



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS (PPGMCF)

LUIS FERNANDO DE SOUSA CAIXETA

**Avaliação do uso de aditivos aliados ao manejo alimentar no  
desenvolvimento do trato digestivo de bezerros**

**GOIÂNIA**

**2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese

#### 2. Nome completo do autor

Luis Fernando de Sousa Caixeta

#### 3. Título do trabalho

AVALIAÇÃO DO USO DE ADITIVOS ALIADOS AO MANEJO ALIMENTAR NO DESENVOLVIMENTO DO TRATO DIGESTIVO DE BEZERROS

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Reginaldo Nassar Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 05/07/2021, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **LUÍS FERNANDO DE SOUSA CAIXETA, Discente**, em 07/07/2021, às 19:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2175765** e o código CRC **D1C3B0E7**.

---

Referência: Processo nº 23070.014213/2021-23

SEI nº 2175765

LUIS FERNANDO DE SOUSA CAIXETA

**Avaliação do uso de aditivos aliados ao manejo alimentar no desenvolvimento do trato digestivo de bezerros**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis) no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências fisiológicas.

Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Linha de pesquisa: Fisiologia da digestão.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio

**GOIÂNIA**

**2021**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Caixeta, Luis Fernando de Sousa  
AVALIAÇÃO DO USO DE ADITIVOS ALIADOS AO MANEJO ALIMENTAR NO DESENVOLVIMENTO DO TRATO DIGESTIVO DE BEZERROS [manuscrito] / Luis Fernando de Sousa Caixeta. - 2021. LXX, 70 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira; co-orientador Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Ganho compensatório. 2. restrição alimentar. 3. permeabilidade intestinal. 4. suplementação. I. Ferreira, Reginaldo Nassar, orient. II. Título.

CDU 612.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ATA DE DEFESA DE TESE**

Ata Nº 04 da sessão de Defesa de Tese de **Luis Fernando de Sousa Caixeta** que confere o título de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de concentração em Ciências Fisiológicas.

Aos catorze dias do mês de abril de 2021, a partir das 08:00 h, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "AVALIAÇÃO DO USO DE ADITIVOS ALIADOS AO MANEJO ALIMENTAR NO DESENVOLVIMENTO DO TRATO DIGESTIVO DE BEZERROS". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Reginaldo Nassar Ferreira (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Manoel Francisco Biancardi (ICB - UFG), membro titular externo; Professora Doutora Karen Martins Leão (IFGoiano), membro titular externo; Professora Doutora Elizabeth Pereira Mendes (ICB - UFG), membro titular externo; Professora Doutora Tainá Silvestre Moreira (Pennsylvania State University), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Reginaldo Nassar Ferreira, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos catorze dias do mês de abril de 2021.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Manoel Francisco Biancardi, Professor do Magistério Superior**, em 14/04/2021, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elizabeth Pereira Mendes, Professor do Magistério Superior**, em 14/04/2021, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Reginaldo Nassar Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 14/04/2021, às 11:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karen Martins Leão, Usuário Externo**, em 14/04/2021, às 11:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tainá Silvestre Moreira, Usuário Externo**, em 14/04/2021, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1956752** e o código CRC **915338C1**.

Referência: Processo nº 23070.014213/2021-23

SEI nº 1956752

*“A dúvida prudente é considerada o farol do sábio”*

*- William Shakespeare*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por ter me dado saúde, força de vontade para enfrentar todos os desafios durante toda minha jornada, para superar os desafios e acreditar que seria possível.

Aos meus pais, Salvador Filho e Mariana, que sempre me apoiaram e incentivaram a continuar, que sempre se sacrificaram para proporcionar tudo de melhor para mim. O amor e compreensão de vocês me inspiram, adiando às vezes seus próprios sonhos para que o meu se tornasse realidade.

Aos meus irmãos, Salvador Neto e Luciana, pela compreensão e amizade, que sempre unidos buscamos vencer os desafios.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira, pelos anos de orientação, paciência e pelos conhecimentos transmitidos, pelas oportunidades oferecidas e, sobretudo, pelo grande exemplo de profissionalismo.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF) da associada UFG, pelos conhecimentos transmitidos, pelos conselhos e pela contribuição no meu crescimento profissional.

À Natalia Balls pela amizade e incentivo, sempre demonstrando apoio e proporcionando momentos inesquecíveis.

À equipe de Setor de Campo do Laboratório de Fisiologia da Digestão (SEFID), Luiz Eduardo, Débora, Fernando, Gabriela, Matheus e Renata, que compartilharam comigo muito trabalho e momentos de diversão.

Aos colegas, Gabriel Camargo e Carla, pela amizade e parceria durante esse período.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de frequentar algumas das melhores Universidades do país.

Aos órgãos financiadores e empresas CNPq, Adisseo e Safeeds pela concessão de bolsa e/ou apoio financeiro que viabilizaram a execução deste projeto.

Enfim a todos que de forma direta ou indireta colaboraram para minha formação, possibilitando que esse sonho se realizasse. Sei que foram muitos por isso o meu muito OBRIGADO a todos.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	IV
Lista de Figuras.....	V
Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
1. Introdução.....	2
1.1. Desenvolvimento do trato digestivo de ruminantes.....	2
1.2. Restrição alimentar e ganho compensatório.....	5
1.3. Análogo de metionina.....	6
1.4. Óleos essenciais.....	8
1.5. Saúde intestinal.....	10
1.6. Permeabilidade intestinal.....	12
2. Justificativa e objetivos.....	16
2.1. Justificativa.....	16
2.2. Objetivo Geral.....	16
2.3. Objetivo específico.....	16
3. Metodologia.....	16
3.1. Animais, instalações e manejo.....	16
3.2. Coleta de dados e amostras.....	18
3.2.1. Crescimento corporal.....	18
3.2.2. Perfil metabólico.....	19
3.2.3. Análises morfológicas e morfométricas.....	19
3.3. Análises Laboratoriais e histológicas .....	20
3.3.1. Parâmetros bioquímicos.....	20
3.3.2. Quantificações séricas.....	21
3.3.3. Preparo das lâminas histológicas do rúmen, abomaso e intestino delgado.....	22
3.3.4. Análise imuno-histoquímica.....	24
3.3.5. Quantificação de células PCNA positivas.....	24
3.3.6. Western Blotting.....	25
3.4. Análise estatísticas.....	27
4. Resultados.....	28
4.1. Parâmetros zootécnicos.....	28
4.2. Parâmetros séricos bioquímicos.....	31

4.3. Parâmetros morfológicos.....	35
4.4. Western Blotting.....	40
5. Discussão.....	41
6. Conclusões.....	46
7. Referências Bibliográficas.....	47

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AGCC** – Ácidos graxos de cadeia curta;

**AGPs** – Antimicrobianos promotores de crescimento;

**CEUA-UFG** – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás;

**EC** – Comissão Européia;

**GAMA** – Gama Glutamil Transpeptidase;

**GH** – Hormônio do crescimento;

**GP1** – Período de crescimento 1;

**GP2** – Período de crescimento 2;

**HE** - Hematoxilina-eosina;

**HMB** – Ácido 2-hidróxi 4-metiltio-butanóico;

**ICB II** – Instituto de Ciências Biológicas;

**IGA** – Imunoglobulina A;

**IGF-I** – Fator de crescimento semelhantes à insulina tipo 1;

**JO** – Junção oclusiva;

**MET** – Metionina (Quando não referente ao tratamento);

**MET** – Tratamento 2: alimentação sem restrição de leite nos dois períodos (6 L/animal/dia) e inclusão de 4g/MET/dia nos dois períodos;

**OE** – Óleos essenciais (Quando não referente ao tratamento);

**OE** – Tratamento 4: alimentação sem restrição de leite nos dois períodos (6 L/animal/dia) e inclusão de 1,5g/OE/dia nos dois períodos;

**RES+MET** – Tratamento 1: alimentação com restrição de leite no primeiro período (3 L/animal/dia) e sem restrição alimentar no segundo período (6 L/animal/dia) e inclusão de 4g/MET/dia nos dois períodos;

**RES+OE** – Tratamento 3: alimentação com restrição de leite no primeiro período (3 L/animal/dia) e sem restrição alimentar no segundo período (6 L/animal/dia) e inclusão de 1,5g/OE/dia nos dois períodos;

**TGI** - Trato gastrintestinal;

**TGO** – Transaminase Glutâmica Oxalacética;

**TGP** – Transaminase Glutâmica Pirúvica;

**TJs** – Tight junctions;

**ZO** – Zona de oclusão;

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo da formação da goteira esofágica em bezerros.....	3
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo do desenvolvimento dos compartimentos estomacais de bezerros.....	4
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrativo das Tight junctions (TJs).....	13
<b>Figura 4.</b> Junções epiteliais estreitas (TJs), que são compostas de TJ claudina.....	14
<b>Figura 5.</b> Esquema ilustrativo da linha de tempo da restrição alimentar.....	18
<b>Figura 6:</b> Desempenho de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos em dois períodos de 28 dias e no total de 56 dias.....	29
<b>Figura 7:</b> Perfil de consumo de alimentos sólidos de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos em dois períodos de 28 dias e no total de 56 dias.....	30
<b>Figura 8:</b> Composição de carcaça de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos ao final de 56 dias de experimentação.....	31
<b>Figura 9:</b> Parâmetros metabólicos de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos em dois períodos de 28 dias.....	33
<b>Figura 10:</b> Concentrações séricas de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos ao final do segundo período experimental.....	35
<b>Figura 11.</b> Aspectos morfológicos gerais do rúmen bovino corado com HE. Pode-se observar uma heterogeneidade morfológica das papilas ruminais entre os diferentes grupos experimentais.....	36
<b>Figura 12.</b> Aspectos morfológicos gerais do abomaso bovino corado com HE. Pode-se observar uma variação na espessura da mucosa entre os diferentes grupos experimentais....	36
<b>Figura 13.</b> Aspectos morfológicos de variáveis nucleares (área, perímetro e fator formam nuclear) de hepatócitos bovino corado com HE.....	38
<b>Figura 14.</b> Imunohistoquímica para Claudina-1 de vilosidades duodenais dos diferentes grupos experimentais.....	39
<b>Figura 15.</b> Células PCNA positivas (%) de bezerros dos diferentes grupos experimentais..	40
<b>Figura 16.</b> Expressão do receptor de grelina (GHSR1) no hipotálamo de bezerros dos diferentes grupos experimentais.....	41

## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da restrição alimentar através da quantidade de leite oferecida, aliado ao mecanismo de ganho compensatório e suplementados com aminoácido essencial (Análogo de metionina – MET) e óleos essenciais (OE), no desenvolvimento e saúde intestinal de bezerros. Foram utilizados vinte bezerros que foram pesados e submetidos a quatro tratamentos por dois períodos de 28 dias: Tratamento 1 – RES+MET: alimentação com restrição de leite no primeiro período (3 L/animal/dia) e sem restrição alimentar no segundo período (6 L/animal/dia) e inclusão de 4g/MET/dia nos dois períodos; Tratamento 2 – MET: alimentação sem restrição de leite nos dois períodos (6 L/animal/dia) e inclusão de 4g/MET/dia nos dois períodos; Tratamento 3 – RES+OE: alimentação com restrição de leite no primeiro período (3 L/animal/dia) e sem restrição alimentar no segundo período (6 L/animal/dia) e inclusão de 1,5g/OE/dia nos dois períodos; Tratamento 4 – OE: alimentação sem restrição de leite nos dois períodos (6 L/animal/dia) e inclusão de 1,5g/OE/dia nos dois períodos; Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA-UFG) protocolo N. 095/17. Foi verificado o ganho de peso e consumo de ração, avaliado o perfil metabólico e realizadas análises morfológicas e morfométricas do rúmen, abomaso, duodeno e jejuno. A variação de peso durante o período 1 para os animais do grupo RES+MET foi menor que o MET, não havendo diferença entre os demais grupos, já na variação total do peso vivo ao final do experimento foi semelhante entre os grupos. Não houve diferenças entre grupos e períodos de tratamentos com relação aos níveis séricos de lactato, fosfatase alcalina e creatinina. As Proteínas Totais apresentaram diferenças entre os períodos para os grupos RES+MET, RES+OE e OE. Quanto aos aspectos morfológicos gerais do rúmen bovino constatou-se que os grupos restritos possuem alturas de papilas inferiores aos grupos não restritos. O desenvolvimento das papilas ruminais são afetadas pela restrição alimentar. Sendo que o análogo de metionina atua de forma trófica no desenvolvimento da mucosa abomasal. O análogo de metionina diminui as alterações morfológicas de núcleo de hepatócitos em função das manobras nutricionais advindas do ganho compensatório. A permeabilidade intestinal é mantida pela ação do análogo de metionina. Os óleos essenciais potencializam a expressão de receptores GHS-R1a no hipotálamo.

**Palavras-Chave:** Ganho compensatório; permeabilidade intestinal; restrição alimentar; suplementação.

## ABSTRACT

This study examines the effect of restricted feeding, based on the amount of milk supplied, combined with the compensatory gain mechanism and supplementation with an essential amino acid (methionine analogue - MET) or essential oils (EO) on the intestinal development and intestinal health of calves. Twenty calves were weighed and subjected to four treatments (feeding regimes) for two 28-day periods, as follows: Treatment 1 (RES+MET) - restricted milk intake in the first period (3 L/animal/day) and no restriction in the second period (6 L/animal/day) plus 4 g MET/day in both periods; Treatment 2 (MET) - no milk restriction in either period (6 L/animal/day) plus 4 g MET/day in both periods; Treatment 3 (RES+EO) - milk restriction in the first period (3 L/animal/day) and no restriction in the second period (6 L/animal/day) plus 1.5 g EO/day in both periods; and Treatment 4 (EO) - no milk restriction in either period (6 L/animal/day) plus 1.5 g EO/day in both periods. Weight change in period 1 was lower in the animals on RES+MET than in the MET group, and no difference was detected between the other groups. Total live weight change at the end of the experiment was similar between the groups. There were no differences between treatment groups and periods for serum lactate, alkaline phosphatase or creatinine levels. Total proteins differed between the periods in the RES+MET, RES+EO and EO groups. Rumen papillae height was lower in the restricted groups. The methionine analogue reduced morphological changes in the hepatocyte nucleus as a result of the nutritional mechanisms induced by compensatory gain. Intestinal integrity was maintained by the action of the methionine analogue. Essential oils enhance the expression of GHS-R1a receptors in the hypothalamus.

**Key Words:** Compensatory gain, intestinal permeability, restricted feeding, supplementation.

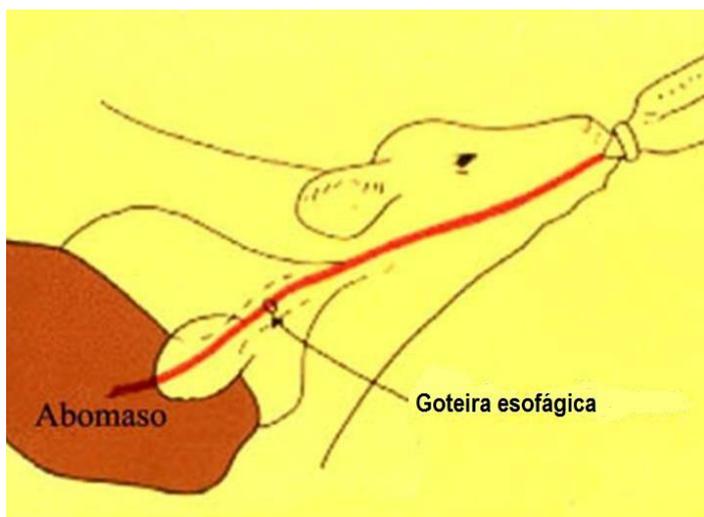
## **1. Introdução**

### **1.1. Desenvolvimento do trato digestivo de ruminantes**

A criação de bezerros tem como objetivo fazer com que animais, fisiologicamente pré-ruminantes, se tornem ruminantes funcionais ao menor custo possível e sem prejuízos para o desempenho futuro (Paris et al., 2012). Desta forma, o conhecimento dos processos que envolvem os animais na fase de cria, principalmente o entendimento do estabelecimento da microbiota ruminal e a adoção de técnicas de manejo alimentar, é indispensável na exploração de animais com alto potencial genético e produtivo.

Os ruminantes possuem a capacidade de consumir alimentos impróprios para o consumo humano, convertendo-os em produtos de alto valor biológico (leite, carne). Sendo assim a principal função do sistema digestório é a digestão e absorção dos nutrientes e a excreção dos produtos não utilizados. O sistema digestório dos ruminantes é constituído de: boca, faringe, esôfago, estômago (rúmen, retículo, omaso e abomaso), intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon e reto), ânus além de glândulas anexas (glândula salivares, pâncreas e fígado) (Lana 2007).

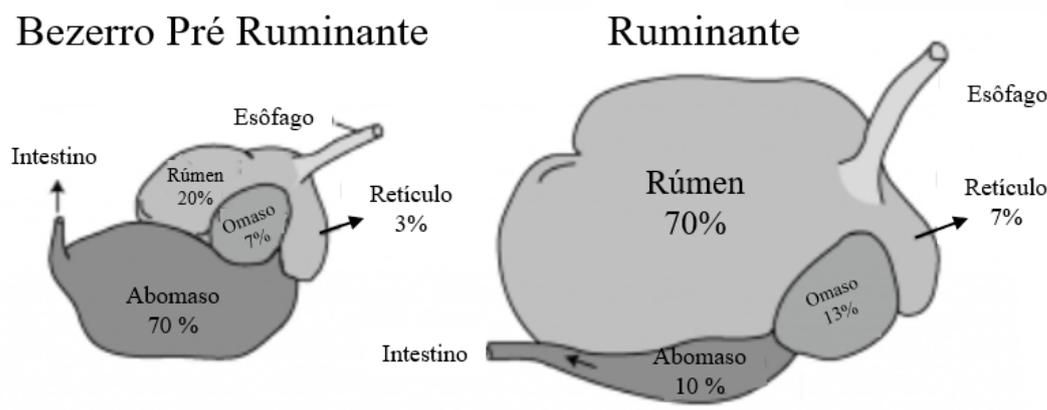
Ao nascerem, os bezerros possuem características anatômicas e fisiológicas que não os caracterizam como ruminantes funcionais, sendo o leite a principal fonte de nutrientes nas primeiras semanas de vida (Miranda et al., 2017). Quando o leite passa através da faringe, estimula quimiorreceptores com vias aferentes do nervo glossofaríngeo. O impulso sensorial é integrado ao bulbo e o impulso eferente vagal provoca o fechamento do sulco reticular e relaxamento do orifício retículo-omasal e canal omasal. A contração do sulco reticular produz um tubo temporário que conecta os orifícios da cárdia e retículo-omasal, conhecido como goteira esofágica, desviando o leite do rúmen-retículo e terminando no abomaso onde sofrerá digestão enzimática (Figura 1) (Berchielli et al., 2006).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo da formação da goteira esofágica em bezerros.  
Fonte: Adaptado de Getty, R. 2008.

Durante o aleitamento ocorre o desenvolvimento funcional dos compartimentos do trato digestivo (Mancio et al., 2005) e as maiores mudanças acontecem no rumino-retículo, o qual será colonizado por microrganismos e desenvolverá sua musculatura e mucosa (Nussio et al., 2003). A utilização de dieta volumosa e concentrada faz com que o rúmen, retículo e o omaso levem de duas a três semanas, respectivamente, para dobrar o seu peso. Após a primeira semana, a velocidade de crescimento do abomaso cai, e com oito semanas, o rúmen triplica as suas dimensões, sendo que nessa mesma fase o rúmen-retículo aumenta seu peso oito vezes e o omaso cinco vezes. As alterações nas proporções do rúmen-retículo e abomaso são muito rápidas nas primeiras semanas, alcançando níveis estáveis nas oito semanas de idade (Silva et al., 2008). A ordem de crescimento dos órgãos digestivos, desde o nascimento até a idade adulta, é: rúmen, retículo, omaso, ceco, intestino grosso e reto, intestino delgado, abomaso e esôfago (Church 1976).

Observa-se (figura 2) que nas duas primeiras semanas o abomaso representa cerca de 70% do volume dos 4 compartimentos estomacais e o rúmen-retículo-omaso, 30%. À medida que a idade aproxima da oitava semana, nota-se que as dimensões do abomaso são reduzidas a valores próximos dos 50%. Quando o animal atinge a maturidade fisiológica, o rúmen passa a ocupar cerca de 70% das dimensões estomacais (Figura 2) (Monção et al., 2013).



**Figura 2.** Esquema ilustrativo do desenvolvimento dos compartimentos estomacais de bezerros. Fonte: Adaptado de Heinrichs, et al., 2003.

A transição dos bezerros à condição de ruminante funcional ocorre na oitava semana de vida e está associada ao consumo de alimentos sólidos e à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente os ácidos butírico e propiônico (Baldwin et al., 2004). A ingestão de alimentos sólidos, principalmente volumosos, induz o desenvolvimento dos estratos epiteliais e crescimento das papilas, grau de queratinização, pigmentação e desenvolvimento da musculatura ruminal (Oliveira et al., 2007). O crescimento das papilas ruminais e da composição da microbiota que é responsável pela produção, principalmente de AGCC e proteína de origem microbiana, ambos são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento corporal do animal, possibilitando o abate precoce.

O comprimento médio de uma papila de um bezerro recém-nascido é de aproximadamente 1 mm, no entanto, elas crescem e atingem de 5 a 7 mm na oitava semana de vida (Beharka et al., 1998). As papilas são responsáveis pelo movimento da digesta e aumento da área absorptiva, pois a maior parte da absorção de AGCC e outros metabólicos ocorre no nível de papilas ruminais (Harrison et al., 1960). A formação das papilas na parede ruminal é de grande importância porque, além de aumentar a superfície da mucosa, alarga o sítio de absorção; e, posteriormente, com o alargamento, possibilita maior superfície de contato do epitélio com o alimento. Com isso, as papilas, quando bem desenvolvidas, aumentam a superfície absorptiva do rúmen, e têm distribuição, número e tamanho estreitamente relacionado ao hábito alimentar, tamanho de partícula, disponibilidade e digestibilidade dos alimentos (Van Soest 1994).

O desenvolvimento do intestino também está intimamente ligado ao desempenho do animal. O comprimento do intestino está sujeito a um aumento significativo nas primeiras semanas de vida com variações de 30 a 50 m em função da raça e individualidade de cada animal (Sauter et al., 2004). O intestino delgado é subdividido em duodeno, jejuno e íleo e

representa a maior porção dos intestinos nos bovinos, sendo suas principais funções a digestão e absorção de nutrientes (Naburrs 1995). A mucosa do intestino delgado possui vilosidades e microvilosidades que são estruturas especializadas para facilitar a absorção de nutrientes (Bühler et al., 1998). Na base das vilosidades encontram-se as criptas, que são responsáveis pela constante renovação celular no vilão. Para Naburrs (1995), é desejável que a mucosa possua vilosidades altas e criptas rasas, contudo, essa relação e as variações na morfologia intestinal podem ser determinadas pela alimentação.

Como salientado, a nutrição exerce efeito marcante sobre o desenvolvimento dos compartimentos dos estômagos dos ruminantes, desenvolvimento das papilas ruminais e colonização por microorganismos. O desenvolvimento das papilas ruminais é influenciado pela presença de AGCC durante a fermentação dos carboidratos, indicando que a ingestão de volumosos e concentrados é o agente mais importante para promover as mudanças anatômicas, fisiológicas e metabólicas no trato dos ruminantes jovens, podendo ser aceleradas ou retardadas, de acordo com o regime alimentar em que estão submetidos esses animais (Azevedo et al., 2013).

## **1.2. Restrição alimentar e ganho compensatório**

A definição de ganho compensatório proposta por Muller e Teixeira Primo (1986), refere-se ao fenômeno manifestado em mamíferos e aves, os quais, após um período de restrição alimentar suficiente para deprimir o crescimento contínuo, apresentam taxa de crescimento acima do normal, ao acabar a restrição e reiniciar uma alimentação adequada. Um dos principais objetivos de instalar um programa de alimentação que inclua a restrição alimentar é a possibilidade de reduzir a exigência de alimentos e, em certos casos, reduzir a taxa de metabolismo basal (O'Donovan 1984).

Como resultado do uso desse manejo, os animais apresentam menor exigência para energia de manutenção devido ao menor peso corporal e adaptação metabólica com consequente ganho compensatório no período de realimentação (Leeson e Zubair 1997). Estudos anteriores já comprovaram que bovinos submetidos à restrição alimentar apresentam uma recuperação animal aparentemente maior, após perda elevada de peso em um período curto, quando comparada à mesma perda ocorrida em um período longo (Ryan 1990; Nicol e Kitessa 1995). As respostas no ganho compensatório são variáveis devido aos inúmeros fatores envolvidos na manifestação do fenômeno, como por exemplo, fatores genéticos, fisiológicos, nutricionais, metabólicos, endócrinos e aspectos comportamentais.

O ganho compensatório pode apresentar curta duração, apesar de se verificarem diversos efeitos nos animais durante sua ocorrência. A ingestão de alimentos nas três ou quatro semanas após a restrição alimentar é variável, sendo modificada pelo tamanho do trato gastrintestinal (TGI), pela capacidade de absorção do seu epitélio e pela capacidade do fígado de metabolizar os nutrientes. A exigência de energia metabolizável para manutenção é reduzida para animais em compensação em até 20%, segundo o NRC (1996), resultando em maior disponibilidade de energia para produção, em uma mesma ingestão de alimentos. Essa exigência menor está ligada ao menor tamanho dos órgãos internos devido à restrição alimentar (Barbosa et al., 2016).

Para os pesquisadores Ryan (1990) e Alves (2003) um dos principais elementos que controlam os resultados é a natureza da restrição alimentar. Alterações na dieta são capazes de modificar o metabolismo dos ruminantes, alterando hormônios metabólicos, principalmente se comparados antes e depois do período de privação (Webb et al., 2004). O eixo somatotrófico, constituído principalmente pelo hormônio do crescimento (GH), pelos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e IGF-II), pelos hormônios da tireoide T3 e T4, pelas proteínas transportadoras e pelos receptores, exerce papel fundamental sobre o controle do metabolismo (Cerviere et al., 2005).

Durante o período de restrição alimentar há diminuição da taxa de crescimento o que causa alterações nos níveis de IGF-I, ocorrendo aumento deste hormônio no período de ganho compensatório devido ao acelerado ganho de peso (Chen et al., 2012).

Parâmetros sanguíneos também são indicativos das alterações metabólicas pelas quais os animais passam no período de restrição alimentar, como redução da concentração de uréia, glicose e proteína total. Também podem ser observadas elevações nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados e nitrogênio ligado a aminoácidos. As diferenças metabólicas observadas durante a restrição desapareceram no final do período de realimentação (Fontes et al., 2007).

### **1.3. Análogo de metionina**

Em busca de alternativas que melhorem a eficiência alimentar dos ruminantes, a utilização de aditivos e ingredientes alternativos na alimentação animal, demonstra ser boa opção para redução de custo da dieta bem como de melhorias na produção (Benchaar et al., 2008). O desafio de aumentar a produção sem causar impactos ambientais negativos, desafia os sistemas de produção a buscar produtos que atendam critérios de qualidade e segurança alimentar (Borba et al., 2014).

As pesquisas avançam constantemente em relação à composição dos alimentos e as exigências nutricionais dos animais. Assim surgem novas demandas de produtos que permitam atender minuciosamente as exigências de cada nutriente da dieta, visando incrementar a produção animal ou modificar a qualidade do produto final. Esta possibilidade tem estimulado os profissionais da produção animal ao longo dos anos a buscarem, através da manipulação da dieta, a melhoria do crescimento muscular e a modificação no conteúdo de gordura da carcaça (Paulo; Rigo 2012).

As variações metabólicas provocadas pela suplementação de aminoácidos essenciais para ruminantes melhoram a eficiência da conversão alimentar em consequência de: i) aumentos na densidade bacteriana no rúmen; ii) maior passagem de aminoácidos para o intestino delgado sem sofrer degradação microbiana; iii) acréscimo na concentração de nitrogênio no plasma (Lee et al., 2012).

Os ruminantes possuem exigência nutricional real por aminoácidos e não, pura e simplesmente, por proteína bruta. Dentro de um processo normal de evolução na área da nutrição proteica busca-se conhecer os benefícios da correta nutrição de aminoácidos essenciais (Santos 1997). Uma ração deficiente em aminoácidos essenciais para cada espécie tem o mesmo efeito sobre a ingestão voluntária de alimentos que a deficiência proteica. Este desequilíbrio pode ser controlado pela suplementação na ração, infusão no trato gastrointestinal ou na circulação (Rulquin e Delaby 1997).

A metionina é classificada como aminoácido sulfuroso com grupo R não polar e alifático. É um dos aminoácidos primários e essencial (NRC 2001). Normalmente é o primeiro aminoácido limitante na produção de bovinos, especialmente quando a proteína microbiana é a fonte predominante de aminoácidos que supre o intestino delgado, conseqüentemente, só são supridos através da absorção intestinal. Sua suplementação tem sido bastante estudada em bovinos e sua utilização tem se estendido também à cadeia de produção de carne (Ferreira et al., 2018). Conhecer os efeitos de sua utilização permite dispor desta ferramenta para o aprimoramento do balanceamento de rações.

Os requerimentos de aminoácidos essenciais são influenciados pelas taxas de crescimento dos animais. Existem duas opções para o atendimento das exigências de aminoácidos para bovinos: a primeira é baseada no balanceamento com os aminoácidos dos alimentos disponíveis para a absorção intestinal (sem desconsiderar as implicações do metabolismo da proteína inerente aos ruminantes) e a segunda opção é a suplementação. A metionina pode ser suplementada através de análogos, sendo o mais estudado o ácido 2-hidróxi 4-metiltio-butanóico, também conhecido por HMB (Robert et al., 2001; Schwab et

al., 2001). Recentemente o éster isopropílico do HMB conhecido por HMBi foi desenvolvido e alguns estudos já foram realizados principalmente em gado de leite (Rulquin et al., 2006).

Schroeder et al. (2006) avaliaram a inclusão de metionina na dose de 3,0 g por dia em dietas de diferentes níveis energéticos para novilhos e observaram que a metionina era limitante para a deposição de proteína na carcaça. Assim, sua inclusão aumentou o balanço de nitrogênio. A fonte de energia não influenciou na resposta em relação à suplementação de metionina.

A suplementação de metionina protegida tem sido estudada com maior ênfase em bovinos leiteiros, que em bovinos de corte. Resultados favoráveis, no entanto, foram observados no desempenho produtivo de bovinos de corte suplementados com metionina protegida, em situações específicas de alimentação (deficiência de proteína de escape) e, particularmente, no início do período de suplementação (Ferreira et al., 2018).

Porém, dietas com adição de aminoácidos livres não apresentam sucesso porque estes são facilmente degradados no rúmen pelos microrganismos ruminais (Erasmus et al., 1994), fazendo com que os seus análogos, como por exemplo o análogo da metionina, apresentam degradação mais lenta e são direcionados para os processos de síntese proteica (Lapierre et al., 2012).

Os conhecimentos atuais sobre aminoácidos limitantes, principalmente a metionina, em distintas situações produtivas de ruminantes são muito restritos e pouco concludentes. Existe uma falta clara de informação para se determinar com precisão os efeitos dos aminoácidos para prever os resultados produtivos das rações de ruminantes, tal como é possível realizar no caso de animais monogástricos (Alves 2004).

Apesar dos avanços recentes, poucos autores dedicaram-se a investigar a relação entre o efeito da suplementação de análogo de metionina sobre a melhoria do crescimento muscular e a modificação no conteúdo de gordura da carcaça em bovinos.

#### **1.4. Óleos essenciais**

A eficiência dos sistemas de produção de ruminantes é cada vez mais desafiada, não somente em relação aos custos ou ao seu impacto ambiental, mas também, ao fornecimento de produtos que atendam critérios de qualidade e segurança alimentar (Borba et al., 2014). A suplementação com aditivos pode ser uma dessas medidas para auxiliar no aproveitamento dos alimentos e produzir carne de qualidade. De modo geral, estas substâncias são ionóforos ou antibióticos. Todavia, essas substâncias estão proibidas na União Europeia e em vias de

proibição nos Estados Unidos. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de substâncias alternativas e seguras na alimentação animal (Jayasena & Jo 2013).

Assim sendo, os aditivos naturais tornaram-se objetivos de várias pesquisas no mundo. Entre esses aditivos, os óleos essenciais e os óleos vegetais têm merecido destaque. Entretanto, para sua adição na alimentação animal é necessário caracterizar os vários produtos de plantas, bem como conhecer o modo de ação destas substâncias, que possuem comprovado efeito flavorizante, estimulante da secreção enzimática, ação antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiparasitária, antiviral, entre outras (Reis et al., 2006).

Pickler et al. (2011) descreveram que os princípios ativos são compostos químicos com baixo peso molecular derivados do metabolismo secundário das plantas. Estes princípios podem estar presentes em toda a planta ou em determinadas partes, conferindo a elas atividade terapêutica ou de efeitos benéficos. Estes compostos são produzidos pelas plantas para defesa contra fatores externos como estresse fisiológico, fatores ambientais, proteção contra predadores e patógenos (Huyghebaert 2003). Porém, em contato com o organismo animal, exercem diferentes efeitos.

Os óleos essenciais, são aditivos naturais e constituem, de forma geral, uma mistura de compostos terpenóides e aromáticos, extraídos geralmente por destilação a vapor (Calsamiglia et al., 2007). A composição química pode ser bastante variável em qualidade e em quantidade de acordo com a cultura, região anatômica da planta, ambiente de colheita, tipo de cultivo, entre outros (Amorati et al., 2013).

Supõe-se que parte dessas substâncias possuem capacidade antimicrobiana, atuando de forma semelhante aos antibióticos promotores de crescimento, inibindo enzimas que conferem resistência às bactérias, e possuem, ainda, atividade antioxidante e anti-inflamatória (Guil-Guerrero et al., 2016).

Os óleos essenciais ainda podem ser microencapsulados na forma *in natura* (pouco usual) e/ou compostos sintéticos semelhantes aos componentes presentes nos óleos essenciais naturais. Nesse caso, surge uma opção para produção em larga escala e padronização da uniformidade. Esses compostos microencapsulados são utilizados no sentido de preservar a molécula do óleo, que são de natureza volátil. Geralmente são utilizados na forma de misturas, explorando diversas características de vários óleos. Não foram encontrados na literatura trabalhos que elucidem o modo de ação desses compostos, porém sugere-se que sua ação seja em nível intestinal no metabolismo dos animais (Spanghero et al., 2009).

O sinergismo dos compostos utilizados na dieta é amplamente relatado na literatura, principalmente quando se trata de óleos. Portanto, a mistura de compostos apresenta grande potencial para ser utilizada como aditivo na manipulação da fermentação ruminal em substituição aos ionóforos convencionais utilizados na terminação de bovinos. A adição do óleo essencial e de óleos vegetais na dieta de bovinos auxiliam o processo de fermentação, manutenção do pH ruminal e melhora a eficiência microbiana. Os compostos microencapsulados podem fazer seleção de bactérias no intestino e são antioxidantes (Spanghero et al., 2009).

Os óleos essenciais podem atuar como antimicrobianos (óleos de cravo, alecrim, tomilho e vanilina são alguns dos mais eficazes devido à presença de compostos fenólicos) e antioxidantes (cravo-da-índia, citronela e palmarosa), beneficiando o sistema imunológico e digestivo dos animais, refletido em seus índices de desempenho (Benchaar et al., 2008; Jayasena & Jo 2013). Além disso, quando uma mistura é usada, os óleos essenciais podem ter um efeito sinérgico, influenciando seu modo de ação no metabolismo animal (Prado et al., 2016). Espécies vegetais contendo timol e carvacrol apresentam alto potencial antioxidante devido à presença de terpenos fenólicos (Bakkali et al., 2008). A vanilina, que possui uma estrutura semelhante ao eugenol, apresenta propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Konuk Takma & Korel 2016).

O alecrim (*Rosmarinus oicinalis*) possui uma atividade antioxidante mais alta que os demais óleos essenciais, e vários compostos fenólicos foram isolados a partir desse óleo, como carnosol, rosmanol, rosmaridifenol e rosmarquinona (Assis et al., 2009). Além disso, o alecrim é relatado como tendo uma alta atividade antioxidante na carne (Djenane et al., 2003). O óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) recebeu muita atenção devido ao seu alto e diversificado conteúdo de compostos fenólicos, suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes e potencial uso em carnes e derivados (Barbosa et al, 2009). Embora alguns estudos tenham demonstrado que os óleos essenciais podem influenciar a qualidade da carne (Rivaroli et al., 2016) assim como outros compostos naturais (Moyo et al., 2014).

### **1.5. Saúde intestinal**

O conceito atual sobre a função do trato gastrointestinal na homeostase diz respeito a saúde intestinal. Diferente do conceito fisiológico inicialmente proposto de local de digestão de alimentos e absorção de nutrientes. Saúde intestinal engloba o equilíbrio de

expressões de tipos celulares, a predominância de bactérias benéficas, a resposta imunológica, além de manter a sua capacidade de digestão e absorção.

A diarreia neonatal de bezerros é reconhecida mundialmente como um dos maiores desafios para as indústrias de carne bovina e laticínios. A prevenção de doenças, embora preferível, nem sempre é possível em sistemas intensivos de criação de bezerros. O manejo adequado do bezerro, após o desenvolvimento da diarreia, é crucial para evitar mais perdas econômicas, impacto no bem estar animal e angústias dos pecuaristas (Lorenz et al., 2011).

A busca da saúde intestinal levou ao uso de antibióticos. Seja para melhorar a saúde e bem estar dos animais, mas também para melhorar o desempenho e a eficiência na conversão de alimentos em peso corporal. Os antimicrobianos promotores de crescimento (AGPs) passaram a ser usados em larga escala em animais de interesse zootécnicos. Estes antibióticos de uso humano e animal passaram a ser suspeitos de estarem causando reação cruzadas de resistência bacteriana. Esta hipótese levou a Comissão Europeia (EC) a banir o uso de AGPs em janeiro de 2006 (EC Regulation N° 1831/2003) (Huyghebaert et al., 2011). No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento passou a monitorar o uso de AGPs através da Portaria 41/2017 (MAPA 2017), que visa a promoção de uso racional de antimicrobianos na dieta animal.

Um estudo foi realizado por Donovan et al., (1998) em bezerros da raça holandesa, para determinar fatores que afetam o desempenho (crescimento) entre o nascimento e o sobreano (14 meses). Os dados de saúde coletados incluíram a data do tratamento inicial e o número de tratamentos para as doenças diarreia, onfalite, septicemia, pneumonia e ceratoconjuntivite. Após o ajuste para a ocorrência da doença, a transferência passiva de imunoglobulinas colostrais não teve efeito significativo no ganho de peso corporal ou no crescimento da altura pélvica. A estação do nascimento e a ocorrência de diarreia, septicemia e doença respiratória foram variáveis significativas, diminuindo o crescimento da novilha (altura e peso). Sendo a diarreia a doença estudada de maior incidência nos bezerros.

Considerando a salmonela um dos principais patógenos causadores de diarreia em bezerros, Harris et al., (2017), testou o uso de *Saccharomyces cerevisiae* como alternativa ao uso de antibióticos. Para tanto, desafiou bezerros fornecendo oralmente *Salmonella* entérica *Typhimurium* resistente a sulfametazina. Foram analisados a eliminação fecal de *Salmonella*, o consumo de suplemento alimentar, parâmetros sanguíneos, histologia do aparelho digestivo e peso de vísceras. Os autores não observaram efeito da levedura para desempenho e consumo. Sendo que o tratamento controle apresentou maior concentração de neutrófilos, linfócitos, hematócrito e hemoglobina. A altura de vilosidade e espessura de

criptas da mucosa intestinal não diferiram entre os tratamentos. As papilas ruminais, peso do fígado foram iguais para os tratamentos.

Trabalhando com bezerros e bezerras da raça Holandesa, Uyeno et al., (2013) observaram que os oligossacarídeos são utilizados por microrganismos específicos que habitam o intestino, resultando em alterações no perfil intestinal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Suplementação com oligossacarídeos e cepa de *Clostridium butyricum* pareceu não ter efeito na manutenção dos níveis de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* no intestino grosso de bezerros em pré-desmame. Segundo estes autores, ao contrário dos animais monogástricos, não é fácil melhorar a colonização por bactérias probióticas em ruminantes pela administração contínua de oligossacarídeos. Contudo, a aplicação de oligossacarídeos aos bezerros ainda parece vantajoso em relação a dois pontos. Primeiro, o uso de oligossacarídeos prebióticos pode ser útil como uma alternativa aos antibióticos em bezerros que sofrem de síndrome dispéptica. Segundo, como outro tipo de utilização de prebióticos, é possível promover a colonização por grupos bacterianos específicos da comunidade dos ruminantes, por exemplo, bactérias fibrolíticas e bactérias que utilizam ácido lático.

A alimentação com prebiótico ou antibiótico a bezerros não teve efeito detectável na saúde ou no crescimento nas primeiras oito semanas de vida. Populações de bactérias benéficas nas fezes foram minimamente afetadas pelos tratamentos; no entanto, houve uma tendência para os bezerros alimentados com prebióticos terem populações elevadas (Heinrichs et al., 2009).

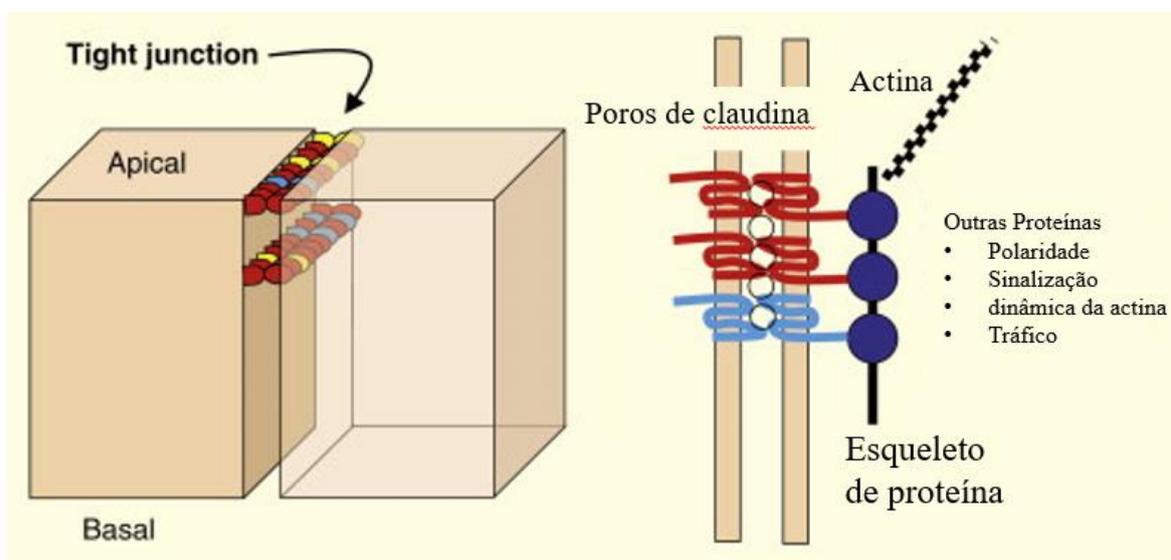
### **1.6. Permeabilidade intestinal**

O conceito de permeabilidade intestinal diz respeito à propriedade de uma membrana que permite a passagem de um soluto por difusão não mediada. A difusão de um soluto através de uma membrana simples é determinada tanto pela estrutura (composição, carga, espessura e assim por diante) da membrana, pelas propriedades físico-químicas de um soluto (tamanho molecular, forma, carga e solubilidade), e sua interação com o solvente (Bjarnson et al., 1996). Em bezerros esta permeabilidade está presente fisiologicamente nas primeiras 36 horas de vida. Com a finalidade de garantir a transferência imunológica da vaca aos bezerros pela absorção de imunoglobulinas do colostro (Bush & Stanley 1980).

Esta barreira intestinal é feita pelas Tight junctions (TJs). Estas junções são contatos intercelulares que selam o espaço entre as células individuais de uma folha epitelial, para que possam separar coletivamente os compartimentos de tecido. A barreira é necessária para

realizar o transporte vetorial de material de um lado do compartimento para o outro e para limitar a entrada paracelular de indesejáveis, como toxinas, antígenos e microrganismos (Anderson & Itallie 2009). A junção forma um contato intercelular contínuo na extremidade mais apical do lado lateral das células epiteliais, acima de outros contatos celulares especializados, como aderentes e junções comunicantes e desmossomos (Figura 3).

Seu nome deriva de imagens de microscopia eletrônica de transmissão que mostram ponto de contato da membrana entre células adjacentes, onde os folhetos da membrana externa pareciam se fundir. É também chamada de junção oclusiva (JO) e zona de oclusão (ZO). As TJs não agem apenas como barreiras, mas também são locais para direcionamento de vesículas, dinâmica citoesquelética, sinais que controlam a proliferação e transcrição e para definir a polaridade celular entre as superfícies da membrana apical e lateral funcionalmente distintas (figura 3) (Anderson & Itallie 2009).



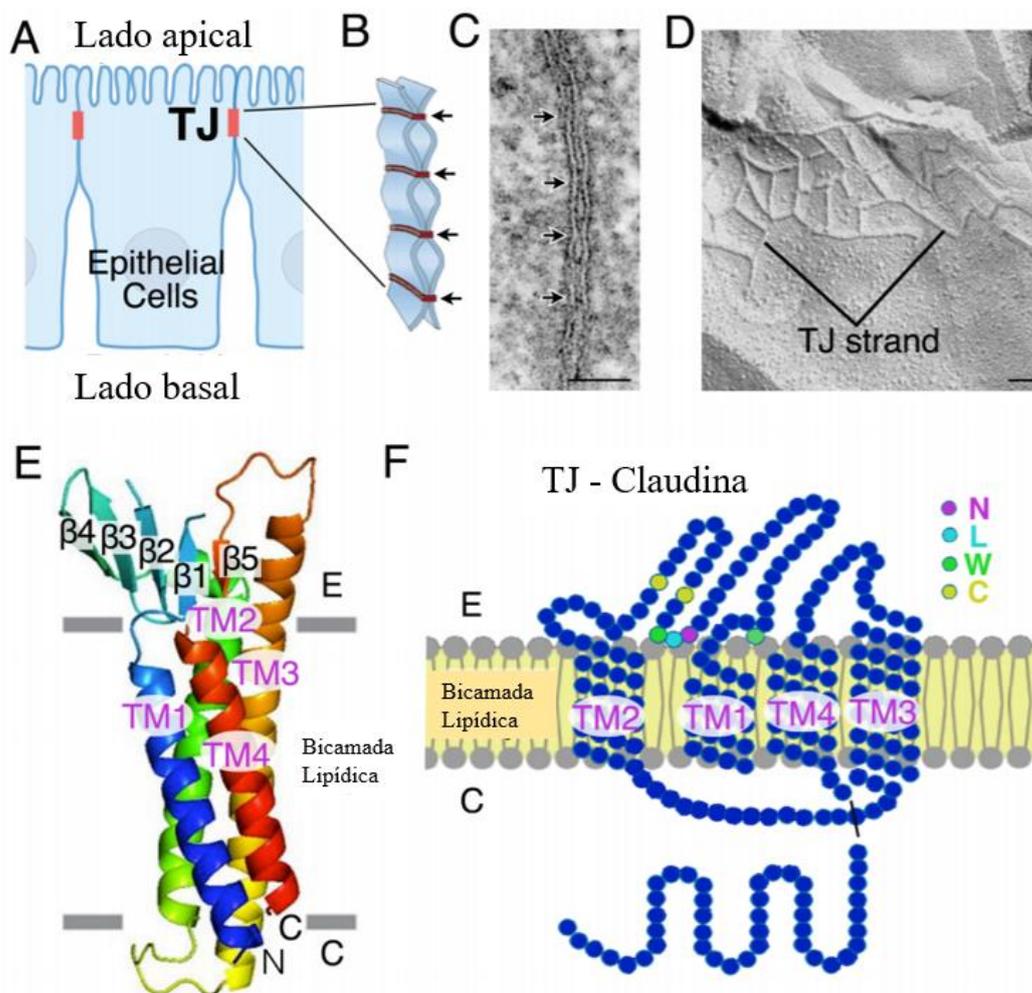
**Figura 3.** Esquema ilustrativo das Tight junctions (TJs).

Fonte: Adaptado de Anderson & Itallie, 2009.

As claudinas são as proteínas TJs que formam a barreira paracelular nas células epiteliais. Algumas claudinas também parecem formar canais paracelulares de TJs das células para permitir a permeabilidade seletiva de íons, incluindo cátions e ânions, e de solutos dependendo do tamanho. Os mecanismos subjacentes a essas permeabilidades restritas são revelados por estudos expandidos de estrutura-função de claudinas específicas.

A função de barreira paracelular das claudinas de TJs é provavelmente a mais simples de interpretar experimentalmente, uma vez que sua disfunção leva à difusão de algumas moléculas que são normalmente bloqueadas, embora a especificidade da função de barreira para vários tipos de moléculas seja diferente entre as claudinas (Figura 4). Comparadas às funções de barreira paracelular das claudinas, suas funções de canal

paracelular são muito mais sofisticadas, pois em muitos casos há cooperação com outros tipos de claudinas. Além disso, certos canais transportadores convencionais são necessários para obter a função biológica. Exceto no caso de uma barreira de TJs de claudina única que desaparece com a deficiência da claudina, a perda de uma claudina geralmente não atrapalha os TJs, porque outras claudinas expressas podem atuar na TJs. No entanto, uma propriedade do epitélio geralmente é alterada para afetar uma função biológica específica, sugerindo um papel biológico para a claudina alvo (Tamura & Tsukita, 2014).



**Figura 4.** Junções epiteliais estreitas (TJs), que são compostas de TJ claudina. (A) Localização de TJs entre células epiteliais. (B) Desenho esquemático de uma membrana TJ. As membranas plasmáticas de duas células vizinhas estão intimamente ligadas umas às outras por moléculas de adesão (claudinas) nos TJs (setas). (C) Micrografia eletrônica de seção fina de TJs. A aderência próxima de duas membranas plasmáticas nos TJs (setas) é claramente observada. Bar, 50 nm. (D) Micrografia eletrônica de fratura por congelamento de um TJ. O plano de fratura por congelamento da membrana plasmática de uma célula epitelial do intestino delgado é mostrado. As proteínas transmembranares de TJ (claudinas) formam filamentos de TJ. Bar, 50 nm. (E) Estrutura cristalina da claudina-15. A estrutura cristalina da claudina-15 foi determinada com resolução de 2,4-Å. Revelou uma dobra característica da folha  $\beta$  que consiste em cinco folhas  $\beta$  conectadas a quatro motivos transmembranares  $\alpha$ -helicoidais. C: Espaço citoplasmático, E: Espaço extracelular. (F) Desenho esquemático das estruturas moleculares da claudina-15.

Fonte: Adaptado de Tamura, A. & Tsukita, S. 2014

Estudando permeabilidade intestinal e incidência de diarreia em bezerros, Araujo et al., (2015), trabalhou com 76 bezerros recém nascidos da raça Holandesa. Os bezerros receberam colostro após o nascimento via sonda esofágica. A partir deste momento os animais foram alimentados com 1,5 L de substituto do leite duas vezes ao dia. O escore de fezes foi monitorado para caracterizar diarreia e a permeabilidade intestinal foi medida através de marcadores lactulose e D-monitol, medidos no soro sanguíneo. Segundo os autores, os bezerros que sofreram diarreia mostraram uma permeabilidade intestinal alterada em relação aos animais sem diarreia.

Wood et al., (2015) estudaram o efeito da idade dos bezerros na permeabilidade intestinal. Foram usados 14 bezerros divididos em dois tratamentos: desmamados aos 35 dias de vida e não desmamados. O método de desmama consistia em reduzir pela metade o fornecimento de sucedâneo de leite. A medida de permeabilidade intestinal foi realizada via dosagem de Cr-EDTA na urina. Os pesquisadores observaram que a concentração de Cr-EDTA na urina de bezerros dos dois tratamentos diminuiu do 14° ao 28° dia, mas aumentou nos bezerros desmamados do 28° ao 42°, enquanto diminuía nos animais controle.

Estudo avaliando os efeitos do ácido glutâmico em sucedâneos lácteos para bezerros foi realizado por Ahangarani et al., (2020). Foram avaliados os parâmetros de desempenho, permeabilidade intestinal e metabolismo. Os autores não encontram diferenças no desempenho dos bezerros ou na permeabilidade intestinal (medida como lactulose:relação manitol). A concentração de glicose no soro foi maior em bezerros não suplementados com ácido glutâmico do que em bezerros suplementados. Com 14 dias, a proporção plasmática de Leucina foi maior em bezerros suplementados e a proporção de metionina tendeu a ser maior em bezerros não suplementados. A permeabilidade intestinal e os demais parâmetros analisados não diferiram entre os tratamentos.

Um experimento de 56 dias foi conduzido por Hansen et al., (2010) para examinar o efeito da alta ingestão de Ferro nos transportadores metálicos envolvidos no metabolismo ferro e Manganês. Entre os parâmetros analisado está a permeabilidade intestinal. Além disso, o duodeno proximal foi montado em câmaras de Ussing para avaliar a integridade da barreira intestinal. Bezerros que receberam alta dieta Fe apresentaram diminuição da resistência transepitelial e aumento do fluxo apical para basolateral do tripitól com rótulo de rádio, sugerindo que a alta de ferro criou maior permeabilidade intestinal. Bezerros do tratamento alto em ferro diminuíram o ganho médio diário, a ingestão de matéria seca e a eficiência alimentar.

## **2. Justificativa e objetivos**

### **2.1. Justificativa**

A presente pesquisa visa buscar alternativas práticas e economicamente viáveis para conseguir melhorar a saúde intestinal de bezerros, através do uso de aditivos (Análogo de metionina e óleos essenciais) aliados ao manejo de restrição alimentar e mecanismo de ganho compensatório. Buscando desta forma, viabilizar a atividade pecuária sem colocar em risco a saúde humana.

### **2.2. Objetivo Geral**

Estudar a ação do manejo alimentar no desenvolvimento inicial de bezerros lactantes e o efeito de aminoácido essencial e óleos funcionais no desenvolvimento e saúde intestinal.

### **2.3. Objetivo específico**

- Medir o consumo e o desempenho dos bezerros.
- Dosar os níveis séricos de Imunoglobulina A (IGA) e Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF).
- Estudar o mecanismo de ação de análogo de metionina (HMBi) e óleos essenciais no trato digestivo de bezerros lactantes e seus efeitos na mucosa do trato gastrointestinal, desenvolvimento do trato digestivo, ação hormonal e permeabilidade intestinal.
- Medir a vilosidade intestinal e espessura de cripta.
- Dosar a concentração de receptores para grelina no hipotálamo e intestino.
- Analisar o efeito de HMBi e óleos essenciais na expressão de receptores para grelina no hipotálamo e intestino.
- Avaliar o efeito do HMBi e Óleos essenciais na permeabilidade intestinal sob o efeito do ganho compensatório.

## **3. Metodologia**

### **3.1. Animais, instalações e manejo**

Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA-UFG) que gerou o protocolo N. 095/17.

O experimento foi realizado no Setor de Campo do Laboratório de Fisiologia da Digestão da Universidade Federal de Goiás (UFG), Câmpus Samambaia – Goiânia – Goiás, por um período de 60 dias com quatro dias de adaptação e dois períodos experimentais de 28 dias cada. As instalações foram adaptadas para baias individuais com 6 m<sup>2</sup> que continham cobertura de tela de sombreamento 80% (sombrite) e piso de terra compactado. Foi utilizado nas baias, palha de arroz com camada de 15 cm para servir de cama para os animais, conferindo conforto e absorção de umidade do piso. Diariamente era realizado o recolhimento dos resíduos da baia e revolvida a palha, a qual era trocada a cada quatro dias.

No experimento foram utilizados 20 bezerros leiteiros, cruzados zebu x holandês, que foram captados de produtores leiteiros da região, em um raio de 50 km da cidade de Goiânia no estado de Goiás. Nos locais de nascimento os procedimentos realizados ficaram limitados a cura de umbigo com solução de iodo a 10% e fornecimento de colostro em até seis horas após o nascimento e por dois dias. Os animais eram alimentados com quatro litros de leite/dia em dois fornecimentos até o momento da transferência para a unidade experimental. Assim que os bezerros chegaram ao local do experimento foram identificados por meio de brincos enumerados, pesados e a cura de umbigo foi estendida por mais três dias com aplicação diária de solução de iodo na concentração de 7%.

Após o período de adaptação os vinte bezerros foram pesados e distribuídos em quatro grupos de cinco animais de acordo com o tratamento recebido:

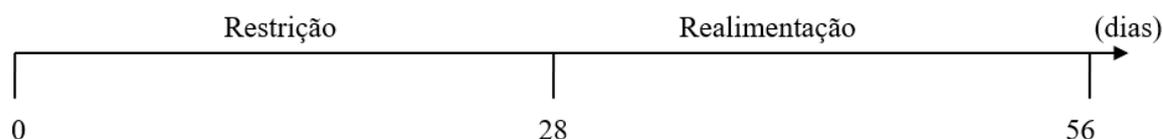
Tratamento 1 – RES+MET: alimentação com restrição de leite no primeiro período (3 L/animal/dia) e sem restrição alimentar no segundo período (6 L/animal/dia) e inclusão de 4g/MET/dia nos dois períodos;

Tratamento 2 – MET: alimentação sem restrição de leite nos dois períodos (6 L/animal/dia) e inclusão de 4g/MET/dia nos dois períodos;

Tratamento 3 – RES+OE: alimentação com restrição de leite no primeiro período (3 L/animal/dia) e sem restrição alimentar no segundo período (6 L/animal/dia) e inclusão de 1,5g/OE/dia nos dois períodos;

Tratamento 4 – OE: alimentação sem restrição de leite nos dois períodos (6 L/animal/dia) e inclusão de 1,5g/OE/dia nos dois períodos;

A restrição alimentar dos grupos experimentais seguiu a linha do tempo abaixo (Figura 5):



**Figura 5.** Esquema ilustrativo da linha de tempo da restrição alimentar.

Os aditivos utilizados foram:

- MET, que trata-se de um análogo da metionina: o éster isopropílico de HMB (ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutanóico), abreviado como HMBi, colocado em um veículo de sílica (ADISSEO, 2013);
- OE é uma mistura encapsulada (princípios ativos de eugenol, timol e vanilina) que foi obtida da Safeeds® (Cascavel, Paraná, Brasil).

O manejo alimentar foi constituído de leite e alimento sólido fornecido *ad libitum* constituído de feno e concentrado experimental à base de milho, farelo de soja e núcleo mineral. As análises dos alimentos foram realizadas no Laboratório de Nutrição da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG. O leite foi fornecido às 8h da manhã e 3h da tarde e os aditivos MET e OE foram dissolvidos no leite em quantidade de 4 g/animal/dia e 1,5 g/animal/dia respectivamente, dividido em duas porções diárias por um período de 56 dias. O aleitamento ocorreu com o uso de baldes individuais identificados e ao final de cada fornecimento de leite os recipientes eram lavados com água e detergente diluído. Os vasilhames utilizados para fornecimento de concentrado eram lavados uma vez por semana e as sobras de alimento do comedouro quantificadas três vezes por semana a fim de estimar a ingestão de alimento pelos animais no sistema.

Os bezerros foram inspecionados diariamente para avaliação do estado geral, hidratação e ocorrência de diarreia. Para tratá-los, quando necessário, foi realizado exame clínico completo e adotadas as medidas indicadas pelo médico veterinário.

### 3.2. Coleta de dados e amostras

#### 3.2.1. Crescimento corporal

Todos os bezerros foram pesados no momento da chegada à área experimental, quinzenalmente e no dia anterior ao abate. Todas as pesagens ocorreram no período da manhã, antes do aleitamento, e foi utilizada uma balança eletrônica de capacidade de 1000 Kg (S2 Weigh Scale Indicator Tru-Test®) para obtenção dos dados.

Para mensurar o consumo de Matéria Seca (MS) o sistema de alimentação adotado foi *ad libitum*, servido em duas refeições (8:00 e 15:00 hs) por 56 dias. A dieta foi submetida a ajustes de quantidade semanalmente, com base na quantidade de sobra nos cochos de todas as baias antes da primeira refeição (oito horas), utilizando-se como critério sobras de 5%, e escore de cocho. Dessa forma era pesado a quantidade fornecida, também eram pesadas e retiradas dos cochos as sobras no momento do fornecimento da refeição subsequente.

### **3.2.2. Perfil metabólico**

Para determinação do perfil metabólico e hormonal dos bezerros, amostras de sangue venoso foram coletadas via punção da jugular após assepsia local. As coletas foram realizadas nos dias 10, 22, 37 e 49 do período experimental, antes do aleitamento da manhã, em tubos vacutainer (VacuPlast-10 mL, São Paulo, Brasil) para análises de lactato, proteínas totais, triglicerídeos, glicose, fosfatase alcalina, creatinina e uréia. Após as coletas, as amostras eram armazenadas em cooler com gelo e transportadas até o Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB II) da UFG, onde foram centrifugadas a 2000 xg em uma temperatura de 4 °C durante 15 minutos. O sobrenadante foi alíquotado em parcelas de 500 µL e armazenado em microtubos plásticos à -20 °C para as análises dos parâmetros bioquímicos.

### **3.2.3. Análises morfológicas e morfométricas**

O abate dos animais ocorreu no abatedouro do Instituto Federal Goiano na cidade de Urutaí, distante aproximadamente 170 km da cidade de Goiânia. O método de abate foi normatizado pelo Serviço de Inspeção Municipal, com insensibilização pré-abate dos animais, por martelo pneumático não penetrante. Este processo consiste em levar o animal a um estado de inconsciência para que a sangria ocorra sem que haja sofrimento do animal. Nesta ocasião, os bezerros foram transportados com um dia de antecedência e passaram por um jejum de, no mínimo, oito horas. Nas necropsias foram feitas ligaduras duplas nas porções distais do esôfago e do abomaso para retirada dos estômagos da carcaça, para realização das pesagens, mensurações e cálculo dos parâmetros de rendimento de carcaça, proporção de vísceras e proporção de peso de fígado.

Durante a necropsia, foram coletados três fragmentos (3 x 5 cm) de tecidos provenientes do saco dorso cranial esquerdo do rúmen, porção de abomaso, porção medial do duodeno e do jejuno. As amostras foram presas pelas extremidades, com o auxílio de grampos, a um papel cartão previamente identificado e colocadas em formaldeído 10%

tamponado para fixação. Os fragmentos permaneceram no formol neutro e tamponado por 24 horas sendo que neste período houve uma troca desta solução. Após esse tempo, os tecidos foram cuidadosamente lavados em água corrente e mantidos em álcool 70% até o processamento das amostras. Para o processamento, os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de etanol, clarificados em xilol, perfundidos em parafina líquida (60°C) e, por fim, incluídos em parafina.

Durante a necropsia, foram coletadas amostras de cérebro (região paraventricular do hipotálamo) a fim de determinar a expressão de receptores de grelina. Após a coleta e lavagem do material com água destilada, as amostras dos tecidos foram acondicionadas em microtubos, congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer - 80°C.

### **3.3. Análises laboratoriais e histológicas**

#### **3.3.1. Parâmetros bioquímicos**

Os parâmetros séricos de Lactato, Proteínas totais, Triglicerídeos, Glicose, Fosfatase alcalina, Creatinina e Uréia foram dosados, em triplicata, por testes colorimétricos no Laboratório de Análises Clínicas e Ensino em Saúde da UFG (LACES-UFG), com leitura em espectrofotômetro automático.

O lactato sérico foi dosado por meio de teste enzimático (Labtest Diagnóstica S.A.) utilizando-se filtro de absorvância de 505 nm com leitura feita em sistema automático para bioquímica - Modelo Labmax Plenno (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Para a análise de proteína total sérica utilizou-se kit enzimático Proteína Total (Labtest Diagnóstica S.A.) sendo a determinação por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância de 540 nm com leitura feita em sistema automático para bioquímica - Modelo Labmax Plenno (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A determinação dos triglicerídeos foi realizada utilizando-se kit enzimático Triglicérides Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A.) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância de 505 nm com leitura feita em sistema automático para bioquímica - Modelo Labmax Plenno (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A análise de glicose sérica foi realizada utilizando-se kit enzimático Glicose HK Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A.) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância de 505 nm com leitura feita em sistema automático para bioquímica - Modelo Labmax Plenno (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A análise de fosfatase alcalina foi realizada através do kit Fostase Alcalina Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A.), utilizando-se filtro de 405 nm com leitura feita em sistema automático para bioquímica - Modelo Labmax Plenno (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A análise de creatinina foi realizada através do kit Creatinina (Labtest Diagnóstica S.A.), utilizando-se filtro de 510 nm com leitura feita em sistema automático para bioquímica - Modelo Labmax Plenno (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A análise de ureia sérica foi realizada utilizando-se kit enzimático Ureia CE (Labtest Diagnóstica S.A.) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância de 600 nm com leitura feita em sistema automático para bioquímica - Modelo Labmax Plenno (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

### 3.3.2. Quantificações séricas

Neste estudo, as amostras de soro que estavam em freezer - 80 °C foram levadas ao Laboratório de Análises Clínicas e Ensino em Saúde da UFG (LACES-UFG) foram realizadas as dosagens séricas de Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmica Pirúvica (TGP), Gama Glutamil Transpeptidase (GAMA), Imunoglobulina A (IGA) e Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF) pela técnica de Elisa.

Para TGO foi utilizado o Kit AST/GOT Liquiform (Ref.109 MS10009010018 Labtest<sup>®</sup>), onde o TGO catalisa a transferência do grupo amina da aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. O oxaloacetato formado reage com a 2-4-dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra.

Os níveis de TGP foram dosados utilizando o Kit ALT/GPT Liquiform (Ref.108 MS10009010029 Labtest<sup>®</sup>), no qual a ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH<sup>+</sup> é oxidada a NAD<sup>+</sup>. A atividade enzimática da ALT na amostra é calculada com base na redução da absorvância em 340 nm, + quando o NADH se transforma em NAD<sup>+</sup>.

O GAMA foi mensurado utilizando o teste GAMA GT Liquiform (Ref.105 MS10009010004 Labtest<sup>®</sup>), onde a A gama-glutamiltransferase (Gama GT) catalisa a transferência do grupamento gamaglutamil da gamaglutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para a

glicilglicina liberando gamaglutamilglicilglicina e p-nitroanilina. A p-nitroanilina apresenta elevada absorção em 405 nm e a quantidade liberada é diretamente proporcional à atividade da Gama GT na amostra.

Para as dosagens de IGA foi utilizado o Bovine IgA (Immunoglobulin A) ELISA Kit (EB0035 FineTest®). Este kit foi baseado no método Competitive-ELISA. A placa de microtitulação fornecida neste kit foi pré-revestida com alvo. Durante a reação, o alvo na amostra ou padrão compete com uma quantidade fixa de alvo na fase sólida suporte para sítios no anticorpo de detecção biotinilada específico para o alvo. Excesso de conjugado e amostra não ligada ou o padrão é lavado da placa e HRP-Streptavidin (SABC) é adicionada a cada poço de microplaca e incubada. Então TMB solução de substrato é adicionada a cada poço. A reação enzima-substrato termina com a adição de solução ácido sulfúrico e a mudança de cor é medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450 nm. A concentração do alvo nas amostras é então determinada comparando com a curva padrão.

As dosagens de IGF foram realizadas utilizando o Bovine IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) ELISA Kit (EB0068 FineTest®). Assim como para IGA este kit também foi baseado no método Competitive-ELISA. A placa de microtitulação fornecida neste kit foi pré-revestida com alvo. Durante a reação, o alvo na amostra ou padrão compete com uma quantidade fixa de alvo na fase sólida suporte para sítios no anticorpo de detecção biotinilada específico para o alvo. Excesso de conjugado e amostra não ligada ou o padrão é lavado da placa e HRP-Streptavidin (SABC) é adicionada a cada poço de microplaca e incubada. Então TMB solução de substrato é adicionada a cada poço. A reação enzima-substrato termina com a adição de solução ácido sulfúrico e a mudança de cor é medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450 nm. A concentração do alvo nas amostras é então determinada comparando o DO das amostras com a curva padrão.

### **3.3.3. Preparo das lâminas histológicas do rúmen, abomaso e intestino delgado**

No Laboratório de Histofisiologia do Instituto de Ciências Biológicas III da UFG foi realizada a montagem das lâminas, onde os cortes foram desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Posteriormente, foram cortados em micrótomo (5 µm) e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) proposta por Montanholi et al. (2013).

Os tecidos coletados durante o abate que foram fixados em formol tamponado e posteriormente conservados em álcool 70% foram processados e aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> foi cortado do centro da amostra para iniciar o processo de confecção das lâminas. Estes fragmentos foram processados manualmente e em seguida foram imergidos em parafina histológica à temperatura de 60°C e incluído um fragmento por bloco de parafina. Depois do resfriamento do material foram realizados os cortes em micrótomo com seções de 5 µm de espessura.

Os cortes obtidos foram estendidos em lâminas histológicas que foram coradas por hematoxina e eosina. Para coloração, as lâminas foram imersas em xilol por 25 minutos e depois transferidas para uma sequência de etanol de concentrações decrescentes (absoluto, 95°GL e 80°GL) permanecendo por dois minutos em cada recipiente para reidratação do material. Sequencialmente, as lâminas foram imersas em hematoxilina por 5 minutos e, depois desse tempo, foram colocadas em cubas e em água corrente por 10 minutos e finalmente imersas em eosina por 5 minutos.

Para desidratar novamente o material repetiu-se a sequência de imersões em concentrações crescentes de etanol (80°GL, 95°GL, etanol absoluto 1 e etanol absoluto 2) por 1 minuto em cada álcool. As lâminas foram banhadas duas vezes em xilol por 15 e 40 segundos e, por fim, montadas com a utilização de bálsamo do Canadá, superpondo-se uma lamínula de vidro em cada lâmina. Após o preparo das amostras e coloração das lâminas, foi realizada a avaliação do epitélio ruminal e intestinal em microscópio ótico fotomicroscópio Zeiss AxioScope A1 (Zeiss, Alemanha) com aumento de 25 e 50 vezes, respectivamente, segundo metodologia proposta Lesmeister (2004).

Para as análises morfométricas foram capturadas 4 fotos por animal totalizando 20 por grupo das quais foram realizadas 5 medidas totalizando 100 mensurações de abomaso, papilas e vilosidades intestinais para obter o comprimento das papilas, altura de vilosidades e profundidade de cripta de cada animal. Os valores utilizados na análise estatística foram as médias das mensurações de cada parâmetro em cada bezerro.

Os cortes histológicos corados pelo HE foram submetidos às seguintes análises: Altura (µm) das papilas ruminais e da camada submucosa do abomaso. Para cada uma dessas análises morfométricas, foram coletadas 100 medidas de cada grupo experimental, sendo 20 medidas por animal (N = 5 animais/grupo). A análise do material e a captura das imagens foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss AxioScope A1 (Zeiss, Alemanha), e as medidas morfométricas foram feitas no software Image-Pro-Plus ©Média Cybernetics.

Para as análises cariométricas, os cortes histológicos corados pelo HE foram submetidos às seguintes análises: Perímetro ( $\mu\text{m}$ ), área ( $\mu\text{m}^2$ ) e fator forma dos núcleos dos hepatócitos do fígado. O fator forma foi obtido através da fórmula:  $4\pi \times \text{área}/(\text{perímetro})^2$ . Para esta análise, foram coletadas 200 medidas de cada grupo experimental, sendo 40 medidas por animal ( $N = 5$  animais/grupo). A análise do material e a captura das imagens foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss AxioScope A1 (Zeiss, Alemanha), e as medidas morfométricas foram feitas no software Image-Pro-Plus ©Média Cybernetics.

### **3.3.4. Análise imuno-histoquímica**

Para avaliar o efeito dos aditivos sobre a permeabilidade intestinal foram verificadas as possíveis alterações na marcação das junções de oclusão das células epiteliais. Além disso, através da imuno-histoquímica foi avaliado o padrão de proliferação celular das criptas de Lieberkühn intestinais.

Procedimentos gerais para imuno-histoquímica: os cortes histológicos desparafinizados e reidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a  $100^\circ\text{C}$  por 45 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS por 3 vezes de 5 minutos. O bloqueio de peroxidases endógenas foi realizado com  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 15 minutos e depois os cortes foram lavados em PBS por 3 vezes de 5 minutos. Os anticorpos primários para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Anti-PCNA mouse polyclonal IgG2a, 13-3900, Invitrogen) e Claudina-1 (Anti-Claudin 1 rabbit polyclonal IgG, 51-9000, Invitrogen) foram incubados em diluições variadas (entre 1:50 a 1:500, de acordo com as instruções de cada anticorpo) a  $4^\circ\text{C}$  overnight.

Posteriormente, após serem lavados em PBS por 3 vezes de 5 minutos, e incubados com anticorpos secundários marcados com (Leica BIOSYSTEMS NovoLink Polymer Detection System, RE7150-K, United Kingdom). Os cortes foram revelados com a diaminobenzidizina (DAB). A contra coloração dos cortes foi feita com hematoxilina de Harris. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em etanol, montadas em bálsamo do Canadá e avaliadas em microscopia de luz convencional.

### **3.3.5. Quantificação de células PCNA positivas**

Para a quantificação de células PCNA positivas foram capturadas 30 imagens ( $n = 3$  animais/grupo; aumento de 400x) para cada grupo experimental. Em cada campo, o número total de células positivas epiteliais foi obtido como frequência relativa (%) em relação ao número total de células. Todas essas análises foram realizadas utilizando o sistema de análise

de imagem que foram capturadas utilizando fotomicroscópio Zeiss AxioScope A1 (Zeiss, Alemanha), e as medidas morfométricas foram feitas no software Image-Pro-Plus ©Média Cybernetics.

### **3.3.6. Western Blotting**

A expressão de receptores para grelina na região paraventricular do hipotálamo foi determinada por Western blotting seguindo a metodologia de Kurien e Scofield (2006). Antes de iniciar a técnica foi preciso preparar as amostras através dos processos de extração e quantificação das proteínas.

Para a extração das proteínas, as amostras foram retiradas do freezer - 80°C e homogeneizadas em solução tampão para extração da proteína total. Inicialmente, as áreas foram lisadas e homogeneizadas, com auxílio de amassador de vidro e adição de 250 µL de tampão de lise constituído de NP40 (1%), deoxicolato de sódio (0,5%), SDS (1%), pool de enzimas e água MilliQ. Após a extração protéica, as amostras foram sonicadas em nível um por três vezes de 10 segundos, centrifugadas a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para microtubo plástico previamente identificado. A quantificação das proteínas foi determinada usando o método de Bradford (Bradford 1976).

Primeiramente, foram preparados os padrões da curva de calibração nas concentrações 0,125 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,0 µg/mL à partir de uma solução estoque de TBS 10 mg/ml. Em uma placa de poliestireno foram aplicados 5 µL dos padrões, branco e amostras em triplicata e 195 µL de reagente Bradford em cada poço com posterior incubação de cinco minutos em temperatura ambiente. Com o fim do tempo de incubação foi realizada a leitura em espectrofotômetro de microplacas (EPOCH, BioTek) com absorvância de 595 nm.

Os resultados obtidos foram transferidos para o programa Excel para padronizar as amostras em quantidade de proteína (40 µg). Com os dados obtidos o próximo passo realizado foi a preparação das amostras em duplicatas para separação em gel de poliacrilamida. Para isso, foi adicionado, de acordo com os resultados da fase anterior, os volumes de água Milli Q, amostras e 5 µL de load com posterior incubação em água fervente por cinco minutos. A partir desse momento, as amostras estavam prontas para visualização das proteínas estruturais e respectivos pesos moleculares da grelina por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Na montagem do sistema eletroforético utilizou-se duas placas de vidro (10 x 10,5 cm) que foram previamente lavadas com a finalidade de remover todo o tipo de sujidades e gordura. Após esse processo, o conjunto de placas foi montado, preso no suporte de montagem e nivelado com água para verificação de vazamentos. Na sequência, foram preparados dois géis: o de empacotamento e o de separação, sendo que a diferença entre eles é a concentração de acrilamida e bisacrilamida utilizada.

O gel de separação a 10% foi aplicado nas placas e após sua polimerização o gel de empilhamento a 5% foi aplicado em cima do gel de separação e, em seguida, colocado o pente de amostra. Após a polimerização, o pente e o suporte de montagem foram removidos e o conjunto fixado no suporte de corrida, que já havia sido preenchido com tampão de corrida. As amostras preparadas e o padrão de corrida (BioRad - 161-0377) foram aplicados cuidadosamente no fundo de cada poço do gel, obedecendo-se rigorosamente o mesmo volume de 30 e 5  $\mu\text{L}$ /poço, respectivamente.

A fonte utilizada foi ligada e conectada aos eletrodos da cuba estabelecendo corrente elétrica entre os pólos negativo e positivo. A voltagem inicial utilizada foi estabelecida entre 80 – 100 volts (V) e assim que o padrão e as amostras ultrapassaram o gel de empacotamento a voltagem foi alterada para 120 V até o final da corrida, que despendia aproximadamente cinco horas e era determinado pela chegada do corante indicador (azul de bromo fenol) ao final do gel. Durante esse tempo foi preparado o tampão de transferência que era armazenado na geladeira. Ao término da eletroforese, o gel foi removido e colocado em recipiente plástico com tampão de transferência, sendo uma das extremidades do gel identificada.

A membrana de nitrocelulose (Amersham Protran) foi cortada no mesmo tamanho que o gel e mergulhada durante 15 segundos em tampão de transferência para equilíbrio da mesma. Na montagem do conjunto de placas foram dispostos: folha de espuma, papel filtro, gel, membrana, papel filtro e duas folhas de espuma, nesta ordem. Este conjunto foi então fechado em forma de “sanduíche” e colocado na cuba de transferência de forma com que o gel ficasse voltado para o pólo negativo da cuba e a membrana para pólo positivo. Dentro do suporte que acondicionava o conjunto foi adicionado tampão de transferência gelado até completa submersão.

A transferência ocorreu sob refrigeração com gelo, com voltagem constante de 80 V, por um período de 80 minutos. Após esse tempo de transferência, a membrana foi marcada à caneta na altura dos pesos moleculares do padrão, identificada e corada com solução de Ponceau S por 30 segundos. Depois da coloração, a membrana foi cortada em tiras próxima

das alturas correspondentes de cada proteína e lavada 3 três vezes com água destilada e uma vez com TBT 1x por cinco minutos.

Para bloquear os sítios de ligação, a membrana foi colocada em um recipiente plástico com solução de bloqueio, preparada com 2,5 g de leite em pó desnatado e 50 mL de TBT 1x, e incubada por 60 minutos a temperatura ambiente e sob agitação constante. No final desse processo as membranas foram lavadas três vezes com TBT 1x por dez minutos cada lavagem. Para diluição dos anticorpos primários foi utilizada a solução de BSA 3% (0,3 g de albumina bovina e 10 mL de TBT 1x).

O anticorpo para receptor para grelina (Bioss, bs-11529R) foi diluído para obter a concentração final 1:1000 e o anticorpo para GAPDH (Santa Cruz, sc- 47724) 1:2000. As faixas de membrana foram incubadas com os anticorpos em saquinhos plásticos selados e agitadas constantemente overnight em temperatura de 6°C. Após a incubação, retirou-se as membranas dos saquinhos e foram realizadas três lavagens com TBT 1x por dez minutos cada uma.

A diluição dos anticorpos secundários (Amersham ECL Anti-rabbit - NA 934) foi feita em solução de leite em pó 5% nas concentrações de 1:4000 e 1:5000 para grelina e GAPDH, respectivamente. As faixas de membrana foram incubadas com os anticorpos em saquinhos plásticos selados com agitação constante por 90 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, retirou-se as membranas e foram realizadas três lavagens com TBT 1x por 15 minutos cada uma. Na última lavagem as membranas permaneceram na solução até o momento da revelação. Por fim, as membranas foram reveladas em fotodocumentador (ImageQuant™ LAS 4000) pelo método de quimiluminescência com tempo de exposição à solução reveladora (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences- RPN 2106) de um minuto para grelina e 30 segundos para GAPDH. As imagens obtidas foram analisadas no programa Image J e os dados transferidos para o pacote Excel® onde foram normalizados com o padrão (GAPDH) para posterior análise estatística.

### **3.4. Análise estatísticas**

Os valores são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). Todas as variáveis foram examinadas por ANOVA de uma via, considerando o tratamento como fator. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar os grupos. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), com 95% de probabilidade.

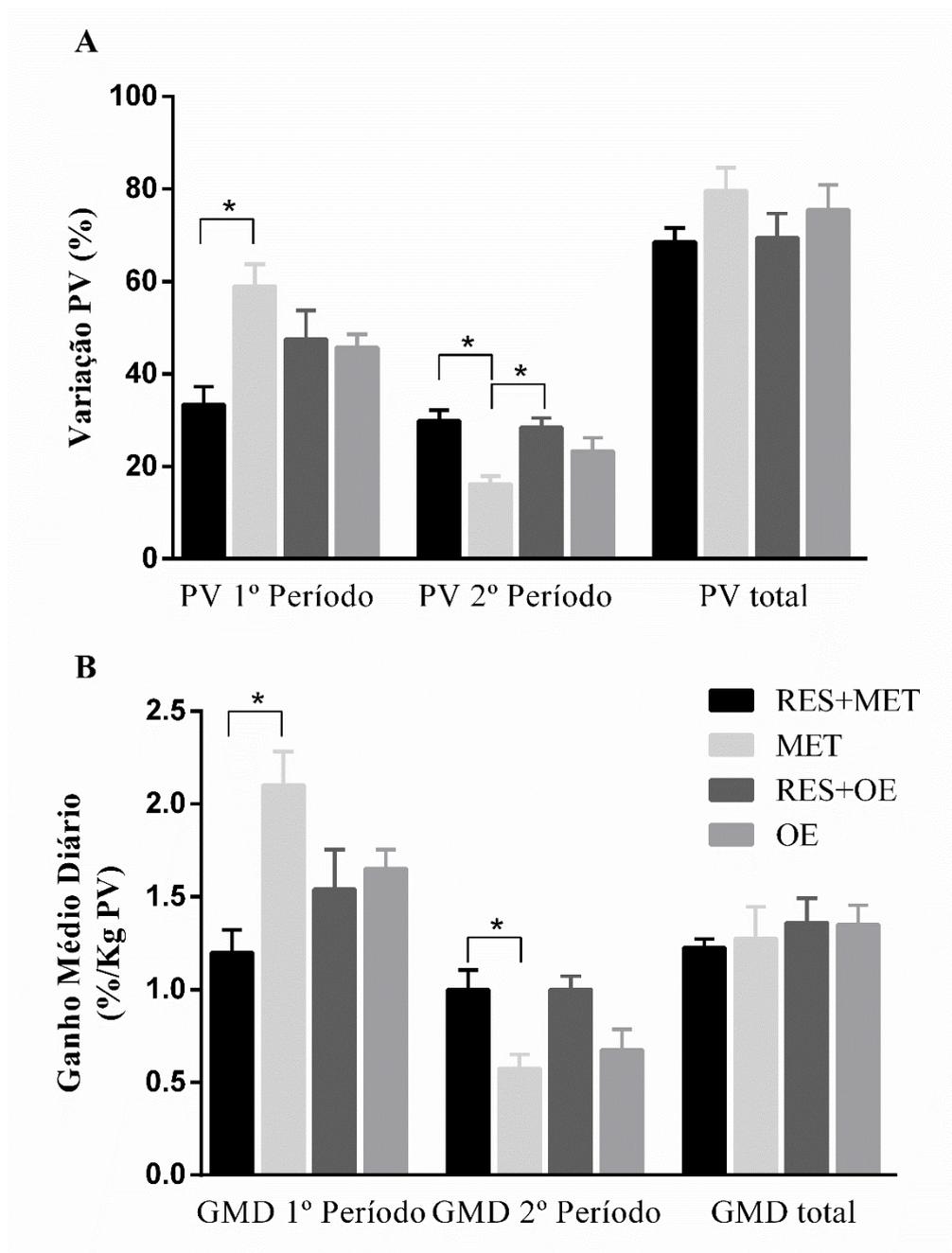
Para as análises histológicas os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, o teste empregado para se determinar a significância estatística foi a ANOVA para distribuições paramétricas e o Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Para a localização das diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foi empregado o teste de Tukey como desdobramento da ANOVA e o teste de Dunn como desdobramento do Kruskal-Wallis. Os dados foram analisados no programa Statistica 6.0 (StarSoft, Inc., Tulsa, OK), no BioEstat 5.0 (software estatístico gratuito) e no GraphPad Prism, versão 5.0. O nível de significância estipulado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 4. Resultados

### 4.1. Parâmetros zootécnicos

As médias da variação de peso e do ganho médio diário (GMD) nos períodos 1, 2 e total de bezerros submetidos ou não a restrição de leite e suplementados com aditivos, estão apresentados na Figura 6. A variação de peso durante o período 1 (Figura 6A) para os animais do grupo RES+MET foi menor que o MET, não havendo diferença entre os demais grupos (RES+MET:  $33,38 \pm 3,89$  %; MET:  $58,98 \pm 4,72$  %; RES+OE:  $47,55 \pm 6,14$  %; OE:  $45,73 \pm 2,79$  %). No período 2, houve diferença entre os grupos RES+MET e MET demonstrando aumento na variação de ganho de peso do grupo RES+MET em relação ao MET. No período 2, também houve diferença entre os grupos MET e RES+OE, demonstrando o aumento do grupo RES+OE em relação ao MET (RES+MET:  $29,83 \pm 4,63$  %; MET:  $16,20 \pm 3,34$  %; RES+OE:  $28,43 \pm 4,05$  %; OE:  $23,35 \pm 5,67$  %). Já na variação total do peso vivo ao final do experimento (dia 56 = período 1 + período 2) a variação do peso vivo total foi semelhante entre os grupos (RES+MET:  $68,58 \pm 5,93$  %; MET:  $79,63 \pm 8,64$  %; RES+OE:  $69,43 \pm 10,56$  %; OE:  $75,50 \pm 10,89$  %).

O ganho médio diário apresentado na Figura 3B, mostra o menor ganho do grupo RES+MET em relação ao MET no período 1, não havendo diferença entre os demais grupos (RES+MET:  $1,20 \pm 0,24$  %; MET:  $2,10 \pm 0,36$  %; RES+OE:  $1,54 \pm 0,47$  %; OE:  $1,65 \pm 0,2$  %). No período 2 há uma inversão ao ocorrido no período 1, pois o grupo RES+MET ficou superior ao MET (RES+MET:  $1,00 \pm 0,23$  %; MET:  $0,57 \pm 0,15$  %; RES+OE:  $1,00 \pm 0,14$  %; OE:  $0,67 \pm 0,14$  %). Já o GMD total ao final do experimento (dia 56 = período 1 + período 2) foi semelhante entre os grupos (RES+MET:  $1,22 \pm 0,09$  %; MET:  $1,27 \pm 0,34$  %; RES+OE:  $1,36 \pm 0,29$  %; OE:  $1,35 \pm 0,20$  %).



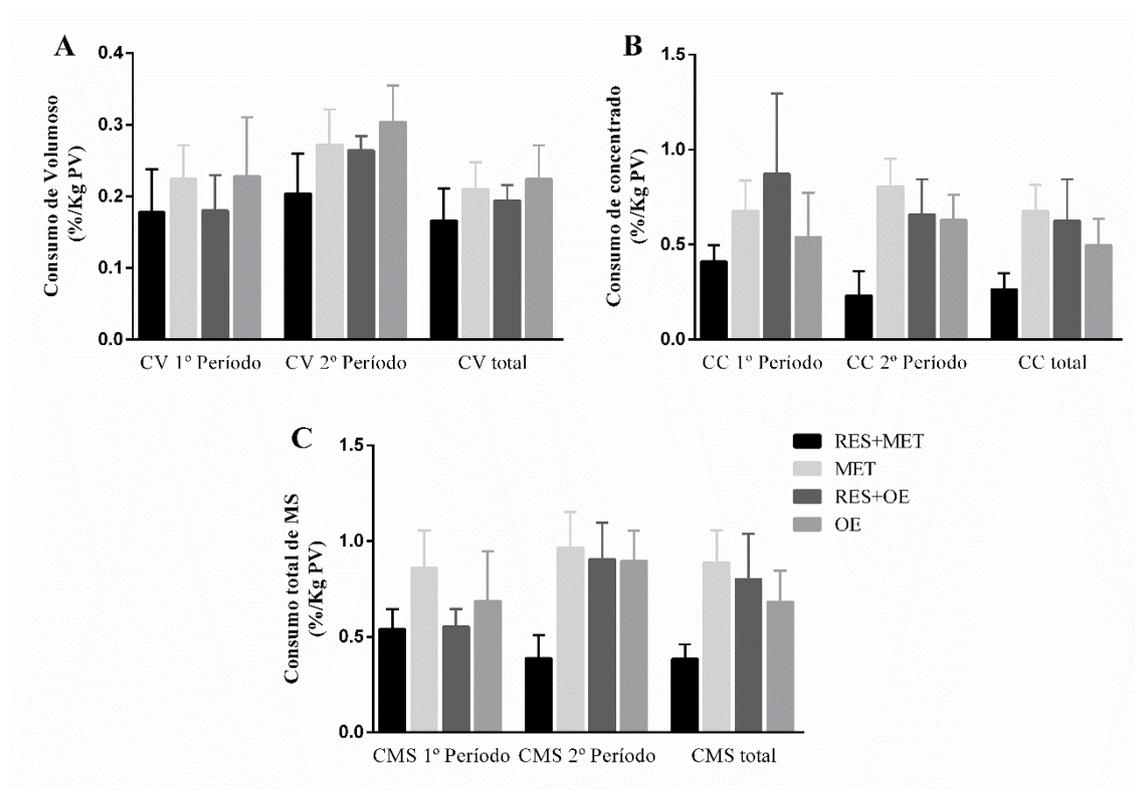
**Figura 6.** Desempenho de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos em dois períodos de 28 dias e no total de 56 dias. A: Porcentagem de ganho de peso vivo (PV) ao longo do experimento; B: Ganho Médio Diário (GMD). (N = 5 animais/grupo). Valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \* P < 0,05.

O consumo de matéria seca (MS), volumoso e concentrado está apresentado na figura 7. Apesar da restrição do fornecimento de leite nos grupos restritos no período 1, não houve diferença no consumo de volumoso (RES+MET:  $0,18 \pm 0,13$  %; MET:  $0,22 \pm 0,10$  %; RES+OE:  $0,18 \pm 0,11$  %; OE:  $0,23 \pm 0,18$  %), assim como não apresentaram diferença de consumo de volumoso no período 2 (RES+MET:  $0,20 \pm 0,12$  %; MET:  $0,27 \pm 0,10$  %; RES+OE:  $0,26 \pm 0,04$  %; OE:  $0,30 \pm 0,11$  %). O consumo de volumoso total ao final do experimento (dia 56 = período 1 + período 2) foi semelhante entre os grupos (RES+MET:

$0,16 \pm 0,10$  %; MET:  $0,21 \pm 0,08$  %; RES+OE:  $0,19 \pm 0,04$  %; OE:  $0,22 \pm 0,10$  %), (Figura 7 A).

O consumo de concentrado no período 1, apesar da restrição no fornecimento de leite para os grupos RES+MET e RES+OE não foi observado aumento de consumo nesse período (RES+MET:  $0,41 \pm 0,16$  %; MET:  $0,67 \pm 0,32$  %; RES+OE:  $0,87 \pm 0,84$  %; OE:  $0,54 \pm 0,46$  %). No período 2 também não foi observado aumento no consumo de concentrado (RES+MET:  $0,23 \pm 0,25$  %; MET:  $0,80 \pm 0,32$  %; RES+OE:  $0,65 \pm 0,37$  %; OE:  $0,63 \pm 0,26$  %). O consumo de concentrado total ao final do experimento (dia 56 = período 1 + período 2) foi semelhante entre os grupos (RES+MET:  $0,26 \pm 0,16$  %; MET:  $0,67 \pm 0,30$  %; RES+OE:  $0,62 \pm 0,43$  %; OE:  $0,49 \pm 0,27$  %), (Figura 7 B).

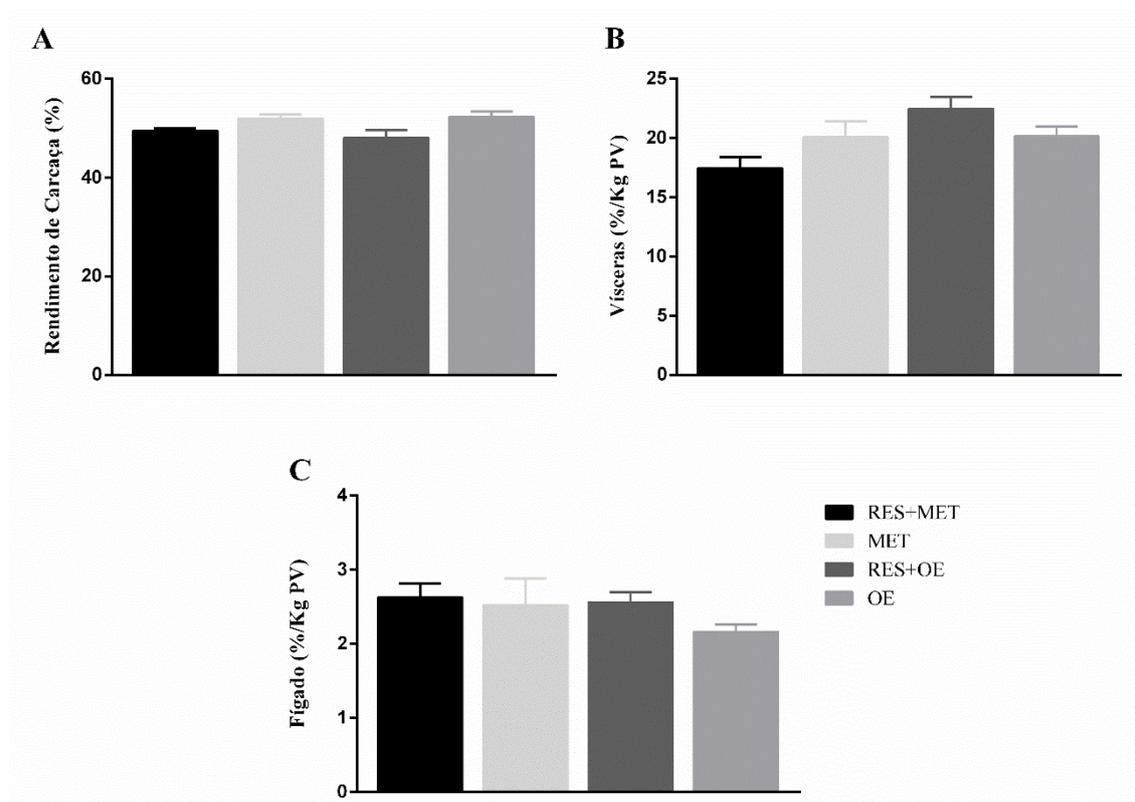
Para o consumo total de MS (volumoso + concentrado) também não houve diferença significativa entre os tratamentos no período 1 (RES+MET:  $0,54 \pm 0,20$  %; MET:  $0,86 \pm 0,38$  %; RES+OE:  $0,55 \pm 0,15$  %; OE:  $0,68 \pm 0,51$  %), no período 2 (RES+MET:  $0,38 \pm 0,24$  %; MET:  $0,96 \pm 0,37$  %; RES+OE:  $0,90 \pm 0,38$  %; OE:  $0,89 \pm 0,31$  %) e o consumo de MS total ao final do experimento (dia 56 = período 1 + período 2) também foi semelhante entre os grupos (RES+MET:  $0,38 \pm 0,15$  %; MET:  $0,88 \pm 0,37$  %; RES+OE:  $0,80 \pm 0,47$  %; OE:  $0,68 \pm 0,32$  %), (Figura 7 C).



**Figura 7:** Perfil de consumo de alimentos sólidos de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos em dois períodos de 28 dias e no total de 56 dias. A: Consumo de volumoso (CV); B: Consumo de concentrado (CC); C: Consumo de Matéria seca (CMS) total (Volumoso + Concentrado) (N =

5 animais/grupo). Matéria seca (MS); Peso Vivo (PV). Valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \*  $P < 0,05$ .

Os parâmetros relacionados à proporção corporal de rendimento de carcaça, proporção de vísceras e proporção de fígado estão dispostos na figura 8. Não foram observadas diferença entre os tratamentos no rendimento de carcaça (RES+MET:  $49,50 \pm 0,87$  %; MET:  $51,98 \pm 1,61$  %; RES+OE:  $47,95 \pm 3,18$  %; OE:  $52,30 \pm 2,42$  %), (Figura 8 A), proporção de peso de vísceras (RES+MET:  $17,45 \pm 1,86$  %; MET:  $20,06 \pm 3,07$  %; RES+OE:  $22,48 \pm 2,02$  %; OE:  $20,13 \pm 1,67$  %) (Figura 8 B) e peso proporcional de fígado (RES+MET:  $2,62 \pm 0,38$  %; MET:  $2,52 \pm 0,80$  %; RES+OE:  $2,56 \pm 0,29$  %; OE:  $2,16 \pm 0,23$  %) (Figura 8 C).



**Figura 8:** Composição de carcaça de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos ao final de 56 dias de experimentação. A: Rendimento de Carcaça; B: Proporção de peso de vísceras; C: Proporção de peso de Fígado (N = 5 animais/grupo). (PV) Peso Vivo. Valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \*  $P < 0,05$ .

#### 4.2. Parâmetros séricos bioquímicos

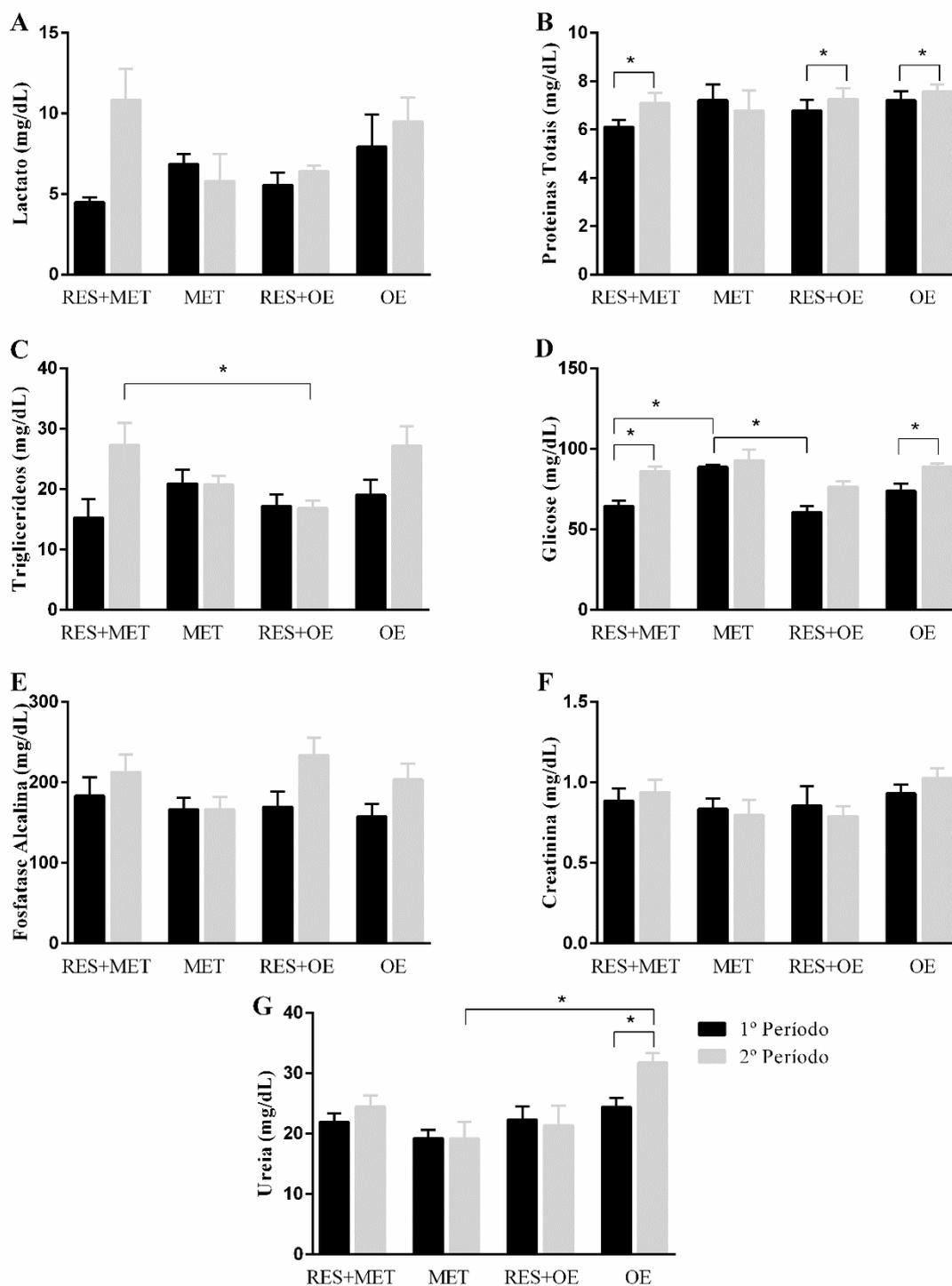
Parâmetros metabólicos de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos em dois períodos de 28 dias, estão apresentados na figura 9. Não houve diferenças entre grupos e períodos de tratamentos com relação aos níveis séricos de lactato (Figura 9 A), Fosfatase Alcalina (Figura 9 E) e Creatinina (Figura 9 F).

Para Proteínas Totais não houve diferenças entre os grupos, porém apresentaram diferenças entre os períodos para os grupos RES+MET, RES+OE e OE, encontrando valores mais elevados no período 2 quando comparados ao período 1. O grupo MET não apresentou diferença entre os 2 períodos avaliados (Figura 9 B).

Os teores de triglicerídeos não apresentaram diferença entre os grupos no período 1, porém no período 2 o grupo RES+MET apresentou valores superiores ao grupo RES+OE, não havendo diferença entre os períodos (Figura 9 C).

Os níveis séricos de glicose no período 1 apresentaram diminuição dos grupos RES+MET em relação ao MET e diminuição do grupo RES+OE também em relação ao MET. No período 2 os valores se igualaram estatisticamente não havendo diferença entre os grupos. Entre os períodos o grupo RES+MET apresentou valores menores no período 1 em relação ao período 2, comportamento semelhante foi observado também no grupo OE (Figura 9 D).

Os resultados obtidos para Ureia, não apresentaram diferença entre os grupos no período 1, porém no período 2 o grupo MET é menor que o grupo OE. Já entre períodos o grupo OE apresentou valor inferior no período 1 em relação ao período 2. Os demais grupos não apresentaram diferença entre os tratamentos (Figura 9 G).



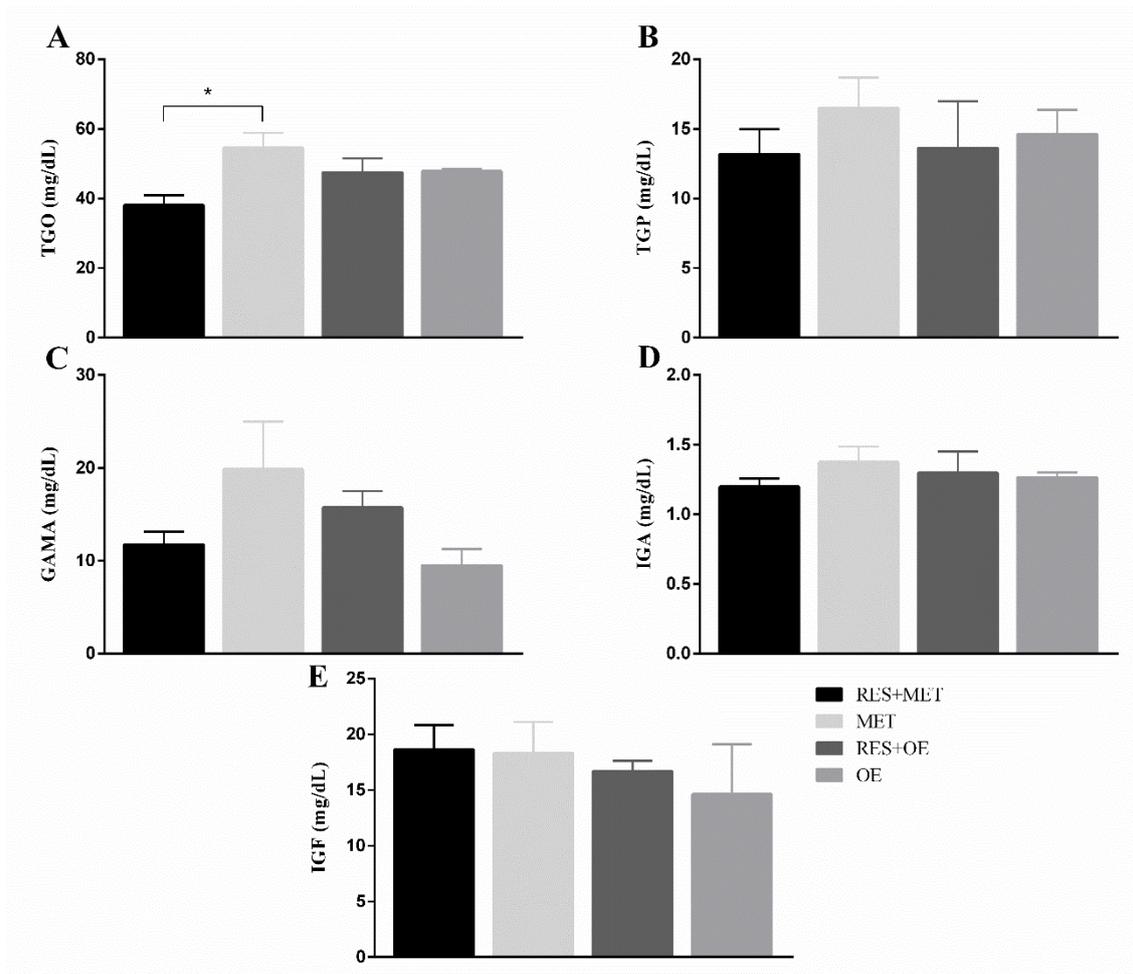
**Figura 9:** Parâmetros metabólicos de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos em dois períodos de 28 dias (N = 5 animais/grupo). Valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \* P < 0,05.

Concentrações séricas de Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmica Pirúvica (TGP), Gama Glutamil Transpeptidase (GAMA), Imunoglobulina A (IGA) e Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF) de

bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos ao final do segundo período experimental estão apresentados na figura 10.

Os resultados de TGO demonstram aumento nos valores do grupo MET em relação ao grupo RES+MET ao final do período experimental, não revelando diferença entre os demais grupos (RES+MET:  $38,13 \pm 5,55$  mg/dL; MET:  $54,63 \pm 8,35$  mg/dL; RES+OE:  $47,50 \pm 8,06$  mg/dL; OE:  $47,88 \pm 1,37$  mg/dL) (Figura 10 A). Os dados de TGP não apresentaram diferenças entre os grupos (RES+MET:  $13,20 \pm 3,94$  mg/dL; MET:  $16,50 \pm 3,77$  mg/dL; RES+OE:  $13,63 \pm 6,70$  mg/dL; OE:  $14,63 \pm 3,47$  mg/dL) (Figura 10 B), assim como os resultados de GAMA também não apresentaram diferença (RES+MET:  $11,75 \pm 2,72$  mg/dL; MET:  $19,88 \pm 10,25$  mg/dL; RES+OE:  $15,75 \pm 3,50$  mg/dL; OE:  $9,50 \pm 3,48$  mg/dL) (Figura 10 C).

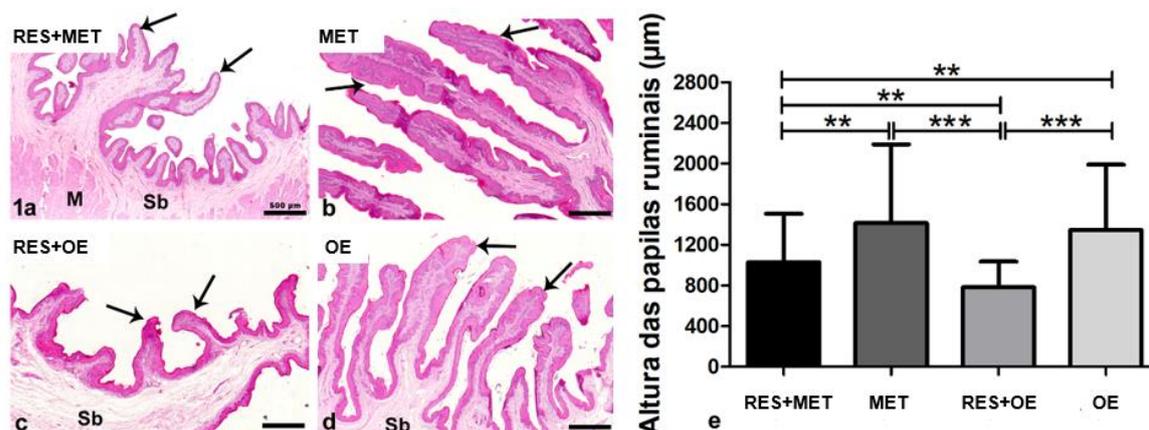
Para IGA não foi observado diferença entre os grupos (RES+MET:  $1,20 \pm 0,10$  mg/dL; MET:  $1,37 \pm 0,22$  mg/dL; RES+OE:  $1,30 \pm 0,26$  mg/dL; OE:  $1,26 \pm 0,05$  mg/dL) (Figura 10 D), assim como não foi observada diferença nos resultados obtidos para IGF (RES+MET:  $18,63 \pm 3,82$  mg/dL; MET:  $18,30 \pm 6,96$  mg/dL; RES+OE:  $16,70 \pm 1,27$  mg/dL; OE:  $14,63 \pm 7,75$  mg/dL) (Figura 10 E).



**Figura 10:** Concentrações Séricas de bezerros submetidos a diferentes manejos alimentares e suplementados com aditivos ao final do segundo período experimental (N = 5 animais/grupo). Valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \* P < 0,05.

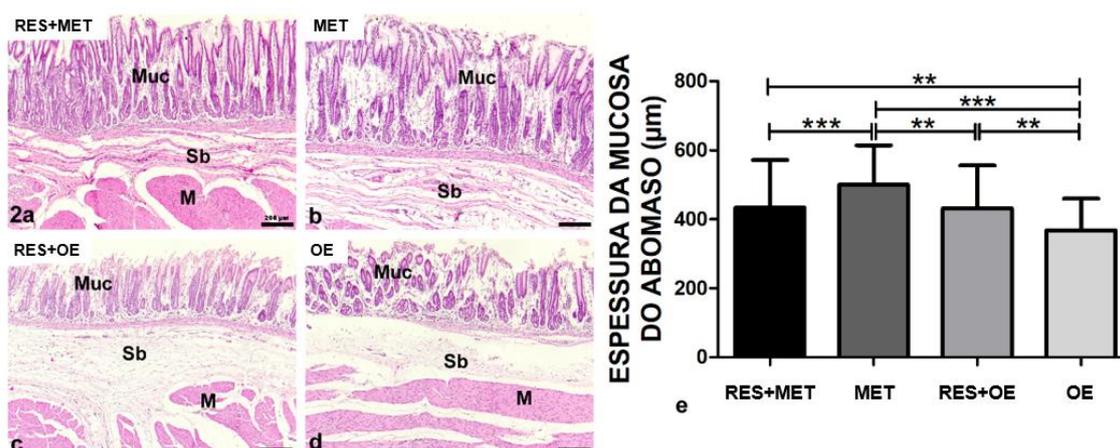
### 4.3. Parâmetros morfológicos

Os aspectos morfológicos gerais do rúmen bovino, assim como a altura das papilas ruminais entre os diferentes tratamentos podem ser observadas na figura 11. Observa-se que os grupos restritos RES+MET e RES+OE apresentam diferença na altura de papilas, sendo superior no grupo RES+MET, ressaltando que ambos os grupos restritos possuem alturas de papilas inferiores aos grupos não restritos MET e OE, estes dois grupos foram os únicos que não apresentaram diferença entre eles (Figura 11 E).



**Figura 11.** Aspectos morfológicos gerais do rúmen bovino corado com HE. Pode-se observar uma heterogeneidade morfológica das papilas ruminais entre os diferentes grupos experimentais (Fig. 11 a-d). O gráfico em barras (Fig. 11 e) mostra as diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) na altura das papilas ruminais entre os diferentes tratamentos. Foram medidas 100 papilas ruminais por grupo experimental ( $N = 5$  animais/grupo). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (\*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ ). Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Setas (papilas ruminais); Sb (submucosa); M (músculo). Barras de escala (500  $\mu\text{m}$ ).

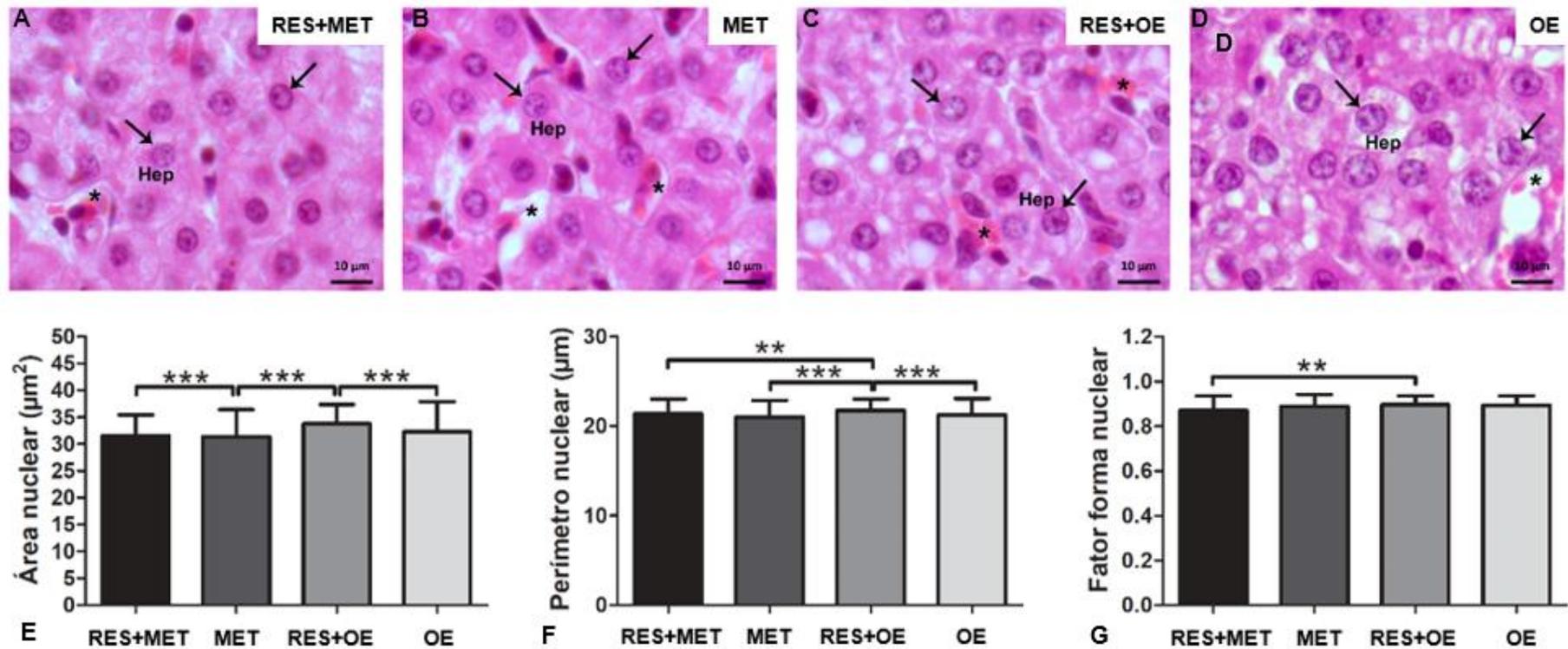
Os aspectos morfológicos gerais do abomaso bovino e a espessura da mucosa entre os diferentes tratamentos estão apresentados na Figura 12. Observa-se que o grupo RES+MET possui menor espessura quando comparado ao MET, porém possui espessura maior que o grupo OE, não apresentando diferença com o outro grupo que passou pela mesma restrição no período 1, o grupo RES+OE. O grupo MET demonstrou maior espessura dentre todos os grupos analisados, em contrapartida o grupo OE apresentou a menor espessura da mucosa do abomaso dentre os grupos avaliados (Figura 12 E).



**Figura 12.** Aspectos morfológicos gerais do abomaso bovino corado com HE. Pode-se observar uma variação na espessura da mucosa entre os diferentes grupos experimentais (Fig. 12 a-d). O gráfico em barras (Fig. 12 e) mostra as diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) na espessura da mucosa entre os diferentes tratamentos. Foram realizadas 100 medidas por grupo experimental ( $N = 5$  animais/grupo). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (\*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ ). Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Muc (mucosa); Sb (submucosa); M (músculo). Barras de escala (200  $\mu\text{m}$ ).

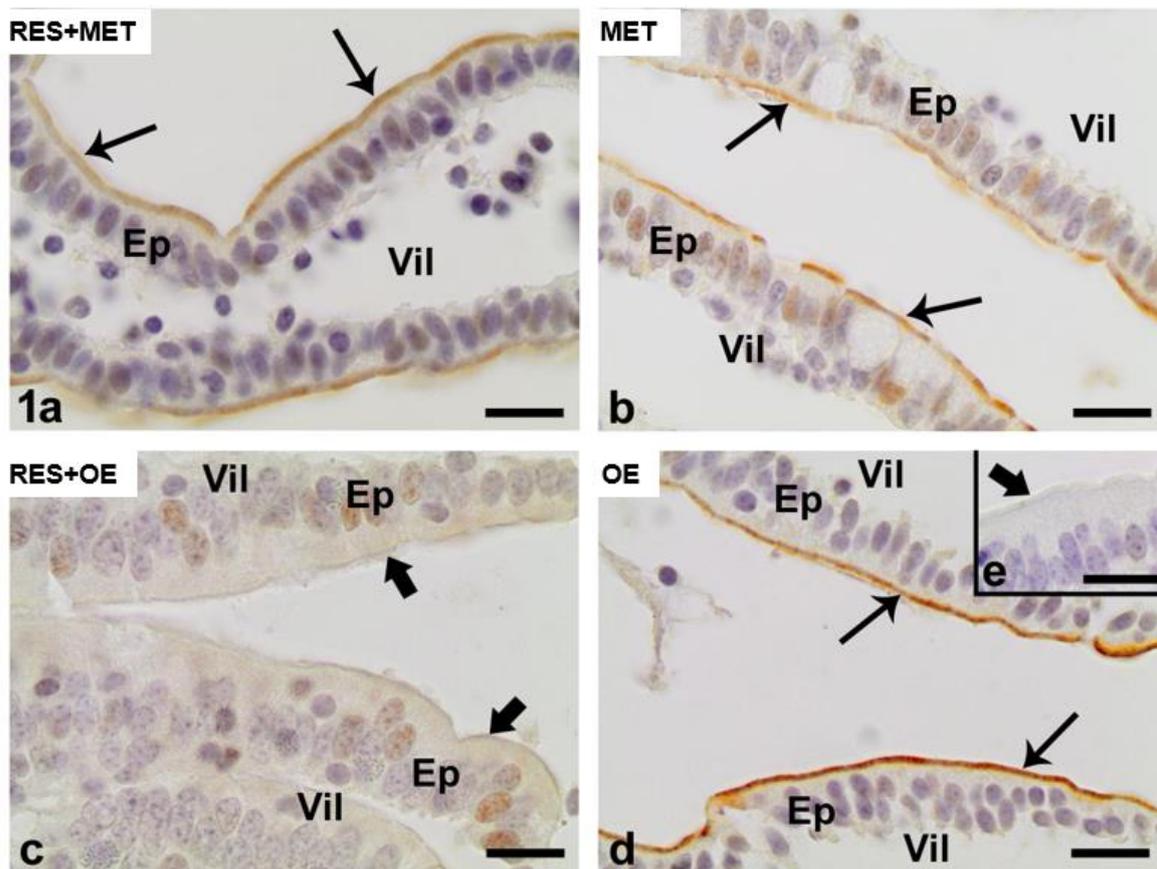
Aspectos morfológicos de variáveis nucleares (área, perímetro e fator forma nuclear) de hepatócitos bovino, estão apresentados na figura 13. O gráfico em barras (Figura 13 E) mostra as diferenças da Área Nuclear entre os grupos, demonstrando que o grupo RES+MET possui maior área nuclear quando comparado com o MET. O Grupo MET também possui menor área nuclear quando comparado com o grupo RES+OE, que também é superior ao grupo OE.

Os dados de Perímetro Nuclear mostram que o grupo RES+OE apresenta maior perímetro quando comparado com os demais grupos, os quais não apresentaram diferenças quando comparados com os demais grupos (Figura 13 F). Já o Fator Forma Nuclear apresentou diferença apenas entre os grupos RES+MET e RES+OE sendo inferior no grupo RES+MET (Figura 13 G).



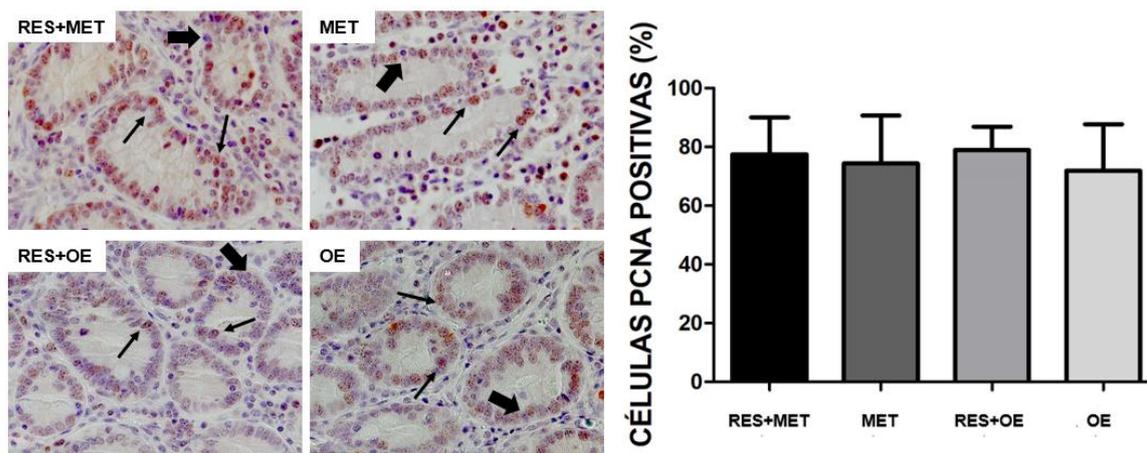
**Figura 13.** Aspectos morfológicos de variáveis nucleares (área, perímetro e fator forma nuclear) de hepatócitos bovino corado com HE (Fig. 13 a-d). Os gráficos em barras (Fig. 13 e-g) mostram as diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) destas variáveis entre os grupos. Foram realizadas 200 medidas por grupo experimental ( $N = 5$  animais/grupo). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (\*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ ). Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Hep (hepatócito); seta (núcleo do hepatócito); asterisco (sinusoide).

Na figura 14 está apresentado a Imunohistoquímica para Claudina-1 de vilosidades duodenais dos diferentes grupos experimentais. Pode-se observar a presença desta proteína na região apical das células epiteliais, indicando a integridade das junções de oclusão nos grupos RES+MET, MET e OE. Por outro lado, no grupo RES+OE não houve marcação da claudina-1, o que pode sugerir uma alteração desta estrutura celular neste grupo.



**Figura 14.** Imunohistoquímica para Claudina-1 de vilosidades duodenais dos diferentes grupos experimentais. O insert (Figura 14 E) representa o controle negativo da reação. Ep (Epitélio), Vil (Vilo), Seta comprida (regiões de ápice celular marcadas para Claudina-1), Seta larga (regiões não marcadas para Claudina-1). Barras de escala (20  $\mu$ m).

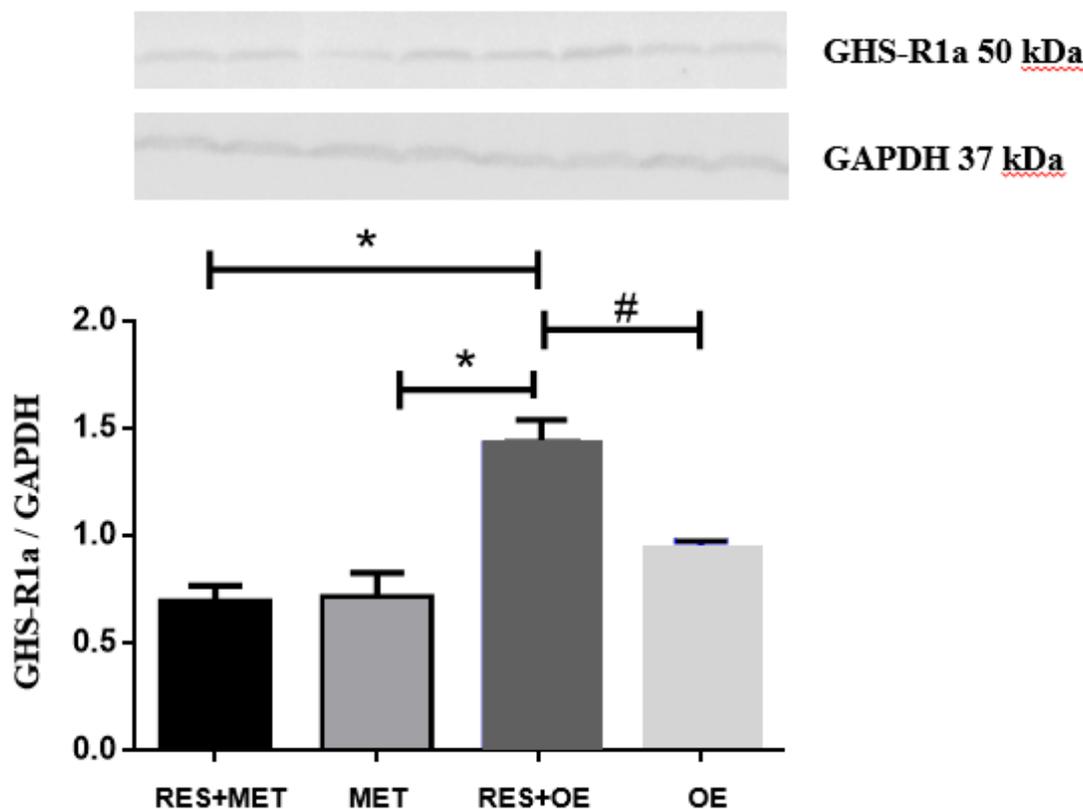
Os dados da quantificação de células PCNA positivas estão apresentados na Figura 15, onde não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados, podendo observar as marcações das células epiteliais PCNA positivas obtidas como frequência relativa (%) em relação ao número total de células.



**Figura 15.** Células PCNA positivas (%) de bezerros dos diferentes grupos experimentais (N = 3 animais/grupo). Seta comprida (Células PCNA positivas), Seta larga (Células PCNA negativas).

#### 4.4. Western Blotting

Estão apresentados na figura 16, a expressão do receptor de grelina (GHSR1) no hipotálamo dos diferentes grupos experimentais. Para a média dos valores o grupo MET foi atribuído o valor de 1, e os valores dos outros grupos foram recalculados de forma proporcional. Desta forma os resultados demonstram significativamente maior quantidade de receptores de grelina no hipotálamo no grupo RES+OE em relação aos demais grupos avaliados. Não havendo diferença significativa dentre os demais grupos.



**Figura 16.** Expressão do receptor de grelina (GHS-R1a) no hipotálamo de bezerros dos diferentes grupos experimentais (N = 5 animais/grupo). Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. \*P<0,05.

## 5. Discussão

A estratégia de avaliação do ganho compensatório consiste de duas fases, onde na primeira fase o grupo controle recebe alimento *ad libitum* ou a quantidade esperada para aquela fase de vida e o grupo restrito recebe uma porcentagem da quantidade oferecida ao grupo controle. Na segunda fase os dois grupos recebem a mesma quantidade de alimento ou *ad libitum* na mesma proporção, este período é conhecido como realimentado ou período compensatório (Nicieza & Alvarez 2009). No presente trabalho foi adotado o modelo experimental proposto por Alves et al., (2019), que consiste em restringir o fornecimento de leite (3 litros dia) por um período de 28 dias. Em sequência o fornecimento de leite é restabelecido em padrões normais (6 litros dia) por igual período. O objetivo desta manobra alimentar é induzir o mecanismo do ganho compensatório.

Dessa maneira, Murphy & Loerch (2014), afirmaram que melhorias na eficiência alimentar podem ocorrer com a alimentação restrita, resultando em uma melhor digestibilidade, reduzindo gastos de energia de manutenção, e alterando positivamente a composição final da carcaça. Existe um consenso de que a restrição alimentar em fases

iniciais do desenvolvimento exige mais tempo para compensar totalmente os efeitos da alimentação restrita quando comparada a estágios mais avançados (Morgan 1972). A idade em que ocorre a restrição alimentar é importante e pode explicar a ausência de compensação ou a maneira como ela ocorre (Lopes 2016; Berg 1991).

Com os resultados observados na Figura 6, é possível concluir que este objetivo foi alcançado. Observa-se que o tratamento RES + MET, que sofreu restrição alimentar no primeiro período, apresentou melhor desempenho no ganho de peso diário e no ganho de peso do período. No entanto o RES+OE não apresentou diferença quando comparado ao OE, demonstrando a capacidade dos óleos essenciais em minimizar os efeitos da restrição alimentar, dessa forma inibindo o efeito de ganho compensatório subsequente. Uma característica observada no mecanismo do ganho compensatório é que os animais igualam o desempenho e o peso corporal quando é considerado a integralidade do período experimental, conforme Cardoso et al., (2014) concluíram que bezerras desmamadas aos quatro meses, que obtiveram alto ganho de peso por um período (1 kg/dia), seguido de baixo ganho de peso (0,350 kg/dia), alcançaram mesmo peso aos 14 meses que aquelas que não tiveram restrição alimentar. Essa compensação no ganho de peso pode ser atribuída também ao estímulo à ingestão de alimentos sólidos quando os animais são submetidos à restrição de leite, como relatado por Baldwin et al., (2004).

Não obstante esta observação, o consumo de alimento fibroso (feno) e concentrado (ração) não diferiu para os tratamentos (Figura 7). Ficando a diferença de ingestão de nutrientes por conta do volume de leite fornecido diariamente, objetivo do modelo experimental proposto. A resposta no mecanismo do ganho compensatório geralmente não está vinculada ao aumento da ingestão de alimento (Webb et al., 2004) mas possivelmente a mudanças metabólicas e hormonais (Cerviere et al., 2005) provocadas nos animais pela manobra alimentar de restrição e fornecimento normal de nutrientes, como relatado por Soberon et al., (2012) que o fornecimento de mais um L/dia de leite, no período de realimentação, seria o suficiente para possibilitar quase o dobro de ganho de peso e taxa de crescimento corporal.

Para comprovar os efeitos da restrição alimentar em bezerros Schaff et al., (2016) submeteram 14 animais a uma dieta restrita com de leite (seis l/dia) e compararam os impactos na performance e desenvolvimento com um grupo de 14 animais alimentados na forma *ad libitum*. Os animais do grupo restrito tiveram melhor eficiência alimentar que o grupo sem restrição, e não houve diferença na ocorrência e gravidade das diarreias apresentadas pelos animais nesse período experimental de 5 semanas.

A hipótese de que ganho compensatório resulta em maior rendimento de carcaça (Barbosa et al., 2016) não foi observado no presente estudo (Figura 8). A hipótese inversa, onde o ganho compensatório resultaria em aumento do tamanho e peso das vísceras (Ryan 1990; Nicol e Kitessa 1995) também não se confirmou no presente trabalho (Figura 8). Não houve alteração em rendimento de carcaça e peso de vísceras, possivelmente devido a fatores fisiológicos (raça, sexo, idade) ou devido à natureza da restrição alimentar, assim como Ryan et al., (1990) concluíram que os bovinos podem apresentar crescimento compensatório completo, parcial ou não ter compensação após um período de restrição alimentar. Essa variabilidade nas respostas é resultado dos diversos aspectos envolvidos na manifestação do processo biológico. Dentre os fatores mais importantes que influenciam o crescimento compensatório, destacam-se a idade do animal no início da restrição, a severidade e a duração do período de estresse nutricional.

No entanto, na Figura 9 pode-se observar que a manobra alimentar (Restrito e Não Restrito), que resultou no ganho compensatório para o tratamento RES + MET, mostra que a glicemia aumentou no segundo período em relação ao primeiro período, o mesmo comportamento foi observado também no grupo OE. Também pode ser observado que no primeiro período o tratamento MET aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) a glicemia de bezerros em relação ao tratamento RES+MET e RES + OE, e não foi observada diferença entre o grupo MET e OE possivelmente devido ao maior suplemento de leite. Jacometo et al., (2016) trabalhando com suplementação de metionina para vacas leiteiras no final da gestação observaram que os bezerros do grupo MET obteve maior concentração global de insulina no plasma e glicose e proporções mais baixas de glicose / insulina indicando alterações na gliconeogênese e captação e liberação de glicose.

Ao analisar os dados de Proteínas Totais (Figura 9), pode-se observar que os dois tipos de aditivos avaliados aumentaram os níveis de proteínas circulantes após o período de restrição, mantendo dentro dos padrões analisados por Contreras (2000). Sendo que aditivos OE resultam em maior quantidade de uréia sérica, podendo demonstrar maior atividade de síntese proteica para estes tratamentos, considerando a influência do estado de nutrição, balanço hormonal, condições gerais do fígado e estresse conforme relatado por Gonzalez (2000).

O quadro metabólico se completa, com o significativo aumento dos triglicerídeos sanguíneos proporcionado pelo tratamento RES +MET em relação do RES + OE, ainda assim mesmo apresentando diferença entre os tratamentos, os valores de triglicerídeos corroboram com o estudo de Pogliani (2007) que avaliou constituintes do lipidograma em

diferentes faixas etária de bovinos. Ou seja, ocorre um maior transporte de triglicerídeos com o uso de metionina no período de ganho compensatório. Mostrando mais uma vez a ação metabólica da metionina no ganho compensatório de bezerros, como mencionado por Domingues (2018) que investigou o controle alimentar de bovinos, recebendo dieta sem volumoso em níveis de restrição de consumo.

O metabolismo hepático foi alterado pela expressão de TGO maior no tratamento MET em relação RES+MET. Isto pode ter ocorrido em função da manobra alimentar. Esta alteração não se confirma pela análise de TGP e GAMA. Ficando inconclusiva esta alteração hepática nos bezerros em função dos tratamentos (Figura 10), podendo a alteração em TGO estar relacionada a outro órgão que não o fígado. Ressaltando que não houve nenhuma alteração nos tratamentos com OE, demonstrando que os óleos essenciais neutralizam os efeitos da restrição alimentar.

No entanto, quando analisamos os dados de histologia hepática (Figura 13) observamos que o tratamento RES + MET apresentou maior área nuclear em relação ao MET. Esta maior atividade metabólica hepática pode ser em função do ganho compensatório observado no tratamento. Isto se confirma no uso de aditivos intestinais (óleos essenciais) no tratamento RES + OE com maior área nuclear em relação ao OE. O perímetro nuclear e ao fator forma nuclear são melhores avaliados para o tratamento RES + OE em relação ao tratamento RES + MET. Estes dados seriam indicativos de menor desafio hepático com o uso de aditivos reguladores da microbiota intestinal como os óleos essenciais. Este mecanismo se daria pela obtenção de uma melhor saúde intestinal.

As TJs são mantidas pelas proteínas Claudina -1 (Figura 14), entre outras proteínas. A permeabilidade intestinal representa um importante mecanismo de defesa do organismo animal. Evita que macromoléculas passem a submucosa e provoque reações inflamatórias (Anderson & Itallie, 2009) ou agressão hepática (Araujo et al., 2015). O que observamos na figura 14 é uma forte presença de Claudinas -1 nos tratamentos com metionina. Isto pode ser indicativo de uma maior integridade intestinal. Um fator importante, juntamente com a eubiose intestinal, na saúde do intestino. Assim, podemos inferir que a atividade hepática, expressa na histologia do fígado (figura 13) estaria ligada à permeabilidade intestinal e desta forma à atividade metabólica do mecanismo do ganho compensatório (Cardoso et al., 2014).

Completando o tripé da saúde intestinal, a integridade da mucosa intestinal se junta a eubiose e a permeabilidade intestinal. A figura 12 mostra a espessura de mucosa do abomaso significativamente mais desenvolvida no tratamento MET. Possivelmente o efeito trófico da metionina pode explicar esta diferença (Alves et al., 2019). Uma vez que, mesmo

com restrição alimentes (RES +MET) a mucosa abomasal se desenvolve mais em comparação ao aditivo microbiológico (OE). Sendo o abomaso um ambiente protegido contra a ação de microorganismos patogênicos pela ação do ácido clorídrico, a ação dos óleos essenciais não conseguiu se destacar. A sua vantagem seria em nível de intestino delgado. Esta atividade trófica da metionina se confirma pelos dados da figura 11. Nela observamos que a não restrição tanto MET quanto OE propiciou o crescimento fisiológico do rúmen, expresso na altura de papilas. Mas como no ambiente ruminal, a ação de microrganismos é importante para o desenvolvimento fisiológico do rúmen (Oliveira et al., 2007, Azevedo et al., 2013), o tratamento dos óleos essenciais sem restrição alimentar (OE) também superou os tratamentos com restrição alimentar (RES + MET e RES + OE). Esta ação anabólica não foi sustentada por uma ação hormonal no presente experimento. Na figura 15 pode observar que as células epiteliais intestinais não apresentaram diferença entre os tratamentos.

Os dados de IGF (figura 10) não diferiram entre os tratamentos. Segundo Schäff et al., (2016) a concentração de IGF está aumentada durante a restrição alimentar. Este aumento dos níveis séricos de IGF 1 está ligado a ação do hormônio do crescimento no fígado. A grelina liberada na mucosa gástrica atua no hipotálamo no recptores GHS-R1 $\alpha$ , desencadeando a liberação de GH (Heisler et al., 2007). A restrição alimentar aplicada no presente estudo faria o papel da liberação de grelina e esta faria o papel hormonal no mecanismo do ganho compensatório (Jurimae et al., 2003; La Cava e Matarese 2004). A ação trófica da metionina e dos óleos essenciais via atividade microbiológica faria o efeito de desenvolvimento da mucosa do trato digestivo dos bezerros.

A expressão de GHSR1 $\alpha$  (receptor de grelina), demonstrou superior apenas no tratamento RES+OE, sendo similares nos outros tratamentos analisados (Figura 16). Este resultado reflete o resultado observado em ratos, onde o jejum aumentou significativamente o nível de mRNA do GHS-R1 $\alpha$  no hipotálamo (Kim et al., 2003), porém o grupo RES+MET apesar da restrição não se mostrou superior aos grupos não restritos. Este dado sinaliza uma possível ação metabólica dos OE de forma a aumentar a expressa de GHSR1 $\alpha$  no hipotálamo.

A resposta imunológica, fator importante na saúde intestinal, não foi alterada na formação de IGA (Figura 7). A IGA é parte de um importante mecanismo de defesa dos animais, conforme relatado por Bolzan et al., (2010) o IGA protege as mucosas, como a parede do intestino, ligando-se à parede intestinal e evitando a adesão de possíveis patógenos à mucosa. A ação da metionina na resposta imunológica é imputada pela sua ação na síntese proteica a partir da formação de RNAm. Desta forma, a metionina possibilita ao sistema imune a formação de células de defesa, seja ela de base celular ou via timo e na formação de

anticorpos via medula óssea. O sistema imunológico é regulado por uma rede de comunicação bioquímica interativa, que inclui a síntese de antígenos, imunoglobulinas e citocinas (Calder 2006). Ambos os sistemas imunes (adquiridos ou inatos) são altamente dependentes da disponibilidade adequada de aminoácidos para a síntese dessas proteínas e polipeptídeos, bem como outras moléculas com enorme importância biológica (Kim et al., 2007). Assim, os aminoácidos afetam as respostas imunes individualmente de forma direta e indireta. Os óleos essenciais agem na saúde intestinal pela via de modular os microorganismos intestinais (Benchaar et al., 2008; Jayasena & Jo, 2013). Evitando a disbiose e a alteração da permeabilidade intestinal (Prado et al., 2016).

## **6. Conclusão**

Em modelo experimental de ganho compensatório a glicemia fica aumentada no período de restabelecimento da alimentação láctea.

O desenvolvimento das papilas ruminais são afetadas pela restrição alimentar. Sendo que o análogo de metionina atua de forma trófica no desenvolvimento da mucosa abomasal.

O análogo de metionina diminui as alterações morfológicas de núcleo de hepatócitos em função das manobras nutricionais advindas do ganho compensatório. A permeabilidade intestinal é mantida pela ação do análogo de metionina. Os óleos essenciais potencializam a expressão de receptores GHS-R1a no hipotálamo.

## 7. Referências Bibliográficas

- ADISSEO - Antony Parc II - 10, place du Général de Gaulle - 92160 Antony – France. For more information, visit our website [www.adisseo.com](http://www.adisseo.com), MetaSmart@Dry
- Especificações do produto REF: 201 - 800 PF 422. V1 (17/12/2013).
- AHANGARANI, M.A; BACH, A; BASSOLS, A; VIDAL, M; VALENT, D; RUIZ-HERRERA, S; TERRÉ, M. Short communication: Performance, intestinal permeability, and metabolic profile of calves fed a milk replacer supplemented with glutamic acid. *Journal of Dairy Science* Volume 103, Issue 1, Pages 433-438, 2020.
- ALVES, D; Crescimento compensatório em bovinos de corte. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98: 61-67, 2003.
- ALVES, D; Nutrição Aminoacídica de Bovinos. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.10, n.3, p. 265-271, 2004.
- ALVES, N.C; PANSANI, A.P; CASTRO, C.H; COLUGNATI, D.B; XAXIER, C.H; GUIMARÃES, K.C; RABELO, L.A; NUNES-SOUZA, V; CAIXETA, L.F.S; FERREIRA, R.N. Milk restriction or oligosaccharide supplementation in calves improves compensatory gain and digestive tract development without changing hormone levels. *PLoS ONE* 14(3): e0214626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214626> , 2019.
- AMORATI, R; FOTI, M.C; VALGIMIGLI, L; Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10835-10847, 2013.
- ANDERSON, J.M; ITALLIE, C.M.V; Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(2):a002584. doi: 10.1101/cshperspect.a002584, 2009.
- ARAÚJO, G; YUNTA, C; TERRÉ, M; MEREU, A; IPHARRAGUERRE, I; BACH, A. Intestinal permeability and incidence of diarrhea in newborn calves. *J Dairy Sci.* 2015 Oct;98(10):7309-17. doi: 10.3168/jds.2015-9666. Epub 2015.
- ASSIS, M.F; FRANCO, M.L.R.S; STÉFANI, M.V; FRANCO, N.P; GODOY, L.C; OLIVEIRA, A.C; & HOCH, A.L.V; Efeito do alecrim na defumação da carne de rã (*Rana catesbeiana*): características sensoriais, composição e rendimento. *Food Science and Technology*, 29, 553–556, 2009.
- AZEVEDO, R.A; ARAÚJO, L; DUARTE, D.V.L; CRUZ, M.S; COSTA, S.F; OLIVEIRA, N.J.F; DUARTE, E.R; GERASEEV, L.C; Desenvolvimento do trato digestivo de bezerros leiteiros criados em sistema de aleitamento fracionado. *Pesquisa Veterinária*

- Brasileira 33(7):931-936. Departamento de Zootecnia, Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M; Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475, 2008.
- BALDWIN VI, R. L; McLEOD, K. R; KLOTZ, J. L. et al. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *Journal of Dairy Science*. 87: E55-E65, 2004.
- BARBOSA, F.A; BICALHO, F.L; GRAÇA, D.S; MAIA FILHO, G.H.B; AZEVEDO, H.O; LEÃO, J.M; ANDRADE JÚNIOR, J.M.C; Compensatory gain in performance and economic efficiency of Nelore steers under different feeding regimes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, n.1, p.182-190, 2016.
- BARBOSA, L.N; RALL, V.L.M; FERNANDES, A; USHIMARU, P.I; SILVA PROBST, I; & FERNANDES, A; Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(6), 725–728, 2009.
- BEHARKA, A.A; NAGARAJA, T.G; MORRILL, J.L; Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. *Journal of Dairy Science*. 81:1946-1955, 1998.
- BENCHAAR, C.; CASALMIGLIA, S.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; MCALLISTER, T. A.; BEUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, v. 145, p. 209-228, 2008.
- BERCHIELLI, T.T; PIRES, A.V; OLIVEIRA, S.G; Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: Funep, 583p, 2006.
- BERGE, P. Long-term effects of feeding during calfhood on subsequent performance in beef cattle (a review). *Livestock Production Science*, v. 28, n. 3, p. 179-201, 1991.
- BJARNASON, I; PETERS, T.J; Influence of anti-rheumatic drugs on gut permeability and on the gut associated lymphoid tissue. *Baillière's Clinical Rheumatology Volume 10, Issue 1, Pages 165-176*, 1996.
- BOLZAN, G. N.; ANTUNES, M. M.; SCHWEGLER, E.; PEREIRA, R. A.; CORRÊA, M. N. Importância da transferência da imunidade passiva para a sobrevivência de bezerros neonatos. Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária, Pelotas, Janeiro de 2010.
- BORBA, A.M.; WRITZL, A.C.; TEIXEIRA, V.R.; KOZLOSKI, G.; ORLANDI, T.; OLIVEIRA, L. Avaliação do uso de extrato tanífero vegetal como suplemento

- dietético para vacas leiteiras em lactação. Salão do Conhecimento – Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Social. Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico Evento: XXII Seminário de Iniciação Científica. IJUÍ – RS 2014.
- BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- BÜHLER, C; HAMMON, H; ROSSI, G. L; BLUM, J. W. Small intestinal morphology in eight-day-old calves fed colostrum for different durations or only milk replacer and treated with long-R3- insulin-like growth factor I and growth hormone. *Journal of Animal Science.* 76:758– 765, 1998.
- BUSH, L.J; STANLEY, T.E; Absorption of colostrum immunoglobulins in newborn calves. *J. Dairy Sci.* 63:672-680, 1980.
- CALDER, P.C. Branched-chain amino acid and immunity. *J. Nutr.*, 135, 288S-293S, 2006.
- CALSAMIGLIA, S; BUSQUET, M; CARDOZO, P.W; CASTILLEJOS, L; FERRET, A; Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580-2595, 2007.
- CARDOSO, R.C; ALVES, B.R; PREZOTTO, L.D; THORSON, J.F; TEDESCHI, L.O; KEISLER, D.H; PARK, C.S; AMSTALDEN, M; WILLIAMS, G.L. Use of a stair-step compensatory gain nutritional regimen to program the onset of puberty in beef heifers. *Journal of Animal Science*, v.92, p. 2014-7713, 2014.
- CERVIERI, R. C.; ARRIGONI, M. B.; CHARDULO, L. A. L.; SILVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, H. N.; MARTINS, C. L. Peso vivo final, ganho de peso, características de carcaça e concentrações plasmáticas de igf-i e hormônios tireoideanos de bezerros mestiços angus-nelore recebendo somatotropina bovina recombinante (rbst) até a desmama. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 34:2009-2019, 2005.
- CHEN, W; GUO, J.X; CHANG, P; The effect of taurine on cholesterol metabolism. *Molecular Nutrition of Food Research.* 56: 681-690, 2012.
- CHURCH, D.C; Anatomy of the stomach of ruminants and pseudoruminants. In: *Digestive physiology and nutrition of ruminants.* Anais..., Metropolitan Printing, p.7-33, 1976.
- CONTRERAS, P. Indicadores do metabolismo proteico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: GONZALEZ, F.H. Perfil Metabólico em ruminantes: seu us em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

- DJENANE, D; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A; BELTRÁN, J.A; & RONCALÉS, P; Extension of the shelf life of beef steaks packaged in a modified atmosphere by treatment with rosemary and displayed under UV-free lighting. *Meat Science*, 64(4), 417–426, 2003.
- DOMINGUES, C.C. Restrição alimentar na terminação de bovinos alimentados sem volumoso. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em zootecnia, RS, 2018.
- DONOVAN, G.A; DOHOO, I.R; MONTGOMERY, D.M; BENNETT, F.L; Calf and disease factors affecting growth in female holstein calves in Florida, USA. *Preventive Veterinary Medicine*. Volume 33, Issues 1–4, Pages 1-10, 10.1016/S0167-5877(97)00059-7, 1998.
- ERASMUS, L.J.; BOTHA, P.M.; MEISSNER, H.H. Effect of protein source on ruminal fermentation and assage of amino acids to the small intestine of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v.77, n.12, p.3655-3665, 1994.
- FERREIRA, S.F; LEITE, M.A.S; TODESCATTI, S.R; FERREIRA, A.C.F. Methionine and analogs Nutrition of Cattle. *Ciência Animal*, 28(1): 130-144, 2018.
- FONTES, C.A.A; GUIMARÃES, R.F.M; ALMEIDA, M.I.V; CAMPOS, O.F; ALMEIDA, F.Q; SANT'ANA, N.F; Avaliação do ganho compensatório em novilhos mestiços Holandês-Gir: consumo e desempenho. *R. Bras. Zootec.*, v.36, n.3, p.698-708, 2007.
- GETTY, R. Anatomia dos animais domésticos – Sisson e Grossman. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 2048p.
- GONZALEZ, F.H. Perfil Metabólico em ruminantes: seu us em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- GUIL-GUERRERO, J.L; RAMOS, L; MORENO, C; ZÚÑIGA-PAREDES, J.C; CARLOSAMA-YÉPEZ, M; RUALES, P; Plant-food by-products to improve farm-animal health. *Animal Feed Science and Technology*, 220, 121-135, 2016.
- HANSEN, S.L; ASHWELL, M.S; MOESER, A.J; FRY, R.S; KNUTSON, M.D; SPEARS, J.W. High dietary iron reduces transporters involved in iron and manganese metabolism and increases intestinal permeability in calves. *Journal of Dairy Science* Volume 93, Issue 2, Pages 656-665, 2010.
- HARRIS, T.L; LIANG, Y; SHARON, K.P; SELLERS, M.D; YOON, I; SCOTT, M.F. CARROLL, J.A; Ballou, M.A; Influence of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products, SmartCare in milk replacer and Original XPC in calf starter,

- on the performance and health of preweaned Holstein calves challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Dairy Sci.* 2017 Sep;100(9):7154-7164. doi: 10.3168/jds.2016-12509, 2017.
- HARRISON, H.N; WARNER, R.G; SANDER, E.G; LOOSLI, J.K; Changes in the tissue and volume of the stomachs of calves following the removal of dry feed or consumption of inert bulk. *Journal of Dairy Science.* 43(9):1301–1312, 1960.
- HEINRICHS, A.J; JONES, C.M; ELIZONDO-SALAZAR, J.A; TERRILL, S.J. Effects of a prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. *Livestock Science*, 125(2-3), 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.04.003>, 2009.
- HEISLER L. K; PRONCHUK, N; NONOGAKI, K; ZHOU, L; RABER, J; TUNG, L; YEO, G.S; O'RAHILLY, S; COLMERS, W.F; ELMQUIST, J.K; TECOTT, L.H. Serotonin activates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis via Serotonin 2C receptor stimulation. *J. Neurosci.*, Baltimore, v. 27, n. 26, p. 6956-6964, Jun. 2007.
- HUYGHEBAERT, G. Replacement of antibiotics in poultry, In: EASTERN NUTRITION CONFERENCE, v. 80, Quebec City. Anais... Quebec City: UON, p. 1-23, 2003.
- HUYGHEBAERT, G; DUCATELLE, R; VAN IMMERSEEL, F; An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal* 187 182–188. doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.003, 2011.
- JACOMETO, C. B; ZHOU, Z; LUCHINI, D; TREVISI, E; CORRÊA, M. N; LOOR, J. J. Maternal rumen-protected methionine supplementation and its effect on blood and liver biomarkers of energy metabolism, inflammation, and oxidative stress in neonatal Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 99:6753–6763 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11018>, 2016.
- JAYASENA, D.D; JO, C; Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 34(2), 96-108, 2013.
- JURIMAE, J; MAESTU, J; JURIMAE, T. Leptin as a maker of training stress in highly trained male rowers. *European Journal of Applied Physiology.* 90: 533-538, 2003.
- KIM, M.S; YOON, C.Y; PARK, K.H; SHIN, C.S; PARK, K.S; KIM, S.Y; CHO, B.Y; LEE, H.K. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *NeuroReport.*14(10):1317–1320. 2003.
- KIM, S.W; MATEO, R.D; YIN, Y.L. Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. *Asian-Aust J Anim Sci.*, 20, 295-306, 2007.

- KONUK TAKMA, D; & KOREL, F; Impact of preharvest and postharvest alginate treatments enriched with vanillin on postharvest decay, biochemical properties, quality and sensory attributes of table grapes. *Food Chemistry*, 2016.
- KURIEN, B.T; SCOFIELD, R.H. Western blotting. *Methods*. 38: 283-293, 2006.
- LA CAVA, A.; MATARESE, G. The weight of leptin in immunity. *Nature Reviews Immunology*. 4: 371-379, 2004.
- LANA, R.P; *Nutrição e alimentação animal: mitos e realidades*. 2a ed. Viçosa: UFV, v. 1. Pag. 344, 2007.
- LAPIERRE, H., M. VÁZQUEZ-AÑÓN, D. PARKER, P. DUBREUIL, G. HOLTROP, AND G. E. LOBLEY. Metabolism of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoate (HMTBA) in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*. v.94, p.1526-1535, 2011.
- LEE, C. et al. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 95, n. 10, p. 6042-6056, 2012.
- LESMEISTER, K. E; TOZER, P.R; HEINRICHS, A.J. Development and analysis of a rumen tissue sampling procedure. *Journal of Dairy Science*. 87(5): 1336-1344, 2004.
- LESSON, S; ZUBAIR, A. K. Nutrition of the Broiler Chicken Around the Period of Compensatory Growth. *Poultry Science*. 76:992–999, 1997.
- LOPES, R.B; *Avaliação bioeconômica do crescimento compensatório em sistemas de produção de bovinos de corte*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, 2016.
- LORENZ, I; MEE, J.F; EARLEY, B; MORE, S.J; Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. *Irish Veterinary Journal*, Received 12 July 2011; Accepted 14 September 2011; First Online 14 September 2011; DOI <https://doi.org/10.1186/2046-0481-64-9>, 2011.
- MANCIO, A.B; TONISSI, R.H; GOES, B; CASTRO, A.L.M; CECON, P.R; SILVA, A.T.S; Características de Carcaças de Bezerros de Rebanhos Leiteiros Desmamados Precocemente e Alimentados com Diferentes Dietas Líquidas. *R. Bras. Zootec.* 34:1297-1304, 2005.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 23 DE OUTUBRO DE 2017. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Publicado em: 09/11/2017, Edição: 215, Seção: 1, Página: 5

- MIRANDA, M.V.F.G; TEÓFILO, T.S; ASSIS, A.P.P; FONTENELE NETO, J.D; LIMA, P.O; Desenvolvimento dos estômagos de bezerros aleitados com leite em pó e soro de queijo em pó reconstituídos. II Congresso Internacional das Ciências Agrárias COINTER-PDVAgro, 2017.
- MONÇÃO, F.P; OLIVEIRA, E.R; MOURA, L.V; TONISSI, R.H; GÓES, B; Development of microbiota ruminal calf - literature review. Montes Claros, v. 15, n.1 - jan. 2013.
- MONTANHOLI, Y; FONTOURA, A; SWANSON, K; COOMBER, B.R; YAMASHIRO, S; MILLER, S. Small intestine histomorphometry of beef cattle with divergent feed efficiency. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55: 9-15, 2013.
- MORGAN, J. H. L. Effect of plane of nutrition in early life on subsequent live-weight gain, carcass and muscle characteristics and eating quality of meat in cattle. *The Journal of Agricultural Science* 78(03):417-423, 1972.
- MOYO, B, MASIKA, P.J; MUCHENJE, V. Effect of feeding Moringa (*Moringa oleifera*) leaf meal on the physico-chemical characteristics and sensory properties of goat meat. *South African Journal of Animal Science*, 44, 64 –70, 2014.
- MULLER, L; TEIXEIRA PRIMO, A. Influência do regime alimentar no crescimento e terminação de bovinos e na qualidade da carcaça. *Pesquisa agropecuária brasileira*. 21(4): 445-452, 1986.
- MURPHY, T.A; LOERCH, S.C. Effects of restricted feeding of growing of steers on performance, carcass characteristics, and composition. Department of Animal Science, the Ohio State University, 2014.
- NABUURS, M.J.A; Microbiological, structural and functional changes of the small intestine of pigs at weaning. *Pigs News and Information*. Oxfordshire. 16: 93 – 97, 1995.
- NICIEZA, A. G., ÁLVAREZ, D. Statistical Analysis of Structural Compensatory Growth: How Can We Reduce the Rate of False Detection? *Oecologia*. 159:27-39, 2009.
- NICOL, A. M.; KITESSA, S. M. Compensatory growth in cattle - refis. In: proceedings of the new zealand society of animal production. Conference... New Zealand: Otago University, 55, 157-160, 1995.
- NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of beef cattle, 7 ed. Washington: National Academy Press, 242p, 1996.
- NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th.ed. Washington: National Academic Press, 381p, 2001.
- NUSSIO, C.M.B; SANTOS, F.A.P; ZOPOLLATT, M; PIRES, A.V; MORAIS, J.B; FERNANDES, J.J.R; Parâmetros de fermentação e medidas morfológicas dos

- compartimentos ruminais de bezerros leiteiros suplementados com milho processado (Floculado vs. Laminado a vapor) e monensina. *R. Bras. Zootec.* 32:1021-1031, 2003.
- O'DONOVAN, P. B. Compensatory gain in cattle and sheep. *Nutrition Abstracts.* 33: 54-389, 1984.
- OLIVEIRA, J. S; ZANINI, A. M.; SANTOS, E. M. Fisiologia, manejo e alimentação de bezerros de corte. *Arquivo de Ciências Veterinária e Zoologia.* 10: 39-48, 2007.
- PARIS, M; KUSS, F; HENRIQUE, D.S; GNOATTO, A.A; CULLMANN, J; ZANOTTI, J; Desenvolvimento de bezerras leiteiras submetidas à alimentação sólida comercial ou caseira durante o aleitamento. In: I Congresso de ciência e tecnologia da UTFPR. Dois Vizinhos-PR, 2012.
- PAULO, R. E. C. e RIGO, E. J. Dietas com milho grão inteiro como alternativa em confinamento sem volumoso. *Cadernos de Pós-Graduação da FAZU*, v.3, 2012.
- PICKLER, L.; SANTIN, E.; SILVA, A.V.F. Alternativas aos antibioticos para equilibrar a microbiota gastrointestinal de frangos. *Archives of Veterinary Science.* v.16, n.3, p.1-13, 2011.
- POGLIANI, F.C; JUNIOR, E.B. Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça holandesa, criados no Estado de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 44, n. 5, p. 373-383, 2007.
- PRADO, I.N; CRUZ, O.T.B; VALERO, M.V; ZAWADZKI, F; EIRAS, C.E; RIVAROLI, D.C; VISENTAINER, J.V; Effectsofglycerin andessential oils (Anacardiumoccidentale and Ricinus communis) on the meat quality of crossbred bulls finished in a feedlot. 2016.
- REIS. A. R.; MORAIS. S. A. J.; SIQUEIRA. R. G.; Aditivos alternativos para a alimentação de ruminantes, IN: II Congresso Latino-Americano de Nutrição 35 Animal (II CLANA) Palestra Técnica Realização: CBNA - AMENA – São Paulo, SP - 10 a 13 de abril de 2006.
- RIVAROLI, D.C; GUERRERO, A; VELANDIA VALERO, M; ZAWADZKI, F; EIRAS, C.E; CAMPO, M.D.M; PRADO, I; Effect of essential oils on meat and fat qualities of crossbred young bulls finished in feedlots. *Meat Science*, 121, 278–284, 2016.
- ROBERT, J. C. C.; RICHARD, C.; BOUZA, B. Influence of monomer or dimer forms of isopropyl ester of HMB on the supply of metabolizable methionine to the blood of ruminants. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 84 (Suppl. 1), p. 281. (Abstr.) 2001.

- RULQUIN, H.; DELABY, L. Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rumen-protected methionine. *Journal of Dairy Science*, v.80, n.10, p.2513- 2522, 1997.
- RULQUIN, H.; GRAULET, B.; DELABY, L.; ROBERT, J. C. Effect of different forms of methionine on lactational performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 89, p. 4387-4394, 2006.
- RYAN, W.J.; Compensatory growth in cattle and sheep. *Nutrition abstracts and reviews*. 50: 653-664, 1990.
- SANTOS, F.A.P. Conceitos atuais de nutrição protéica. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. (Ed). *Confinamento de bovinos*. Piracicaba: FEALQ, p.51-68, 1997.
- SAUTER, S.N; ROFFLER, B; PHILIPONA, C; MOREL, C; ROMÉ, V; GUILLOTEAU, P; HAMMON, H. M; Intestinal development in neonatal calves: Effects of glucocorticoids and dependence on colostrum feeding<sup>1</sup>. *Neonatology*. 85(2): 94–104, 2004.
- SCHÄFF, C. T.; GRUSE, J.; MACIEJ, J.; MIELENZ, M.; WIRTHGEN, E.; HOEFLICH, A.; HAMMON, H. M. Effects of feeding milk replacer *ad libitum* or in restricted amounts for the first five weeks of life on the growth, metabolic adaptation, and immune status of newborn calves. *PLoS ONE*. 11(12), e0168974. 2016.
- SCHROEDER, G. F.; TITGEMEYER, E. C.; AWAWDEH, M. S.; SMITH, J. S.; GNAD, D. P. Effects of energy level on methionine utilization by growing steers. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 84, p. 1497-1504, 2006.
- SILVA, T.M; OLIVEIRA, M.D.S; ARTONI, S.M.B; CRUZ, C; Desenvolvimento alométrico do trato gastrintestinal de bezerros da raça holandesa alimentados com diferentes dietas líquidas durante o aleitamento. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringá, v. 26, no. 4, p. 493-499, 2008.
- SOBERON, F., RAFFRENATO, E., EVERETT. R.W., Van AMBURGH, M.E. 2012. Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 95: 783-793.
- SPANGHERO, M; ROBINSON, P.H; ZANFI, C; FABBRO, E; Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 153(1–2), 153-157, 2009.

- SPANGHERO, M; SALEM, A.Z.M; ROBINSON, P. H; Chemical composition, including secondary metabolites, and rumen fermentability of seeds and pulp of Californian (USA) and Italian grape pomaces. *Animal Feed Science and Technology*, 152(3–4), 243-255, 2009.
- TAMURA, A; TSUKITA, S; Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: advances in the field of barrierology revealed in knockout mice. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Dec; 36:177-85. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.019. Epub 2014.
- UYENO, Y; KAWASHIMA, K; HASUNUMA, T; WAKIMOTO, W; NODA, M; NAGASHIMA, S; AKIYAMA, K; TABATA, M; KUSHIBIKI, S; Effects of cellooligosaccharide or a combination of cellooligosaccharide and live *Clostridium butyricum* culture on performance and intestinal ecology in Holstein calves fed milk or milk replacer. *Livestock Science*. Volume 153, Issues 1–3, Pages 88-93, 2013.
- VAN SOEST, P.J; Nutritional ecology of the ruminant. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ASRMSTRONG, D.G.; Control of follicular interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82: 63-74, 2004.
- WOOD, K.M; PALMER, S.I; STEELE, M.A; METCALF, J.A; PENNER, G.B. The influence of age and weaning on permeability of the gastrointestinal tract in Holstein bull calves. *J Dairy Sci.* 2015 Oct;98(10):7226-37. doi: 10.3168/jds.2015-9393. Epub 2015.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 11 de abril de 2020.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO RELATÓRIO FINAL DO PROTOCOLO N.º. 095/17**

**I. IDENTIFICAÇÃO:**

1. **Título do projeto:** Efeito do sistema de aleitamento no desenvolvimento do trato digestivo de bezerros
2. **Pesquisador(es) Responsável(is):** Luis Fernando de Sousa Caixeta
3. **Unidade/Órgão:** ICB/UFPG
4. **Pesquisador(es) Participante(s):**
5. **Unidade onde foi realizado:** Setor de Campo do Laboratório de Fisiologia da Digestão da Universidade Federal de Goiás (UFPG), Câmpus Samambaia – Goiânia – Goiás
6. **Total de animais por espécie utilizados:** Foram utilizados bovinos mestiços, 20 machos
7. **Data de apresentação do protocolo ao CEUA:**
8. **Data de apresentação do Relatório Final:** 15 de março de 2021

**II - Parecer da CEUA:**

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, **APROVOU** o Relatório Final do projeto acima referido, por estar de acordo com a Resolução Normativa n.º1 da Lei 11.794/08 e estar em consonância com os princípios éticos vigentes.

Desta forma, o emprego de animais deste protocolo encontra-se concluído. É permitido ao pesquisador o processamento posterior de dados e de amostras biológicas obtidas dos animais aprovados durante a vigência do projeto, portanto, torna-se importante manter a documentação referente à aprovação arquivada.

**III - Data da reunião:** 12/04/2021.

**Dra. Liliana Borges de Menezes Leite**  
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFPG

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFPG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Câmpus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: [ceua.ufg@gmail.com](mailto:ceua.ufg@gmail.com)