TITI, H. H. et al. Effect of protected methionine supplementation on milk production and reproduction in first calf heifers. **Archives Tierzucht** v. 22, n. 56, p.225-236, 2013.
- TORRES-JUNIOR, J.R. S. M. et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in Bos indicus cattle **Theriogenology** v. 69, p.155–166, 2008.
- VILELA, R.A. et al. Respostas fisiológicas e comportamentais de vacas Holandesas mantidas em sistema adiabático evaporativo **Pesquisa Veterinária Brasileira** vol.33, n.11, p. 1379-1384 , 2013.
- WAKAIO, B.U. et al. Review on mechanisms of dairy summer infertility and implications for hormonal intervention **Open Veterinary Journal** v.5,n.1, p.6-10, 2015.
- WILTBANK, M.C. et al. Momento y causa de perdidas fisiológicas de la preñez (no relacionada con enfermedad) em vacas lecheras lactantes y receptoras de embriones In **Anais 12º Simposio Internacional de Reproduccion Animal** p. 73-102, Córdoba, 2017.
- WHEELLOCK, J. B. et al. Effects of heat stress on energetic metabolismo in lactating holstein cows. **Journal Dairy Science** v. 93, p. 644–655, 2010.
- YAVAS, Y. et al. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review **Theriogenology** v. 54, p. 25-55, 2000.

ARTIGO 1

TEMPERATURA INTERNA E DESEMPENHO REPRODUTIVO DE NOVILHAS DE CORTE SUPLEMENTADAS COM METIONINA PROTEGIDA DURANTE A ESTAÇÃO REPRODUTIVA

Artigo formatado para ser submetido ao Journal of Animal Science

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho reprodutivo e a temperatura interna de novilhas de corte suplementadas com metionina protegida em um sistema extensivo de pastejo, acasaladas durante o verão. Foram utilizadas 100 novilhas da raça Brangus entre 16 e 18 meses de idade, com peso vivo médio de 304 kg, distribuídas uniformemente em dois grupos alocados em piquetes com pastagem de campo nativo, com mesma disponibilidade de forragem (785,45 MS/ha), diferindo apenas quanto ao tipo de suplementação mineral. O grupo controle (n=48, GC) recebeu uma suplementação de sal mineral *ad libitum*, enquanto o grupo metionina (n=52, GM) recebeu a mesma suplementação, com acréscimo de 4g de metionina para cada 100g de sal mineral. Foram realizadas pesagens periódicas e, após 45 dias de suplementação, as novilhas foram submetidos a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. No dia 0 do protocolo, foram acoplados aos implantes de progesterona, termômetros *data logger* em 10 animais de cada grupo, os quais registraram a temperatura interna dos animais a cada 30 minutos. No D8, D9 e D10 do protocolo de IATF, estes animais foram submetidos a um exame ginecológico através de ultrassonografia, para mensurar o tamanho do folículo dominante. Entre os dias 17 e 23 após a IATF, foi observado o estro e inseminadas as novilhas identificadas em cio; após este período, foram incorporados dois touros por lote, durante um período de 60 dias. O diagnóstico de gestação foi realizado nos dias 30, 60 e 90 após a IATF, para avaliação das taxas de concepção, prenhez e perdas embrionárias. O consumo médio da suplementação mineral em ambos os grupos foi de 100 g/cab/dia. O GM teve maior peso nos dias 56 e 98 (365,9x 46,7 e 384,8 x 371,5 kg; $P < 0,03$). Durante a IATF, o GM apresentou menor temperatura interna (38,77x 38,99°C) e folículos dominantes maiores que o GC (11,76 mm x 10,8 mm; $P = 0,06$). As taxas de concepção, prenhez e perda embrionária não diferiram entre os grupos. Apesar de não influenciar o desempenho reprodutivo, o aumento no ganho de peso, o tamanho do folículo dominante e a redução na temperatura interna durante protocolos de IATF, demonstram potenciais benefícios da suplementação de metionina protegida em novilhas de corte acasaladas em períodos de altas temperaturas e umidade.

Palavras – Chave

Aminoácidos, bovinos de corte, IATF , reprodução, termorregulação

Abstract

The objective of this study was to evaluate the reproductive performance and internal temperature of beef heifers supplemented with protected methionine in an extensive grazing system, mated in periods of high temperature and humidity. 100 Brangus heifers aged 16 to 18 months, with a mean live weight of 304 kg, were distributed evenly in two groups allocated to pickets with native field pasture, with the same forage availability (785.45 MS / ha) , differing only in type of mineral supplementation. The control group (n = 48, GC) received a mineral salt supplementation ad libitum, while the methionine group (n = 52, GM) received the same supplementation, with an increase of 4 g of methionine per 100 g of mineral salt. All animals were weighed at intervals of 30 days and, after 45 days of supplementation, were submitted to a protocol of time fixed artificial insemination. At day 0 of the protocol, data logger thermometers were coupled to progesterone implants in 10 animals of each group, which recorded the internal temperature of the animals every 30 minutes. At D8, D9 and D10 of the TFAI protocol, these animals underwent gynecological examination by ultrasound to measure the size of the dominant follicle. Between days 17 and 23 after TFAI, all the animals underwent a transfer of artificial insemination with estrus observation and, after this period, two bulls were incorporated per lot, with biweekly exchanges of these animals between the groups, during a period of 60 days. The gestation diagnosis was performed on days 30, 60 and 90 after the TFAI to evaluate conception rates, pregnancy and embryo losses. The mean intake of mineral supplementation in both groups was 100 g / hr / day. GM had greater weight on days 56 (365.9 x 346.7 kg) and 98 (384.8 x 371.5 kg P <0.03). During TFAI, GM presented a lower internal temperature (38.77 x 38.99 ° C) and dominant follicles larger than GC (11.76 mm x 10.8 mm; P = 0.063). The rates of conception, pregnancy and embryonic loss did not differ between groups. Although not influencing reproductive performance, increased weight gain, dominant follicle size, and reduced internal temperature during TFAI protocols demonstrate potential benefits of protected methionine supplementation in mated cutting heifers in periods of high temperatures and moisture.

Keywords

Amino acids, beef cattle, TFAI, reproduction, thermoregulation

Introdução

As grandes regiões produtoras de carne e de leite no mundo se localizam em climas tropicais e subtropicais caracterizadas por grandes amplitudes térmicas, o que garante um constante desafio na termorregulação dos animais com o aumento da produtividade. Os prejuízos causados pelo estresse térmico nos aspectos reprodutivos e produtivos vêm sendo amplamente discutidos (ARIAS et al., 2008; KEY et al., 2014; WILTBLANCK et al., 2017), tanto na ação direta nos tecidos, como nas alterações sistêmicas geradas pela redução da ingestão de matéria seca, com a alteração de todos os processos metabólicos, resultando em baixa produção e desempenho (BAUMGARD et al., 2014).

Em bovinos de corte, os efeitos do estresse térmico sobre fêmeas em reprodução têm sido menos estudados (CLEMENTS et al., 2017), porém já é conhecido que o aumento da temperatura corporal pode afetar a qualidade dos oócitos, o tamanho dos folículos (CASTAÑO et al., 2014), assim como a taxa de sobrevivência embrionária, devido ao comprometimento da função endometrial e sua atividade secretora (SCHULLER et al., 2014; SCHULLER et al., 2017).

Os bovinos submetidos a estresse térmico sofrem alterações nos mecanismos termoregulatórios para promover a perda de calor corporal, afetando as respostas metabólicas e hormonais, bem como alterando a utilização de substratos, procurando uma rota metabólica que produza menos calor (FAYLON et al., 2015). As concentrações circulantes de AGNE são reduzidas durante o estresse térmico, mesmo com a presença de hormônios de estresse elevados, como epinefrina, glucagon e cortisol, que são potentes agentes lipolíticos (ZHAO et al., 2018). Dados *in vivo* indicam que vacas em lactação que sofrem estresse térmico têm uma resposta lipolítica diminuída e mudanças no estado energético (RHOADS et al., 2009). Trabalhos

realizados por Baumgard et al. (2013) comprovam que a rota metabólica utilizada por vacas de leite em estresse térmico para produção de energia, em vez da utilização dos AGNE, é através da proteólise (principalmente de aminoácidos).

A metionina é um dos primeiros aminoácidos limitantes para a produção, principalmente em animais alimentados a pasto (CLEMENTS et al., 2017, FERREIRA et al., 2018). A época ideal para a estação reprodutiva de bovinos de corte geralmente está associada com o período de maior crescimento das pastagens naturais; coincidentemente, é quando são registradas as maiores temperaturas ambientais e umidade do ar. Apesar disso, não há estudos da ação da metionina na prevenção ou diminuição dos efeitos do estresse térmico sobre a reprodução em gado de corte criado em pastagens.

Com base nisto, a hipótese deste trabalho é que novilhas de corte suplementadas com metionina protegida da degradação rumenal, durante períodos de alta temperatura e umidade, têm uma temperatura interna menor e melhor desenvolvimento folicular, maiores taxas de concepção e redução nos índices de perdas embrionárias.

O objetivo geral foi avaliar a resposta de novilhas suplementadas com metionina protegida, em relação a sua temperatura interna e esta influência nas taxas de prenhez aos 30 dias após a IATF. Além disto, buscou-se avaliar o possível efeito desta suplementação sobre a viabilidade dos embriões nos primeiros dias da implantação, se diminuiriam as perdas embrionárias. Avaliou-se, também, o efeito desta suplementação sobre o ganho médio diário (GMD) e peso final das novilhas.

Material e Métodos

O experimento foi realizado em uma propriedade comercial de bovinos de corte, no município de São Gabriel, (30°13'54"S - 54°37'29"O). Em setembro de 2017, foram

selecionadas 100 novilhas Brangus entre 17 e 19 meses idade, pesadas e categorizadas quanto ao escore de condição corporal (ECC), sendo 1= muito magra e 5= muito gorda (LOWMAN et al.,1973). Na mesma data, foram coletadas amostras de sangue para realização de soroneutralização para herpesvírus bovino (BoHV) e através de ELISA Direto (Idexx BVDV Ag/Serum Plus, Idexx Laboratories, Westbrook, EUA) verificar infecções persistente pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV). Os animais identificados como positivos para estas enfermidades foram descartados do experimento.

No dia 31 do mês de outubro (D- 56), foram registrados novamente o peso e o ECC dos animais. Além disso, foi realizado exame ginecológico com auxílio de ultrassonografia, permanecendo no estudo apenas os animais que estavam ciclando e sem qualquer patologia do trato genital. Neste dia, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo controle, que recebeu apenas suplementação mineral com uma formulação comercial (GC; n=48) e Grupo Metionina que recebeu a mesma suplementação mineral, porém com a inclusão de metionina na proporção de 4g para cada 100g de sal mineral (GM; n= 52). O peso inicial dos grupos foi 304,4 kg e 304,6 kg, respectivamente, sendo ambos alocados em dois piquetes semelhantes quanto à área e disponibilidade de forragem (GM = 68,3 ha e CG = 63,5 ha).

Para a avaliação dos recursos forrageiros foi realizada coleta de forragem pelo método de dupla amostragem, segundo a metodologia proposta por Wilm et al. (1944) para calcular a massa de forragem disponível. Utilizou-se um quadrado de 0,25m², sendo a forragem cortada rente ao solo e excluindo-se os pontos representados por touceiras. As amostras de forragem cortadas foram recolhidas em sacos de papel, pesadas para cálculo da disponibilidade de forragem e armazenadas. Posteriormente foram levadas ao laboratório para secagem em estufa de ar forçada a 70°C por 48 h para

determinação da quantidade de matéria seca e depois ser encaminhadas para análise bromatológica. Tais avaliações foram feitas em três oportunidades (D-56, D30 e D75) durante a condução dos trabalhos. A propriedade em pauta integra e é certificada pela organização internacional Alianza del Pastizal[®] (BirdLife International, Cambridge, Reino Unido). As espécies forrageiras nativas com maior predomínio na área eram: *Andropogon lateralis*, *Aristida laevis*, *Axonopus affinis*, *Paspalum plicatulum* e *Paspalum notatum*. A disponibilidade inicial de forragem dos poteiros (728,3 e 842,6 kg MS/ha para o GM e o GC, respectivamente) foi considerada suficiente para os animais de acordo com as estimativas de ingestão de matéria seca proposto por Barioni et al. (2007), conforme a tabela 1.

Foi fornecido o mesmo suplemento mineral para ambos os grupos durante o período de adaptação de 15 dias. A composição do produto está apresentada na tabela 2.

Após tal período, foi oferecido ao GM a mistura metionina protegida (Smartamine[®] M, Adisseo, Antony, França) + suplemento mineral. O suplemento foi disponibilizado *ad libitum*, em cochos de madeira protegidos da chuva. A suplementação foi fornecida por um período de 102 dias, até o final do experimento.

Após 32 dias de iniciada a suplementação, realizou-se a sincronização de cio para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Antes da colocação do dispositivo intravaginal (DIV) de progesterona foi realizado um novo exame ginecológico nas novilhas para avaliação do tamanho dos folicos e/ou presença de corpo lúteo. O protocolo de sincronização foi: dia 0 (D0), inserção do (DIV) de progesterona 1,0 g monodose (Primer[®]) e 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE) (RIC-BE[®]) via intramuscular (IM); no D8, após remoção do DIV, foram aplicados 0,15 mg de D-Cloprostenol (Prolise[®]) via IM. Após 24 horas (D9) 1,00 mg de BE via IM e IATF 28 horas após (D10). Em 20 animais, (10 de cada grupo) entre D0 e D8, durante o período

em que permaneceram com o DIV, a temperatura interna dos animais foi monitorada com intervalos de 30 minutos através de um termômetro *data logger* (Ibutton®, Thermochron, Whitewater, USA), acoplado ao DIV, segundo metodologia proposta por Hansem, (2012).

No momento da retirada dos DIV, foi feita a avaliação dos ovários para mensurar o tamanho do folículo dominante dos 20 animais que tiveram a temperatura aferida, sendo repetida tal avaliação nos dias 9 e 10 do protocolo. O método utilizado foi ultrassonografia transretal (Mindray DP-2200, Shenzhen, China) com sonda de 5 MHz. No D9 e D10, foi também aferida a temperatura interna por via retal, com a utilização de termômetro digital. No D10, à tarde, a partir das 14h00min iniciou-se a inseminação artificial em tempo fixo. Todo sêmen utilizado pertencia a um mesmo touro e mesma partida de congelamento, previamente analisado quanto às suas características físicas, morfológicas e termoresistência. O sêmen foi descongelado em água a 37°C por 30 segundos com auxílio de um descongelador automático. O resultado da avaliação do sêmen está apresentado na tabela 3.

Decorridos 17 dias após a inseminação artificial, foi feita a observação do retorno de cio nos dois lotes, durante o período de sete dias. Os animais observados em cio eram inseminados após 12 horas. Ao final deste período, foram incorporados dois touros por lote, que foram revezados a cada 15 dias. Trinta dias após a inseminação artificial, foi feito o diagnóstico de gestação através de ultrassonografia, para avaliar o índice de prenhez obtido na IATF. O exame foi repetido 30 após, para identificar o índice de prenhez do retorno de cio e de perdas embrionárias.

As pesagens dos animais foram feitas sempre que os lotes eram levados ao centro de manejo para a realização de algum procedimento, por isso foram realizadas em intervalos irregulares (D-56, D-18, D0, D42 e D76). Para estas pesagens foi

utilizada uma balança eletrônica Eziweigh7i (Tru-Test[®], Auckland, Nova Zelândia) acoplada ao tronco de contenção. O ECC foi avaliado através da observação visual, após a pesagem, numa escala de 1-5 (1= muito magra; 5= muito obesa), segundo a metodologia descrita por Lowman et al. (1973).

Os dados climáticos foram obtidos com intervalo de uma hora, através de estação meteorológica móvel (Instrutemp[®] ITWH-1080, São Paulo, Brasil), instalada junto ao centro de manejo da propriedade. Com base nestas informações, foi calculado o índice de temperatura e umidade (THI). A fórmula utilizada para o cálculo do THI foi: $THI = T_s + 0,36 T_{po} + 41,2$ onde T_s = temperatura do termômetro de bulbo seco e T_{po} = temperatura ponto de orvalho. Durante a condução do experimento, os meses de dezembro 2016 e janeiro e fevereiro 2017 tiveram temperaturas ambientais médias de 24,93°C; 25,42°C e 24,95°C, respectivamente.

As análises estatísticas para peso corporal e diâmetro folicular foram realizadas utilizando o modelo de medidas repetidas *ProcMixed Models* através do software SAS Studio[®] (SAS Institute Inc., Cary, USA), utilizando como variáveis fixas grupo e data e, como variáveis resposta, peso (Kg) e diâmetro folicular (mm). As análises de taxa de concepção e taxa de prenhez foram avaliadas com teste de *Qui-quadrado* através do software SAS Studio[®] (SAS Institute Inc., Cary, USA). Para as análises estatísticas da temperatura interna utilizou-se o mesmo modelo de medidas repetidas, sendo variáveis fixas o grupo e a data e como variáveis resposta a temperatura interna (°C).

Resultados

Em ambos os tratamentos, os animais apresentaram consumo médio diário do suplemento mineral dentro dos padrões estipulados pelos fabricantes, correspondendo a 100 g/animal/dia da mistura, tendo um consumo mínimo de 4g de metionina/dia no GM.

A disponibilidade de forragem nos poteiros do GM e GC foi de 710, 780 e 695 e de 916, 832 e 780 kg MS/ha, respectivamente, nas coletas realizadas no D -56, D30 e D75 do experimento. Os resultados da disponibilidade de forragem e análise bromatológica estão apresentados na tabela 1.

Ao final do experimento, o GM obteve maior peso do que o GC ($398,57 \pm 28,47$ kg x $389,27 \pm 21,44$ kg, $P \leq 0,01$), conforme apresentado na figura 2. Nas cinco pesagens realizadas com intervalos irregulares, observou-se uma interação entre tempo e tratamento no dia D0, a qual foi mantida na pesagem do dia D42 após início da suplementação ($P < 0,03$). O GMD durante todo o período experimental foi de 0,706 kg/dia para o GM e de 0,637 kg/dia para o GC.

Entre o D0 e D6, momento onde foram registrados os maiores THI, o GM apresentou menor média de temperatura interna ao longo dos dias ($P \leq 0,0001$), assim como uma interação entre tempo e tratamento ($P \leq 0,0001$); porém nos dias que antecederam a IATF houve uma redução no THI e nas temperaturas corporais internas dos dois grupos, conforme pode ser observado na figura 3. Os valores mínimos, médios e máximos do THI no período estão expressos na tabela 4.

As novilhas do GM apresentaram folículos de maior tamanho ($11,76 \text{ mm} \pm 2,07$ x $10,86 \text{ mm} \pm 2,75$; $P = 0,06$), evidenciando-se tendência de maior crescimento dos folículos no GM, conforme pode ser observado na figura 4.

Não foi encontrada diferença na taxa de concepção e prenhez aos 30 e 60 dias pós IATF, sendo constatada, respectivamente, 42,3% (22/52) e 76,9% (40/52) para o GM e 39,5% (19/48) e 79,1% (38/48) para o GC, conforme demonstrado na tabela 5.

O ECC inicial das novilhas apresentava a seguinte distribuição no GC: 6,25% escore 2; 52,08% escore 2,5 e 41,67% escore 3 e ao final do experimento apresentavam 41,67% escore 3,5 e 58,33% escore 4. Já no GM apresentavam a seguinte distribuição:

9,6% escore 2; 44,2% escore 2,5; 44,2% escore 3 e 2% escore 3,5. Ao final do experimento 2% escore 3; 36,5% escore 3,5; 59,5% escore 4 e 2% escore 4,5.

Discussão

O fornecimento de metionina tem demonstrado melhorar o desempenho de crescimento para bovinos, (SILVA et al., 2002; SCHROEDER et al., 2006), o que foi reafirmado em nosso estudo, ao constatar o maior ganho de peso do grupo GM, principalmente nos meses de Dezembro e Janeiro, meses que tiveram as maiores temperaturas ambientais. Apesar de diferentes quanto à categoria animal e ao manejo nutricional, resultados semelhantes foram encontrados em novilhos nelore com 12 meses de idade, em sistema de pastejo sobre braquiária e suplementação com adição de ácidos graxos essenciais adicionados de metionina (AGEF e AGE), demonstrando que a suplementação com metionina deve ser considerada para animais em fase final de crescimento (FERNANDES et al., 2008), bem como para reduzir a incidência de distúrbios metabólicos em ruminantes (GOMES et al., 2010).

O aumento do gasto energético, provocado pelo desacoplamento da respiração, causado pela UCP1 nas mitocôndrias, tem sido reconhecido como efetivo na perda de peso (BRONDANI et al., 2012). A restrição dietética de metionina produz uma série de respostas bioquímicas e fisiológicas que limitam o acúmulo de gordura nos tecidos. Esta restrição vai produzir uma regulação dos genes lipogênicos no fígado, resultando numa menor capacidade hepática de sintetizar e exportar lipídeos e também na capacidade do tecido adiposo branco de sintetizar e oxidar ácidos graxos. (HASEK et al., 2013).

Durante o período de sincronização da ovulação das novilhas, os índices de THI medidos alcançaram valores maiores que 75, conforme demonstra a tabela 4, sendo que os efeitos negativos sobre a reprodução já aparecem em THI próximos de 73

(SCHÜLLER et al., 2014). Biggers et al. (1987), estudando a ação dos fatores climáticos no período de sete dias antes até três dias após a inseminação artificial, em vacas Hereford e Hereford x Angus, afirmaram que à medida que o THI aumenta, a concepção baixa (23% com $\text{THI} \geq 80$), porém no estudo realizado com as novilhas, os 2 grupos tiveram taxa de prenhez similares. O estresse pelo calor também influencia na diminuição da intensidade de expressão dos sinais do cio, na coloração da mucosa da vagina e diminuição do tamanho do folículo dominante, à medida que aumenta um ponto no THI no dia do estro (SCHÜLLER et al., 2017).

As menores temperaturas corporais encontradas nas novilhas do grupo GM poderiam ser explicadas por uma quantidade insuficiente de metionina no grupo controle, afetando a flexibilidade metabólica e a termorregulação, como propõem os estudos em ratos de Hasek et al. (2010). Trabalhando com ratos submetidos à restrição de metionina na dieta, foi encontrada uma maior temperatura interna, houve um aumento no gasto energético e no consumo de ração, apesar do menor peso corporal. Segundo os autores, isto ocorreu devido ao aumento da expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) nas mitocôndrias do tecido adiposo marrom e branco. A UCP1 é uma proteína existente na membrana interna das mitocôndrias que auxilia nas transferências de prótons (H^+) para o seu interior, porém neste movimento ocorre apenas a liberação de calor e não há formação de ATPs. Patil et al. (2015) encontraram maior número e tamanho das mitocôndrias nas células do tecido adiposo branco inguinal, aumentos na expressão e na função da UCP1, proteínas respiratórias e enzimas do ciclo do ácido cítrico e aumento na capacidade oxidativa das mitocôndrias, em ratos com restrição de metionina na dieta, comprovando a influência que a restrição de metionina exerce sobre vários processos bioquímicos e fisiológicos dos animais. Assim, o fornecimento de metionina protegida poderia ser considerada em situações onde não

há garantias de que a dieta oferecida aos animais atenda toda a demanda por este aminoácido.

As novilhas do GM apresentaram folículos maiores no momento da inseminação, informação esta que corrobora com os resultados alcançados por Alonso et al. (2008), os quais, avaliando a suplementação de metionina, uréia e melaço em novilhas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) sobre a dinâmica ovariana, encontraram maior porcentagem de folículos ovarianos maiores que 9 mm no grupo que recebeu a suplementação (26,7%) comparado ao grupo controle (6,4%). A elevação da temperatura corporal pode alterar as concentrações do hormônio folículo estimulante, comprometendo o crescimento folicular, síntese de estrogênio, a manifestação de estro e o pico de hormônio luteinizante (NARDONE et al., 2010; LI et al., 2016), interferindo no tamanho dos folículos na hora da ovulação. Essa informação vai de acordo com os resultados achados no experimento com as novilhas. A expectativa de prenhez em novilhas de corte que apresentam folículos maiores na hora da ovulação ($\geq 12,8$ mm) é maior do que em novilhas que ovulam folículos menores ($\leq 10,7$ mm) (PERRY et al. 2007), porém isso não se manifestou em nosso trabalho.

Conclusão

Os presentes resultados demonstram que a suplementação com metionina em novilhas Brangus, sob regime alimentar de campo nativo, promoveu aumento no ganho de peso e no tamanho do folículo dominante. A termorregulação foi beneficiada nos momentos com maiores índices de temperatura e umidade, durante os protocolos de IATF, com potenciais benefícios no desempenho produtivo e reprodutivo de novilhas de corte.

Referências bibliográficas

- Alonso, L.M., Maquivar, C. S., Galina, G. D., Mendoza, A., Guzmán, S., Estrada, M., Villareal, R. Molina 2008 Effect of ruminally protected Methionine on the productive and reproductive performance of grazing *Bos indicus* heifers raised in the humid tropics of Costa Rica **Tropical Animal Health and Production** v. 40, n. 8, p.667-672.
- Arias, R.A., Mader, T.L., Escobar P.C. 2008 Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne e leche **Archivos de Medicina Veterinaria** v.40, p. 7-22.
- Barioni, L.G., Ferreira, A.C. Junior, R.G., Ramos, A.K.B. 2007 Tabelas para estimativas de ingestão de material seca de bovinos de corte em crescimento em pastejo **Comunicado Técnico 142 EMBRAPA**.
- Baumgard, L.H., M.K. Abuajamieh , S.K. Stoakes , M.V. Sanz-Fernandez , J.S. Johnson , Rhoads, R.P. 2014 Feeding and managing cows to minimize heat stress **Tri-State Dairy Nutrition Conference** April p.14-16 .
- Baumgard, L.H., Rhoads, R.P. 2013 Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics **Annual Review of Animal Biosciences** v.1, p.311–337.
- Biggers, B.G., Geisert, R.D., Wetterman, R.P., Buchanan, D.S. 1987 Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. **Journal of Animal Science** v.64, p.1512-1518.
- Brondani, L.A., Assmann, T.S., Duarte, G.C.K., Gross. J.L., Canani, L.H., Crispim, D. 2012 The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia** v.56,n. 4, p.215-225.

- Castaño, F.A., Rugeles, C.C., Betancur, C.A. Ramírez-López C.J. 2014 Impacto del estrés calórico sobre la actividad reproductiva em bovinos y consideraciones para mitigar sus efectos sobre la reproduccion **Revista Biosalud** v.13, n.2, p.84-94.
- Clements, A.R, F. A. Ireland, T. Freitas, H. Tucker, D. W. Shike 2017 Effects of supplementing methionine hydroxy analog on beef cow performance, milk production, reproduction, and preweaning calf performance **Journal of Dairy Science** v.95, p.5597–5605.
- Faylon,M.P., L. H. Baumgard, L.H., Rhoads, R. PSpurlock, D. M. 2015 Effects of acute heat stress on lipid metabolism of bovine primary adipocytes **Journal of Dairy Science** v. 98, p.8732–8740.
- Fernandes, L.B., Franzolin, R., Franco, A.V.M., Carvalho, G. 2008 Aditivos orgânicos no suplemento concentrado de bovinos de corte mantidos em pastagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** v.9, n.2, p.231-238.
- Ferreira, S.F., Leite, M.A.S., Todescatti, S.R., Ferreira, A.C.F. 2018 Metionina e análogos na nutrição de bovinos **Ciência Animal** v. 28, n.1,p.130-144.
- Gomez, A., German, D. M., García-Bojalil, C., Barcena, R., Ramos, J. A., Crosby, M.M., Pinos-Rodríguez, J.M, Lara, A. 2010 Effect of supplementation with urea, blood meal, and rumen-protected methionine on growth performance of Holstein heifers grazing kikuyu pasture. **Tropical Animal Health and Production** v.43 n.3, p.721-724.
- Hansen, P.J. 2012 Solutions to Infertility Caused by Heat Stress **Articles Extension .org** Disponível para consulta em <http://articles.extension.org/pages/64288/solutions-to-infertility-caused-by-heat-stress>.
- Hasek, B.E., L.K. Stewart, T.M. Henagan, Boudreau, A., Leonard, N.R., Blank, C., Shin, J., Huypens, P., Malloy, V.L., Plaisance, E.P., Krajcik, R.A., Orentreich, N., Gettys, T.W. 2010 Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and

increases uncoupled respiration in both fed and fasted states **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology** v. 299, p.728-739.

- Hasek, B. E., Boudreau, A., Shin, J, Feng, D., Hulver, M., Van, N.T., Laque, A., Stewart, L.k., Stone, K.P., Wanders, D., Ghosh, S., Pessin, J. E., Gettys, T.W. 2013 Remodeling the integration of lipid metabolism between liver and adipose tissue by dietary methionine restriction in rats **Diabetes** v. 62, n.10, p. 3362-3372.

- Key, N., Sneeringer, S., Marquardt, D. 2014 Climate Change, Heat Stress, and U.S. Dairy Production, **ERR-175**, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service.

- Li, L., Wu, J., Luo, Y., Sun, Y., Wang, G. 2016 The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids and apoptosis in bovine granulosa cells **Cell Stress and Chaperones** v.21 n 3, p. 467- 475.

- Lowman, B.G., Scott, N., Somerville, S. 1973 Condition scoring beef cattle. Edinburgh: **East of Scotland College of Agriculture** Bulletin, 6, p.8.

- Nardone, A., Ronch, I. B., Lacetera, N., Bernabucci, U. 2010 Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems **Livestock Science** v.130 p.57-69.

- Patil, Y. N., Dille, K. N., Burk, D. H., Cortez, C. C., Gettys, T. W. 2015 Cellular and molecular remodeling of inguinal adipose tissue mitochondria by dietary methionine restriction **Journal of Nutritional Biochemistry** v.26, n. 11 p.1235-1247.

- Perry, G. A., Smith, M. F., Roberts, A. J. , MacNeil, M. D., Geary, T. W. 2007 Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers **Journal of Animal Science** v. 85 p. 684–689.

- Rhoads, M. L., Rhoads, R. P. , VanBaale, M. J. Collier, R. J., Sanders, S. R., Weber, W. J. , Crooker, B. A., Baumgard, L. H. 2009. Effects of heat stress and plane of

nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **Journal of Animal Science** v.92,p.1986–1997.

- SAS university edition 9.4 - Statistical Analyses System - SAS/University Edition 40
SAS Institute Inc.

- Silva, F.F., Filho, S.C.V., Ítavo, L.C.V., Veloso, C.M., Valadares, R.F.D., Cecon, P.R., Moraes, E.H.B.K., Paulino, P.V.R. 2002 Exigências Líquidas de Aminoácidos para Ganho de Peso de Nelores Não-Castrados **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.31, n.2, p.765-775.

- Schroeder, G. F.; Titgemeyer, E. C.; Awawdeh, M. S.; Smith, J. S.; gnad, D. P. 2006 Effects of energy source on methionine utilization by growing steers. **Journal of Animal Science** v. 84, p. 505-1511.

- Schüller, L.K., Burfeind , O., Heuwieser,W. 2014 Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature–humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices **Theriogenology** v.81, p.1050–1057.

- Schüller, L.K., Michaelis,W., Heuwieser,W. 2017 Impact of heat stress on estrus expression and follicle size in estrus under field conditions in dairy cows **Theriogenology** v.102, p.48-53.

- Wilm, H,G, D.S. Costello, G.E. Clipe 1944 Estimating forage yield by the double sampling method **Journal American Society of Agronomy** v. 36, n.1 p.194-203.

- Wiltbank, M.C.; Baez, G.M.; Garcia-guerra, A.; Toledo, M.Z.; Monteiro, P.L.J.; Melo, L.F.; Ochoa, J.C.; Sartori, R. 2017 Momento y causa de perdidas fisiológica de la preñez (no relacionada con enfermedad) em vacas lecheras lactantes y receptoras de embriones **In Anais 12º Simposio Internacional de Reproduccion Animal** p.73-102 Córdoba .

- Zhao, L.D., McMillan, R. P., Xie, G , Giridhar, S.G.L.W , Baumgard, L.H. , Samer, E., Selsby, J. , Ross, J. , Gabler, N., Hulver, M.W., Rhoads, R.P. 2018 Heat stress decreases metabolic flexibility in skeletal muscle of growing pigs **American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v.1; n 315 p. R1096-R1106.

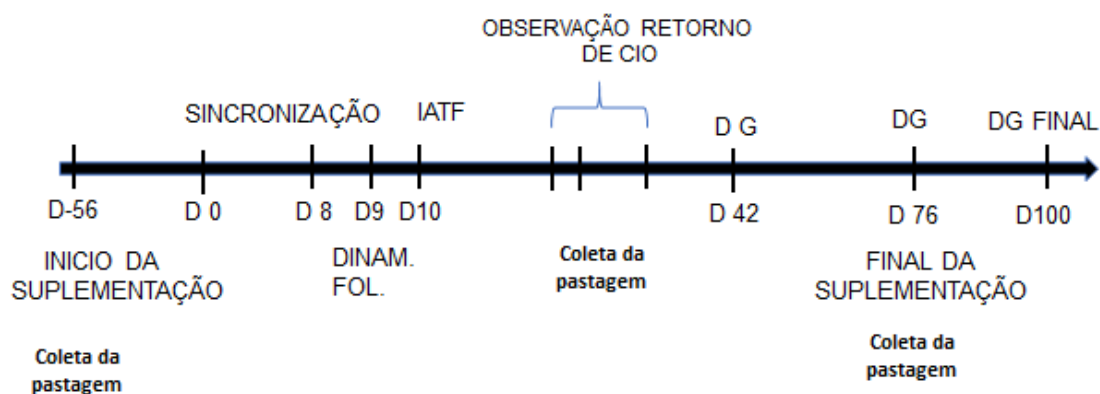


Figura 1 – Cronograma dos trabalhos realizados

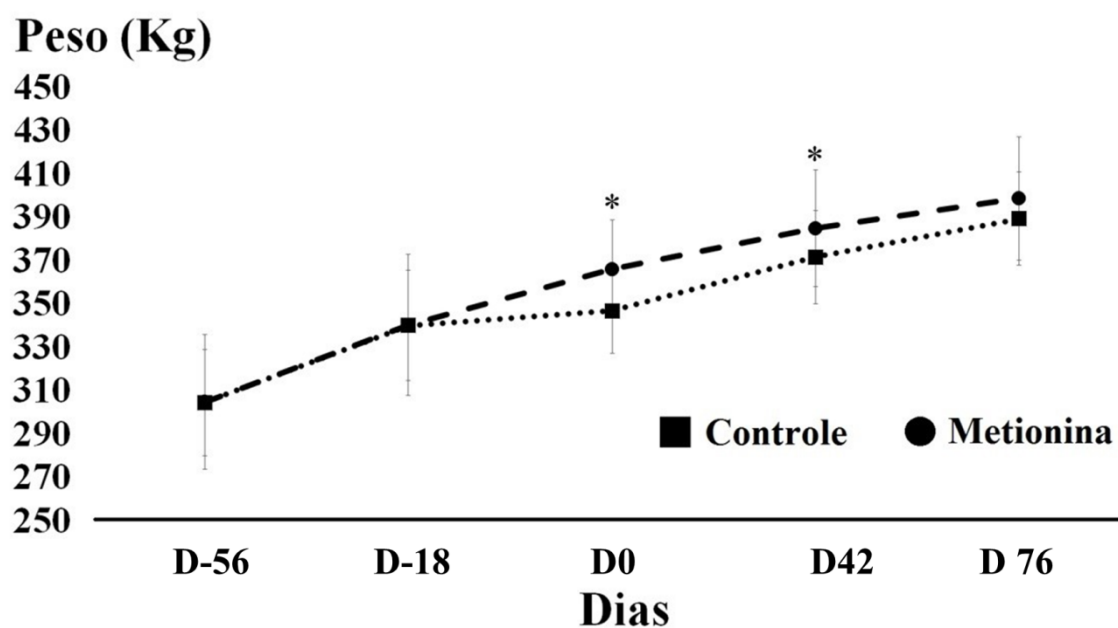


Figura 2 – Ganho de peso das novilhas durante o período de condução do experimento dos lotes Grupo Metionina e Grupo Controle . * $P \leq 0,03$

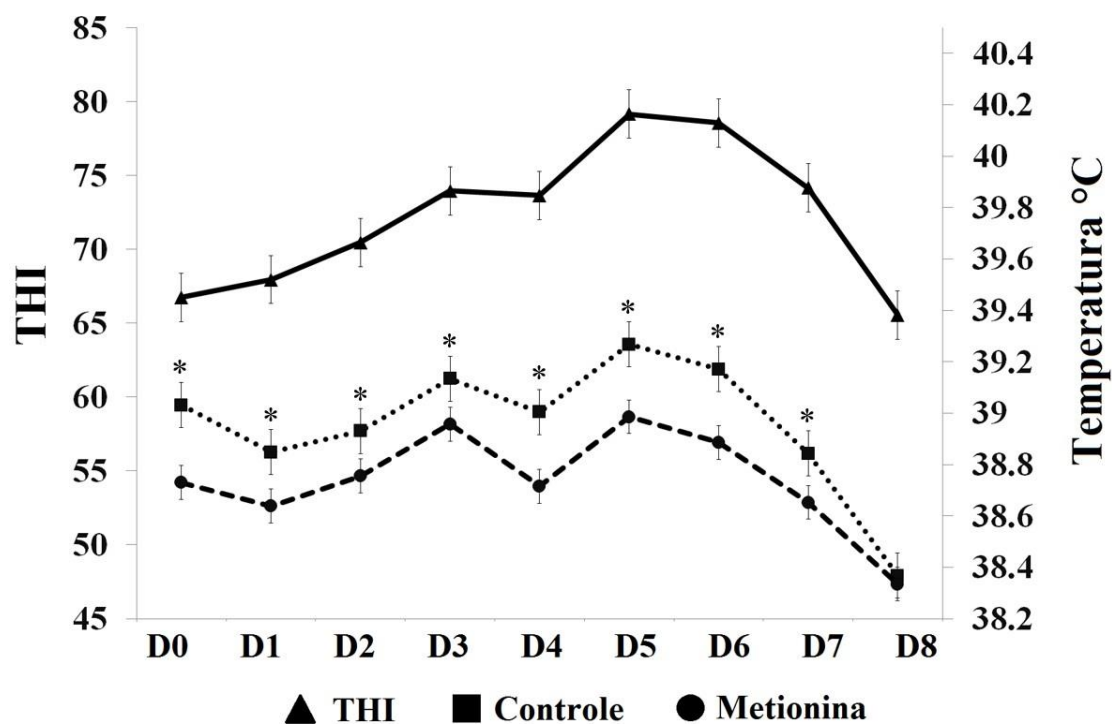


Figura 3 - Relação da temperatura interna de novilhas do Grupo Metionina e o Grupo Controle, durante os dias do protocolo de sincronização de cio e o índice de temperatura e umidade (THI) no mesmo período . * $P \leq 0,001$

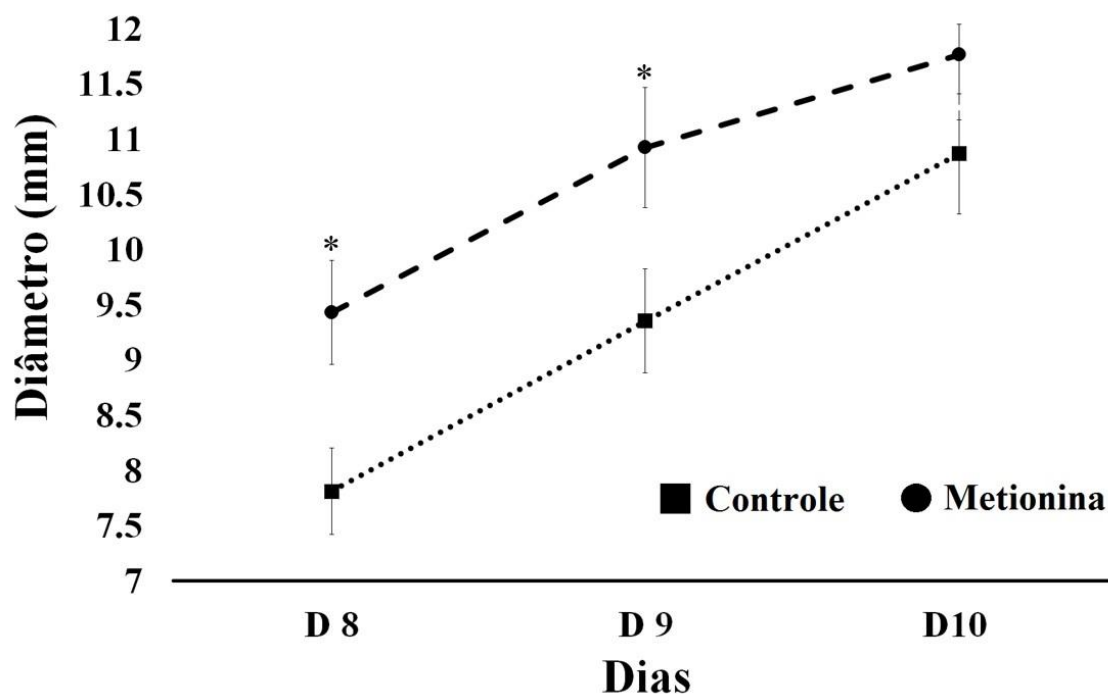


Figura 4 - Diâmetro folicular durante os dias D8- D9 -D10 do protocolo de sincronização da onda folicular do lote suplementado com metionina (GM) e sem suplementação (GC) * $P \leq 0,05$.

Tabela 1. Resultado das análises bromatológica das pastagens em três coletas realizadas durante o período experimental

	Grupo Metionina			Grupo Controle		
	04/11	30/01	10/03	04/11	30/01	10/03
Matéria Seca kg/ha	710	780	695	916	832	780
Cinza Bruta (%)	10,1	6,2	6,4	7,3	6,2	6,2
Extrato Etéreo (%)	1,2	3,0	2,1	1,4	2,2	3,7
Proteína Bruta (%)	10,9	8,0	8,4	8,6	8,3	7,5
FDN (%)	61,32	75,23	69,22	64,3	70,9	70,96
FDA (%)	31,19	41,3	34,2	32,8	31,7	33,34

FDN – fibra em detergente neutro; FDA fibra em detergente ácido

Tabela 2 Níveis mínimos de garantias do sal mineral utilizado na suplementação dos dois lotes de novilhas, sendo que em um foi adicionada a metionina (grupo metionina)

Componentes	Mínimo
Cálcio	150 g/ kg
Cobalto (g/ kg)	15,8 mg/ kg
Cobre (g/ kg)	420 mg/ kg
Enxofre (g/ kg)	10,5 g/ kg
Fosforo (g/ kg)	55 g/ kg
Iodo (g/ kg)	31,5 mg/ kg
Magnésio (g/ kg)	10 g/ kg
Narasina	780 mg/ kg (máximo)
Selenio	10,5 mg/ kg
Sódio	50 g/ kg
Zinco	2100 mg/ kg

Tabela 3 Resultados da avaliação do sêmen utilizado para a IATF das novilhas durante o experimento

Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Concentração ($\times 10^6$)	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)	Defeitos totais (%)
55	3	30,4	2	5,5	7,5

Tabela 4 Índice THI mínimo, médio e máximo durante o período do protocolo de sincronização de estro de novilhas

THI	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
Min	62,34	62,05	63,54	63,34	65,44	64,34	65,14	62,04	62,34
Médio	63,35	64,93	65,91	67,96	68,01	70,75	70,54	68,35	65,12
Máx	66,75	67,95	70,45	73,95	73,65	79,15	78,55	74,15	65,55

Tabela 5 Taxa de prenhez aos 30 e aos 60 dias, com auxílio de ultrassonografia, dos grupos suplementados com metionina (GM) e sem suplementação com metionina (GC).

Status	Taxa prenhez D30		P Valor	Taxa prenhez D60		P Valor
	GC	GM		GC	GM	
Prenhez (%)	39,5	43,3	P>0,05	79,1	76,9	P>0,05
	(19/48)	(22/52)		(38/48)	(40/52)	

ARTIGO 2

TEMPERATURA INTERNA E DESEMPENHO REPRODUTIVO DE VACAS DE CORTE SUPLEMENTADAS COM METIONINA PROTEGIDA NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA

Artigo formatado pelas normas da Revista Brasileira de Zootecnia

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho reprodutivo e a temperatura interna de vacas de corte com cria ao pé, suplementadas com metionina protegida em um sistema extensivo de pastejo, durante o período de sincronização da ovulação, acasaladas em períodos de alta temperatura e umidade. Foram utilizadas 98 vacas da raça Angus múltíparas, com peso vivo médio de 550 kg, distribuídas uniformemente em dois grupos alocados em piquetes com pastagem de festuca, trevo branco e cornichão, com mesma disponibilidade de forragem (818,6 MS/ha), diferindo apenas quanto ao tipo de suplementação mineral. O grupo controle (n=47, GC) recebeu uma suplementação de sal mineral *ad libitum*, enquanto o grupo metionina (n=51, GM) recebeu a mesma suplementação, com acréscimo de 7g metionina para cada 100g de sal mineral. Foi realizada uma pesagem para começar o experimento e outra ao final. Após 7 dias de iniciada a suplementação, os animais foram submetidos a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. No dia 0 do protocolo foram acoplados aos implantes de progesterona termômetros *data logger* em 10 animais de cada grupo, que registraram a temperatura interna dos animais a cada 30 minutos. No D8 e D10 do protocolo estes animais foram submetidos a um exame ginecológico através de ultrassonografia, para mensurar o tamanho do folículo dominante. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF para a avaliação da taxa de concepção. Os folículos do GM possuíam menor tamanho que o GC (8,5 mm e 9,73 mm, respectivamente; $P>0,05$), porém a taxa de concepção aos 30 dias foi semelhante ($P>0,05$) entre os 2 grupos (30/51 GM e 28/47 GC). As temperaturas internas durante o protocolo de IATF apresentaram diferenças entre elas no D8 (GM = 38,73°C e GC =38,85°C; $P< 0,05$). Os dois grupos perderam peso durante a condução do experimento, (GM =25,4 kg e GC =26,6 kg), porém permaneceram com mesmo escore de condição corporal, não interferindo na taxa de concepção aos 30 dias. Os resultados demonstram que a suplementação com metionina nesta categoria reduziu a temperatura interna dos animais, no último dia do protocolo de IATF, mas não houve efeito na taxa de prenhez e ganho de peso.

Palavras – Chave

Aminoácidos, bovinos de corte, IATF, reprodução, termorregulação

Abstract

The objective of this work was to evaluate the reproductive performance and the internal temperature cows which calves supplemented with protected methionine in an extensive grazing system during the period of ovulation synchronization, mating in periods of high temperature and humidity. A total of 98 multiparous Angus cows, weighing 550 kg live weight, were distributed evenly in two groups of pastures with fescue pasture, white clover and cornichon, with the same forage availability (818,6 MS / ha), differing only regarding the type of mineral supplementation. The control group (n = 47, GC) received a mineral salt supplementation ad libitum, while the methionine group (n = 51, GM) received the same supplementation, with an increase of 7g methionine per 100g of mineral salt. Weighing was done to begin the experiment and another at the end. After 7 days of initiation of supplementation, the animals were submitted to a protocol of artificial insemination at fixed time. At day 0 of the protocol were coupled to the progesterone implant data logger thermometers in 10 animals from each group, which recorded the internal temperature of the animals every 30 minutes. At the D8 and D10 protocols these animals underwent a gynecological examination by ultrasonography to measure the size of the dominant follicle. The diagnosis of gestation was performed 30 days after the IATF to evaluate the conception rate. The GM follicles had a smaller size than the GC (8.5 mm and 9.73 mm, respectively; $P > 0.05$), but the conception rate at 30 days was similar ($P > 0.05$) between the 2 groups (30/51 GM and 28/47 GC). The internal temperatures during the IATF protocol presented differences between them in D8 (GM = 38.73°C and GC = 38.85°C; $P < 0.05$). The two groups lost weight during the experiment (GM = 25.4 kg and GC = 26.6 kg), but they remained with the same body condition score, not interfering with the conception rate at 30 days. The results demonstrate that methionine supplementation in this category reduced the internal temperature of the animals, but there was no effect on pregnancy rate and weight gain.

Keywords

Amino acids, cattle beef, FTAI, reproduction, thermoregulation,

Introdução

A ação dos efeitos climáticos sobre os animais de produção provocam resultados deletérios sobre sua produtividade (Key et al., 2014). Os fatores climáticos que mais interferem no metabolismo de animais de produção são: radiação solar, umidade relativa do ar, temperatura ambiental e velocidade do vento, que normalmente são avaliados em conjunto, na determinação do que é conhecido como estresse térmico. O estresse térmico ocorre quando os animais ficam expostos a condições ambientais que ultrapassam os limites da zona de conforto térmico (Pereira, 2005). As respostas dos animais contra estes agentes climáticos se refletem em redução do desempenho produtivo, como redução na produção de leite, percentual de proteína no leite (Dikmen e Hansen, 2009), assim como também afetam a reprodução, como baixa qualidade dos oócitos, menor crescimento folicular, menor taxa de prenhez e menor viabilidade espermática (Nardoni et al., 2010; Li et al., 2016; Polski e Von Keyserlingk, 2017).

A demanda metabólica de uma vaca com cria ao pé é maior do que a de uma novilha, pois necessita alimentar sua cria, se manter e ainda ter reservas corporais para gerar uma nova prenhez (NRC, 2001). O primeiro aminoácido limitante para vacas de leite e de corte a pasto é a metionina e algumas evidências sugerem que há um aumento no requerimento de metionina para vacas gestantes (Clements et al., 2017). O manejo alimentar de vacas é um ponto chave para permitir um desempenho ideal, tanto na produção de leite, quanto na reprodução subsequente.

O fornecimento de suplementação de aminoácidos para vacas com cria ao pé, durante o período reprodutivo, é uma forma de tentar suprir estas exigências e obter melhores resultados nas prenhez, pois as concentrações dos aminoácidos no histotrofo mudam drasticamente em uma fêmea prenhe, comparada com uma não prenhe. As concentrações de Lisina, Metionina e Histidina aumentam em mais de 10 vezes no lúmen uterino de fêmeas prenhas (Gao et al., 2009). Melhoras no ambiente uterino

podem aumentar a sobrevivência dos embriões desde os primeiros dias de vida até sua completa placentação, já que os aminoácidos têm importantes funções neste período (Hugentobler et al., 2007; Wiltbank et al., 2017). A proteção contra a degradação rumenal aumenta a biodisponibilidade destes aminoácidos (Graulet et al., 2005).

A hipótese deste trabalho é que vacas de corte com cria ao pé, suplementadas com metionina protegida, durante períodos de alta temperatura e umidade, tenham maiores taxas de concepção e redução nos índices de perdas embrionárias.

Objetivou-se avaliar a resposta de vacas com cria ao pé suplementadas com metionina protegida durante a estação reprodutiva, considerando-se a ação da metionina sobre temperatura interna destes animais e sobre o crescimento folicular e as taxas de prenhez aos 30 dias e o possível resultado desta suplementação frente às perdas embrionárias; e, ainda, os efeitos desta suplementação sobre o ganho de peso dos animais.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em uma fazenda comercial de gado de corte, localizada no município de Arroio Grande-RS (32° 06'33" S – 52°50'13" O).

Os piquetes experimentais possuíam uma área de 45 ha cada, a cobertura vegetal foi formada com festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.), trevo branco (*Trifolium repens* L.), cornichão (*Lotus corniculatus* L.) predominantemente e algumas espécies nativas dos gêneros *Cynodon* e *Paspalum*. Para a avaliação dos recursos forrageiros foi realizada coleta de forragem pelo método de dupla amostragem, segundo a metodologia proposta por Wilm et al. (1944) para determinar a massa de forragem disponível. Utilizou-se um quadrado de 0,25m², sendo a forragem cortada rente ao solo e excluindo-se os pontos representados por touceiras. As amostras de forragem cortadas foram recolhidas em sacos de papel, pesadas para cálculo da disponibilidade de

forragem e armazenadas. Posteriormente foram levadas ao laboratório para secagem em estufa de ar forçada a 70°C por 48 h para determinação da quantidade de matéria seca e depois ser encaminhada para análise bromatológica. Durante a realização do experimento, foram realizadas três coletas da forragem para verificação da disponibilidade de matéria seca/ha (kg MS/ha). Mesmo havendo diferença na disponibilidade de MS/ha no dia D-7 entre os grupos, a disponibilidade de forragem foi considerada suficiente para os animais de acordo com as estimativas de ingestão de MS proposto por Barioni et al., (2007) A disponibilidade de forragem e os resultados da análise bromatológica estão apresentados na tabela 1.

Foram utilizados animais da raça Angus (n=98) sendo 12 primíparas e 86 multíparas com cria ao pé (entre 30-60 dias de paridas), divididos de forma homogênea em cada grupo. O grupo metionina (GM) ficou com 51 animais e o grupo controle (GC) com 47 animais. Foi realizada uma pesagem inicial para a divisão dos lotes um dia antes de começar a suplementação. Para isso utilizou-se uma balança digital XR 5000 (Tru-Test[®], Auckland, Nova Zelândia) acoplada ao tronco de contenção. O ECC foi avaliado através da observação visual na saída do brete, após a pesagem, numa escala de 1-5 (1= muito magra; 5= muito obesa), segundo a metodologia descrita por Lowman et al., (1973).

O peso inicial dos lotes foi de 542,2 kg para o GM e 536 kg para o GC. O ECC médio foi de 4,5. No final do experimento, no dia do diagnóstico de gestação se fez outra pesagem para acompanhar a evolução do ganho de peso e avaliação do ECC.

Os animais foram submetidos à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), utilizando um protocolo para sincronização da ovulação no D0, inserção do dispositivo intravaginal (DIV) de progesterona 1,9 g de segundo uso (CIDR[®]) e aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE[®]) via intramuscular (IM), no D8, após remoção

do DIV, foram aplicados 0,15 mg de D-cloprostenol (Prolise®) via IM, 300 UI gonadotrofina coriônica equina (Novormon®) via IM e Cipionato de estradiol (ECP®) 1,00 mg IM e IATF 36 horas após (D10). Em 20 animais, (10 de cada grupo) juntamente com os DIV, foram colocados termômetros para aferição da temperatura interna (T+Button® Thermodata) que permaneceram durante oito dias, para registro da temperatura interna num intervalo de 30/30 minutos. No momento da retirada dos implantes (D8) foi feita a avaliação dos ovários desses animais, medindo-se o folículo dominante com auxílio de um ultrassom Doppler Mindray M5 Vet (Shenzhen, China) sonda de 5,0 MHz. No D10 foi feita a mesma avaliação nos ovários, antes da inseminação artificial. Utilizou-se o sêmen de um mesmo touro, de uma única partida, já previamente analisado quanto às suas características físicas e morfológicas. O sêmen foi descongelado em água a 37°C por 30 segundos com auxílio de um descongelador automático.

Os animais receberam suplementação mineral *ad libitum*, em cochos cobertos, de um sal mineral comercial, sendo que no GM o suplemento foi adicionado de 7g de metionina (Smartamine® M, Adisseo, Antony França)/100 g do sal mineral. A suplementação foi mantida por 50 dias, quando se procedeu ao diagnóstico de gestação. A composição mínima do sal mineral está apresentada na tabela 2. Os dados climáticos de temperaturas ambientes (T°C), umidade relativa do ar (% UR) e precipitação foram obtidos através de uma estação meteorológica móvel (Instrutemp® ITWH-1080, Instrutemp, São Paulo, Brasil), instalada junto ao centro de manejo da propriedade, programada para registrar tais dados de hora em hora. Com base nestas informações, foi calculado o índice de temperatura e umidade, utilizando a fórmula $THI = T_s + 0,36 T_{po} + 41,2$, onde T_s = temperatura do termômetro de bulbo seco e T_{po} = temperatura ponto de orvalho. No período de 02/12 até 31/12 foram registrados 21,9 mm de precipitações

e uma temperatura média de 24,26° C, enquanto que no período de 01/01 até 23/01 foi registrado 130,5 mm de chuva e temperatura média de 24,71° C. Esta situação de grande seca e após muita chuva, influenciou no crescimento e desenvolvimento das pastagens, alterando também o consumo do mineral para baixo.

As análises estatísticas para peso corporal e diâmetro folicular foram realizadas com utilização do modelo de medidas repetidas *ProcMixed Models* através do software SAS Studio® (SAS Institute Inc., Cary, USA), utilizando, como variáveis fixas grupo e data e, como variáveis resposta, peso (Kg) e diâmetro folicular (mm). As análises de taxa de concepção foram avaliadas com teste de *Qui-quadrado* através do software SAS Studio® (SAS Institute Inc., Cary, USA). Para as análises estatísticas da temperatura interna se utilizou o mesmo modelo de medidas repetidas, sendo as variáveis fixas grupo e data e como variáveis resposta a temperatura interna (°C).

Resultados

A temperatura interna das vacas, aferida no período de sincronização de cio, apresentou valores menores no GM do que no GC apenas no D8 ($P \leq 0,05$), como pode ser observado na Figura 2.

Não foi encontrada diferença no tamanho dos folículos entre os grupos, do D8 até D10 (GM =8,5 mm e GC =9,73 mm), conforme se observa na Figura 3. Foi feita comparação sobre a taxa de crescimento folicular entre os dois grupos e não houve diferença entre eles ($P > 0,11$) Figura 4.

O consumo diário do suplemento mineral foi similar entre os grupos tratamento e controle. As médias de consumo do suplemento mineral no período de D-7 ao D43 foi GM 0,0320 kg /dia e GC 0,0345 kg/dia, conforme apresentado na Tabela 3.

A taxa de prenhez aos 30 dias após a IATF, também foi similar entre os dois grupos: 58,8% (30/51) para o GM e 59,6% (28/47) para o GC, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 4.

A evolução do ganho de peso durante o período experimental está demonstrada na Figura 5, não havendo diferenças entre os dois grupos, apesar da diminuição de peso ocorrida no período, porém o ECC dos animais se manteve.

Discussão

A temperatura interna das vacas, durante o protocolo de sincronização da ovulação, foi menor no grupo GM, mesmo nos dias com THI mais baixos. Porém não permitiu uma conclusão devido ao baixo consumo do suplemento pelos 2 grupos. À medida que a temperatura ambiental se eleva, há um aumento da temperatura corporal de vacas em lactação. Isso pode ocorrer devido ao calor extra produzido por reações metabólicas associadas à produção de leite ou também à menor perda de calor por condução devido à menor diferença entre o corpo e o ambiente (Bohmanova et al., 2007). Nos rebanhos de cria, uma temperatura interna maior está associada à diminuição da fertilidade (Vasconcelos e Demétrio, 2011), fato que não ocorreu neste experimento, pois as taxas de prenhez foram similares nos dois grupos. A elevação da temperatura corporal de uma vaca vai comprometer o crescimento dos oócitos, diminuindo o desenvolvimento dos folículos e, por consequência, alterando os níveis de hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante. Esta cascata de eventos afeta a duração e as manifestações externas de cio, resultando em menores taxas de prenhez destes rebanhos (Roth, 2015; Li et al., 2016, Polski e von Keyserlingk, 2017).

A redução na temperatura interna das vacas no GM pode ser explicada pelo fornecimento da suplementação de metionina, uma vez que poderia haver deficiência

dela nas pastagens. Isto está de acordo com um estudo de Hasek et al., (2010) com ratos com restrição de metionina na dieta, quando encontraram uma maior temperatura interna, um aumento no gasto energético e também no consumo de ração, apesar do menor peso corporal. Segundo os autores, isso ocorreu devido a um aumento da expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) nas mitocôndrias dos tecidos adiposos marrom e branco. A UCP1 é uma proteína existente na membrana interna das mitocôndrias que auxilia nas transferências de prótons (H^+) para o seu interior, porém neste movimento ocorre apenas a liberação de calor e não há formação de ATPs. Patil et al. (2015) encontraram maior número e tamanho das mitocôndrias nas células do tecido adiposo branco inguinal em ratos com restrição de metionina na dieta. Também encontraram aumentos na expressão e na função da UCP1, proteínas respiratórias e enzimas do ciclo do ácido cítrico e aumento na capacidade oxidativa das mitocôndrias, comprovando a influência que a restrição de metionina exerce sobre vários processos bioquímicos e fisiológicos dos animais.

O tamanho dos folículos pré-ovulatórios, nos dois grupos avaliados em nosso trabalho, foram semelhantes, porém a taxa de crescimento do GM foi maior (1,94 mm x 0,7 mm), contrariando o resultado obtido por Alonso et al. (2008) que suplementaram novilhas por 45 dias com uma mistura de melaço e uréia enriquecida com metionina e encontraram maior porcentagem de folículos ovarianos com diâmetro superior a 9 mm no grupo suplementado do que no controle (26,7% x 6,4%), durante este período. Vários estudos comprovam a relação entre o diâmetro folicular ovulatório e o resultado final da prenhez, (Perry et al., 2005; Sá Filho et al., 2010), fato este que não aconteceu no experimento.

A taxa de prenhez entre o GM não diferiu do GC, sendo similar ao resultado encontrado por Toledo et al. (2017) em um experimento com vacas leiteiras

suplementadas com metionina, onde não encontraram diferenças entre os índices de prenhez do grupo tratado e o controle, ou seja, 66,7% (96/144) e 65,5% (91/133), respectivamente.

Houve uma perda de peso nas vacas, a qual porém não afetou o ECC médio dos lotes e não trouxe prejuízos aos índices de prenhez aos 30 dias após inseminação artificial. Em seus estudos, Clements et al. (2017) suplementaram vacas de corte com Metionina Hidroxi Análogo (MHA), no período de 30 dias pré parto até 90 dias pós-parto e não obtiveram diferenças estatísticas na prenhez e no ganho de peso destes animais. Sugeriram então que a suplementação de metionina não seria utilizada para ganho de peso, mas sim para produção e composição do leite (Osório et al. 2013; Zanton et al, 2014).

Conclusões

O grupo suplementado com metionina apresentou temperaturas internas menores que o grupo controle, principalmente no último dia do protocolo de sincronização da ovulação, porém foi o dia com menor THI, não permitindo afirmar a ação da metionina sobre a temperatura interna nos bovinos.

As condições climáticas desfavoráveis ocorridas durante a condução do experimento influenciaram no nível de consumo do suplemento, que ficou muito abaixo do esperado, afetando as avaliações das respostas dos animais.

Referências Bibliográficas

- Alonso, L.; Maquivar, M.; Galina, C. S; Mendoza, G. D.; Guzmán, A.; Estrada, S.; Villareal, M. e Molina, R. 2008. Effect of ruminally protected Methionine on the productive and reproductive performance of grazing *Bos indicus* heifers raised in the humid tropics of Costa Rica. *Tropical Animal Health and Production* 40:667-672.
- Barioni, L.G.; Ferreira, A.C.; Junior, R.G. e Ramos, A.K.B. 2007. Tabelas para estimativas de ingestão de material seca de bovinos de corte em crescimento em pastejo Comunicado Técnico 142 EMBRAPA .
- Bohmanova J.; Misztal, I. e Cole, J.B. 2007. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. *Journal of Dairy Science* 90: 1947–1956,
- Clements, A.R.; Ireland, F. A.; Freitas, T.; Tucker, H. e Shike, D. W. 2017. Effects of supplementing methionine hydroxy analog on beef cow performance, milk production, reproduction, and preweaning calf performance *Journal of Dairy Science* 95:5597–5605.
- Dikmen, S. e Hansen, J.P. 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment *Journal of Dairy Science* 92:109-116.
- Gao H.; Wu, G.; Spencer, T.E.; Johnson, G.A.; Li, X.L. e BLAZER, F.W. 2009. Select nutrientes in the ovine uterine lumen. In Amino acids, glucose and ions in uterine lumenal flushing of cyclic and pregnant ewes *Biology of Reproduction* 80:86-93.
- Graulet, B.; Richard, C. e Robert, J. C. 2005. Methionine availability in plasma of dairy cows supplemented with methionine hydroxy analog isopropyl ester *Journal of Dairy Science* 88:3640-3649.
- Hasek, B.E.; Stewart, L.K.; Henagan, T.M.; Boudreau, A.; Leonard, N.R.; Blank, C.; Shin, J.; Huypens, P. ; Malloy, V.L.; Plaisance, E.P.; Krajcik, R.A. ; Orentreich, N. e Gettys, T.W. 2010. Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 299:728-739.
- Hugentobler, S.A.; Diskin, M. G.; Leese, H. J.; Humpherson, P. G.; Watson, T.; Sreenan, J.T. e Morris, D. G. 2007. Amino Acids in Oviduct and Uterine Fluid and Blood Plasma During the Estrous Cycle in the Bovine *Molecular Reproduction and Development* 74:445–45.
- Key, N.; Sneeringer, S. e Marquardt, D. 2014. Climate Change, Heat Stress, and U.S. Dairy Production, ERR-175, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service.
- Li, L.; Wu, J.; Luo, Y.; Sun, Y. e Wang, G. 2016. The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids and apoptosis in bovine granulosa cells. *Cell Stress and Chaperones*, 21: 467- 475.
- Lowman, B.G.; Scott, N. e Somerville, S. 1973. Condition scoring beef cattle. Edinburgh: East of Scotland College of Agriculture Bulletin 6:8.
- Nardoni, A.; Ronchi, B.; Lacetera, N.; Ranieri, M.S. e Bernabucci, U. 2010. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livestock Science* 130:57-69.
- NRC 2001 Nutrient requirements of beef cattle 7th rev. ed. National Academies Press, Washington, DC.
- Osorio, J. S.; Ji, P.; Drackley, J.K.; Luchini, D. e Loores, J. J. 2013. Supplementing Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. *Journal of Dairy Science* 96:6248–6263.

- Patil, Y. N.; Dille, K. N.; Burk, D. H.; Cortez, C. C. e Gettys, T. W. 2015. Cellular and molecular remodeling of inguinal adipose tissue mitochondria by dietary methionine restriction *Journal of Nutritional Biochemistry* 26:1235-1247.
- Pereira, C.C.J. 2005. Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal. Belo Horizonte: *FEPMVZ*. p. 195.
- Perry, G.A.; Smith, M.F.; Lucy, M.C.; Green, J.A.; Parks, T.E.; Macneil, M.D.; Roberts, A.J. e Geary, T.W. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 5268-5273.
- Polsky, L. e Von Keyserlingk, M. A. G. 2017. Effects of heat stress on dairy cattle welfare *Journal of Dairy Science* 100: 8645–8657.
- Roth, Z. 2015. Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function *Journal of Animal Science* 93: 2034–2044.
- Sá Filho, M.F.; Crespilho, A.M.; Santos, J.E.; Perry, G.A. e Baruselli, P.S. 2010. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows *Animal Reproduction Science* 120: 23-30.
- Toledo, M.Z.; Baez, G.M.; Garcia-Guerra, A.; Lobos, N.E.; Guenther, J. N.; Trevisol, E.; Luchini, D.; Shaver, R.D. e Wiltbank, M.C. 2017. Effect of feeding rumen-protected methionine on productive and reproductive performance of dairy cows *Plos One* 12: e0189117.
- Vasconcelos, J.L.M. e Demétrio, D.G.B. 2011. Manejo reprodutivo de vacas sob estresse calórico *Revista Brasileira de Zootecnia* 40: 396-401.
- Wilm, H.G.; Costello, D.S. e Clipe, G.E. 1944. Estimating forage yield by the double sampling method *Journal American Society of Agronomy* 36:194-203.
- Wiltbank, M.C.; Baez, G.M.; Garcia-Guerra, A.; Toledo, M.Z.; Monteiro, P.L.J.; Melo, L.F.; Ochoa, J.C. e Sartori, R. 2017. Momento y causa de perdidas fisiológica de la preñez (no relacionada con enfermedad) em vacas lecheras lactantes y receptoras de embriones *In Anais 12º Simposio Internacional de Reproduccion Animal* 73-102 Córdoba .
- Zanton, G. I.; Bowman, G.R.; Vázquez-Añón, M. e Rode, L.M. 2014. Meta-analysis of lactation performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or postruminal infusion of methionine. *Journal of Dairy Science* 97: 7085–7101.

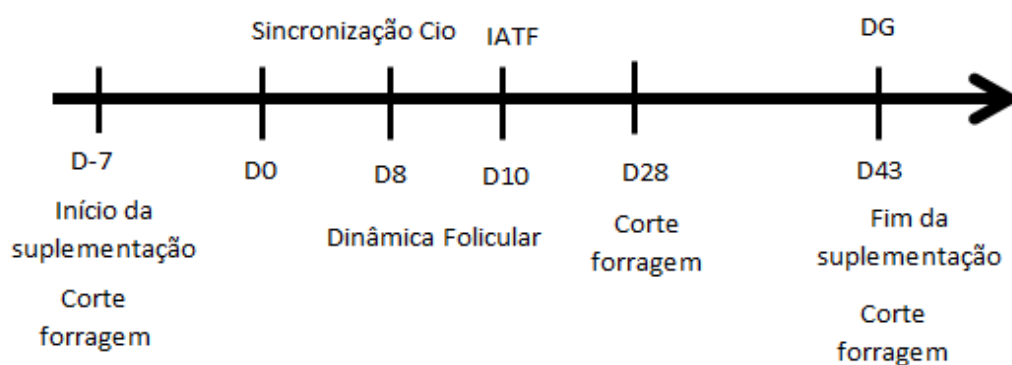


Figura 1 Cronograma das atividades realizadas durante a condução do experimento

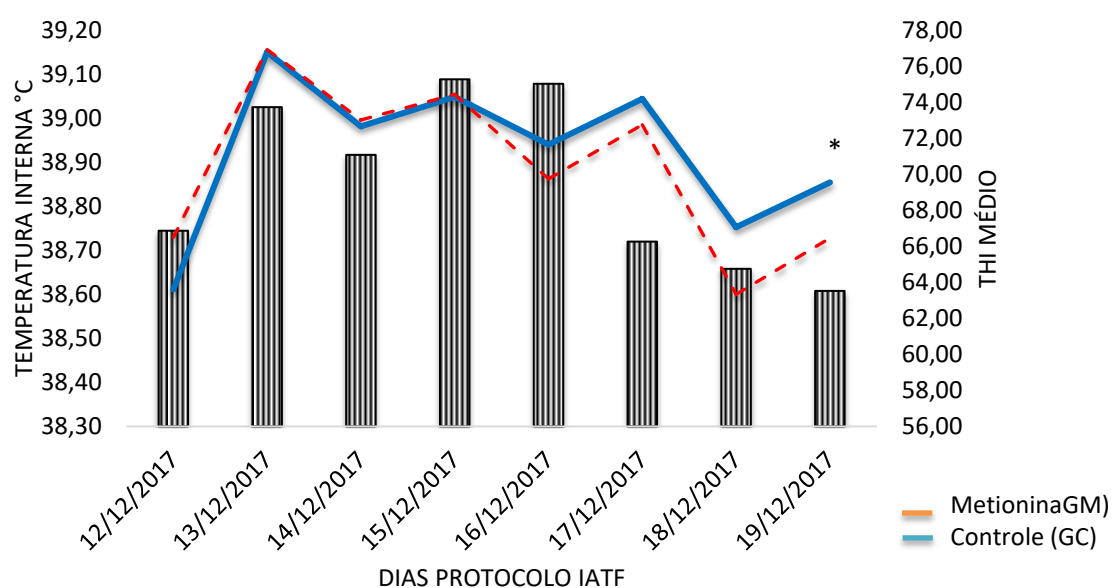


Figura 2 Temperatura interna das vacas do grupo suplementado com metionina (GM) e sem metionina (GC) durante a duração de um protocolo de sincronização da ovulação. Nas barras é apresentado o THI de cada período. * $P \leq 0,05$

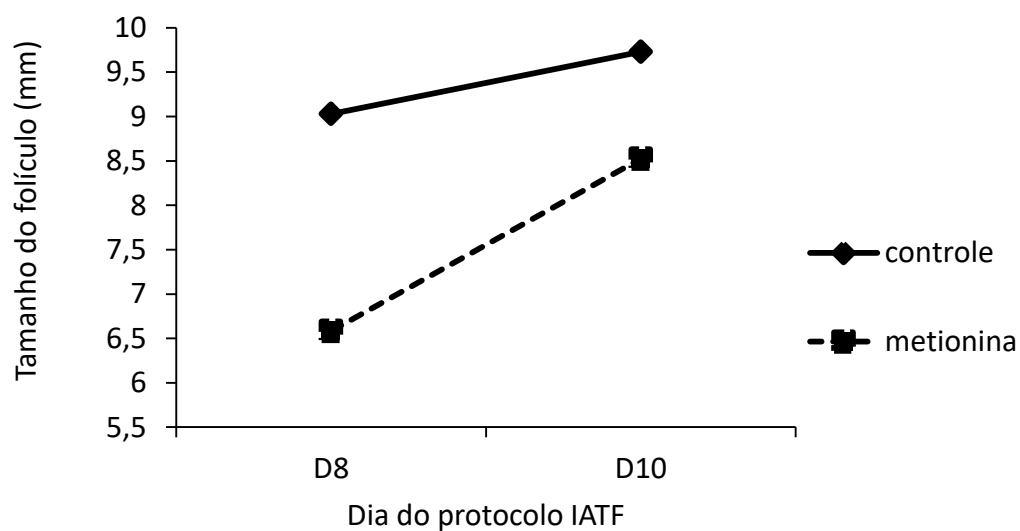


Figura 3 Tamanho dos folículos dos grupos suplementados com metionina (GM) e controle (GC) nos dias D8 e D10 do protocolo de sincronização de cio. ($P \geq 0,5$)

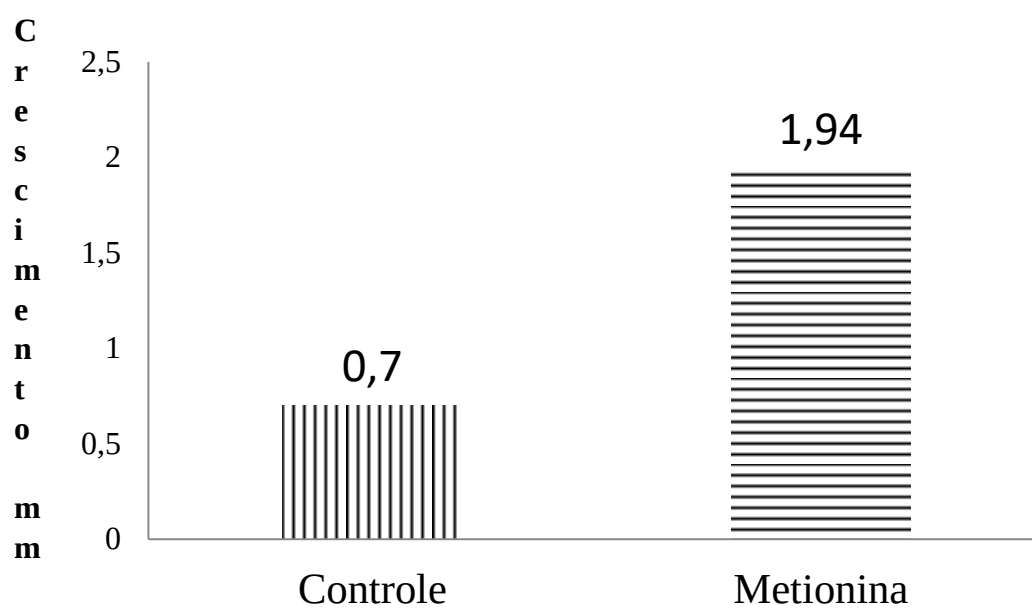


Figura 4. Taxa de crescimento folicular entre o grupo controle e o grupo metionina durante D8 e D10 do protocolo de sincronização da ovulação ($P \geq 0,5$).

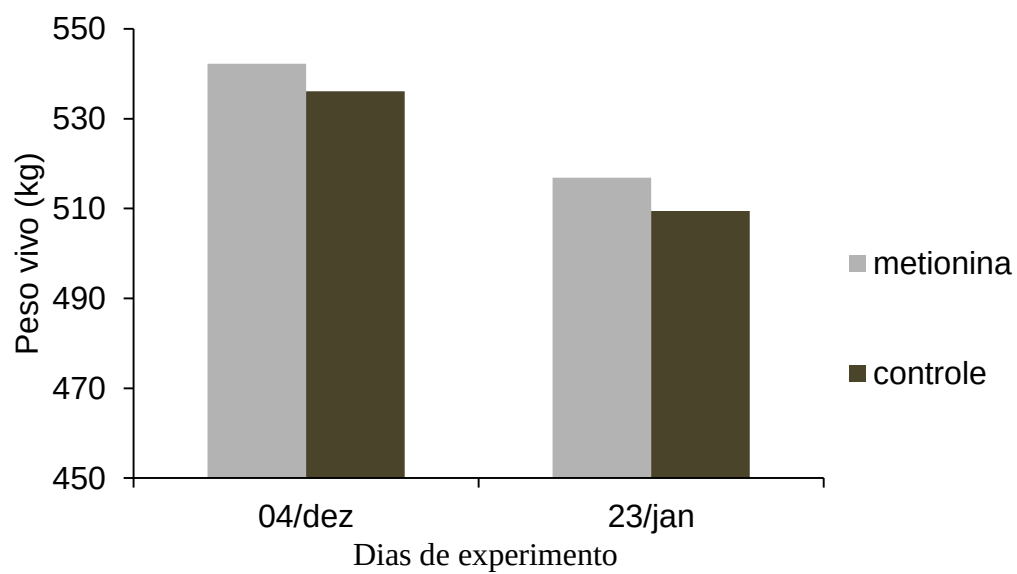


Figura 5. Evolução do peso vivo das vacas dos grupos suplementados com metionina (GM) e controle (GC) durante o período experimental (de 04/12/17 até 23/01/18).

Tabela 1. Resultado das análises bromatológica das pastagens em três coletas realizadas durante o período experimental nos poteiros do grupo metionina (5) e grupo controle (6)

	Piquete 5			Piquete 6		
	02/12	08/01	23/01	02/12	08/01	23/01
Matéria Seca kg/ha	1059	735	827	717	765	809
Cinza Bruta (%)	7,1	5,9	7,9	8,0	6,8	8,1
Extrato Etéreo (%)	1,9	4,3	3,0	2,5	3,8	3,4
Proteína Bruta (%)	8,5	10,3	11,3	11,1	10,0	15,2
FDN (%)	60,9	67,7	67,8	61,0	67,0	64,0
FDA (%)	28,8	39,5	52,4	32,2	40,3	40,0

FDN – fibra em detergente neutro; FDA fibra em detergente ácido

Tabela 2 Níveis mínimos de garantias do sal mineral utilizado na suplementação dos dois lotes, sendo que em um (grupo metionina) foi adicionada a metionina

Componentes	Mínimo
Cálcio	150 g/ kg
Cobalto (g/ kg)	15,8 mg/ kg
Cobre (g/ kg)	420 mg/ kg
Enxofre (g/ kg)	10,5 g/ kg
Fosforo (g/ kg)	55 g/ kg
Iodo (g/ kg)	31,5 mg/ kg
Magnésio (g/ kg)	10 g/ kg
Narasina	780 mg/ kg (máximo)
Selenio	10,5 mg/ kg
Sódio	50 g/ kg
Zinco	2100 mg/ kg

Tabela 3. Consumo de sal mineral dos grupos suplementados com metionina (GM) e controle (GC) durante o período de 01/12/16 a 23/01/17 (g/ cabeça/dia).

GRUPO	08/dez	21/dez	28/dez	23/jan	Média
METIONINA	40	33	23	31	32
CONTROLE	25	47	31	35	34,5

Tabela 4. Resultado do diagnóstico de gestação com 30 dias após a IATF, realizado com auxílio de ultrassonografia nas vacas com cria ao pé dos grupos suplementados com metionina (GM) e controle (GC) ($P \geq 0,5$).

	PRENHAS	VAZIAS
METIONINA	58,5% (30/51)	41,5% (21/51)
CONTROLE	59,6 % (28/47)	40,4 % (19/47)

Considerações finais

Os resultados apresentados pela literatura recente apresentam vantagens com a utilização da suplementação de metionina em gado de leite, principalmente no incremento de proteína no leite. Com relação à reprodução, os benefícios aparecem nos primeiros dias de vida do embrião no ambiente uterino. Já em bovinos de corte são escassos os resultados obtidos pela pesquisa, merecendo mais estudos sobre esse assunto.

Com base nos resultados obtidos em nossos trabalhos, a suplementação estratégica com metionina protegida apresenta condições promissoras de ser utilizada, principalmente em novilhas criadas em campo nativo, onde as deficiências de aminoácidos são mais difíceis de serem controladas, e se for comprovada sua ação quanto à redução dos índices de mortalidade embrionária.