

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**NATÁLIA ALVES COSTA**

**MANIPULAÇÕES ALIMENTARES EM DIFERENTES FASES DO  
DESENVOLVIMENTO DE BOVINOS**

Goiânia – GO  
Fevereiro – 2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO 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 nº 9610/98, 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.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     Dissertação     Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

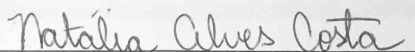
Nome completo do autor: Natália Alves Costa

Título do trabalho: MANIPULAÇÕES ALIMENTARES EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DE BOVINOS


**3. Informações de acesso ao documento:**

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

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Prof. Dr. **Reginaldo Nassar Ferreira**  
Universidade Federal de Goiás

Data: 06 / 03 / 2019

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados 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

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**MANIPULAÇÕES ALIMENTARES EM DIFERENTES FASES DO  
DESENVOLVIMENTO DE BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição associada Universidade Federal de Goiás como um dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Dr. Reginaldo Ferreira Nassar

Goiânia – GO  
Fevereiro – 2019

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

Alves Costa, Natália  
MANIPULAÇÕES ALIMENTARES EM DIFERENTES FASES DO  
DESENVOLVIMENTO DE BOVINOS [manuscrito] / Natália Alves  
Costa. - 2019.  
cxx, 120 f.: il.

Orientador: Prof. Reginaldo Ferreira Nassar.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas, Goiânia, 2019.  
Bibliografia. Anexos.  
Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Restrição alimentar. 2. Prebióticos . 3. Taurina. I. Ferreira Nassar,  
Reginaldo, orient. II. Título.

CDU 612.3

---



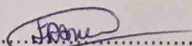
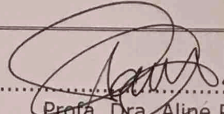
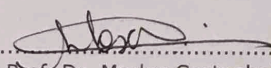
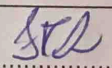
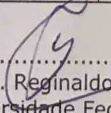
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

## SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE Nº 2

Título do Trabalho: MANIPULAÇÕES ALIMENTARES EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DE BOVINOS.

Autor (a): **Natália Alves Costa**

Tese nº 2 do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, defendida e aprovada em sessão pública, na data de 22 de fevereiro de 2019, às 14:00 horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas I da Universidade Federal de Goiás, cuja banca examinadora esteve constituída dos seguintes professores:

 Prof. Dr. Francisco Ribeiro de Araujo Neto Instituto Federal Goiano	 Prof.ª. Dra. Aline Priscila Pansani Universidade Federal de Goiás
 Prof. Dr. Marlos Castanheira Pontifícia Universidade Católica de Goiás	 Prof.ª. Dra. Fabiana Ramos dos Santos Instituto Federal Goiano
 Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira Universidade Federal de Goiás	

Houve mudança no título? Sim ( ) Não (X)

Caso haja mudança, escrever abaixo o novo título da dissertação/tese:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Goiânia, 22/02/2019.

## **DEDICATÓRIA**

---

Ao meu amado afilhado, que olha por mim e por toda minha família de um lugar muito especial. Pelos teus ensinamentos e força, esta conquista eu dedico a você, meu anjinho.

*“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”.*

Steve Jobs

## AGRADECIMENTOS

Especial agradecimento ao **Prof Dr Reginaldo** que sempre acreditou no meu trabalho e potencial. Nesses muitos anos de jornada me acolheu em seu laboratório com muito carinho e dedicação para que eu pudesse alcançar um sonho. Obrigada por “abrir a porta” e me permitir crescer profissionalmente e como ser humano, aliás, **MUITO OBRIGADA** pela sua compreensão em todos os momentos dessa caminhada. Deus ilumine sempre sua vida. Todo meu respeito e admiração.

Aos Professores **Dr Francisco Neto, Dr Carlos Xavier, Dr Carlos Castro e Dr Diego Colugnati**, muito obrigada! Vocês são pessoas iluminadas e que contribuíram muito para a finalização dessa árdua e intensa tarefa. Saibam que vocês foram essenciais em todos os momentos e sou privilegiada de um dia ter conhecido e podido receber tanta cooperação durante o desenvolvimento do trabalho.

À **Professora Aline Pansani** por toda calma e ensinamentos de técnicas para aprimorar meus resultados. Obrigada também por estar sempre disponível para solucionar minhas dúvidas ou apenas para uma boa conversa.

Aos meus pais, **Aroldo e Marina**, que sempre se sacrificaram para proporcionar tudo de melhor para mim e minhas irmãs. O amor e compreensão de vocês me inspiram a cada passo, e esse degrau foi mais um que subi apoiada nos ensinamentos e educação que recebi de vocês.

Às minhas irmãs, **Gabriela e Camila**, vocês são luz no meu caminho! Obrigada por me apoiarem e estarmos sempre juntas.

À minha irmã do coração **Lorena**, que nunca me deixou desanimar frente às dificuldades ao longo de jornadas anteriores que me levaram ao dia de hoje! É bom saber que temos alguém em quem podemos confiar, rir, desabafar e viajar!

Aos meus amigos **Luis Fernando, Joice, Olívia, Magner, Pedro Henrique, Mateus Lacerda e Diego** que participaram ativamente do trabalho de campo e nunca me negaram qualquer ajuda, pelo contrário, deixaram de fazer suas coisas para atender ao projeto. Estarão sempre no meu coração.

Ao **Setor de Suinocultura** da EVZ pela disponibilidade do espaço físico para realização de um dos experimentos.

Aos responsáveis pelos **Laboratório de Histologia da EVZ, LACES e Laboratório Integrativo de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica** pela disponibilização de equipamentos e matérias necessários para realização de procedimentos indispensáveis para concretização dos resultados.

Ao **Prof Dr James Drouillard** pela recepção e oportunidade dada para que fosse possível a realização do Doutorado Sanduíche na Kansas State University (K-State). Muito obrigada pela atenção e todo conhecimento que foi proporcionado nesse ano de experiência internacional.

Ao **Diogo Fleury**, que na época era gerente do confinamento na K-State e se tornou um amigo juntamente com sua esposa, **Giovana**. Obrigada por todas as palavras de apoio e ensinamentos, você é inspiração por onde passa!

Aos meus amigos do trailer, **Lucas, Vanessa, Gabriel, Tainá, Andrea, Natália, João, Alice e Lucas (Troid)** que compartilharam comigo muito trabalho e momentos de diversão.

Aos colegas de trabalho do confinamento da K-State por me ensinarem a rotina e muito do que aprendi da língua Inglesa. Obrigada pela paciência!

À técnica de laboratório **Dr<sup>a</sup> Haixia** que tanto me ajudou nas análises sanguíneas.

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

Aos órgãos financiadores **FAPEG, CAPES, K-State e Empresa YES** pela concessão de bolsa e/ou apoio financeiro que viabilizaram a execução deste projeto.

**AOS ANIMAIS** que desempenharam um papel decisivo para a realização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração dos estômagos de bovinos adultos.....	15
Figura 2. Goteira esofágica em bezerros.....	16
Figura 3. Mecanismo de ação dos prebióticos.....	20
Figura 4. Mecanismos de ação da grelina na tentativa de manter os níveis séricos de glicose normais e evitar prolongada hipoglicemia.....	27
Figura 5. Carne DFD.....	30
Figura 6. Biossíntese da taurina à partir dos aminoácidos cisteína e metionina.....	34
Figura 7. Bezerro do ensaio experimental.....	41
Figura 8. Fornecimento de alimento sólido.....	43
Figura 9. Coleta de material histológico.....	45
Figura 10. Performance de bezerros em fase de aleitamento.....	52
Figura 11. Parâmetros metabólicos de bezerros em fase de aleitamento.....	54
Figura 12. Concentrações hormonais de bezerros em fase de aleitamento.....	55
Figura 13. Histomorfometria de papilas ruminais e mucosa do intestino delgado de bezerros em fase de aleitamento.....	56
Figura 14. Expressão de receptores de grelina na região paraventricular de bezerros em fase de aleitamento.....	57
Figura 15. Setor experimental da Universidade Estadual do Kansas.....	66
Figura 16. Preparação para análise de metabólitos séricos.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição bromatológica do leite e alimentos sólido.....	42
Tabela 2. Composicao da dieta de animais confinados e suplementados com 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% de taurina na dieta (MS).....	67
Tabela 3. Performance de animais em confinamento alimentados com suplementação de 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% de taurina na dieta (MS).....	72
Tabela 4. Características de carcaça de novilhos suplementados com 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% de taurina na dieta (MS).....	73
Tabela 5. Concentração sérica de triglicerídeos (mg/ dl), lactato (mg/ dl), glicose (mg/ dl) e taurina (nmol/ml) nos dias 0 e 91 de novilhos confinados alimentados com 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% de taurina na dieta (MS).....	75
Tabela 6. Efeito da adição de taurina no sistema de fermentação <i>in vitro</i> .....	76

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AGV** – Ácido graxo volátil

**ANOVA** - Análise de variância

**CMS** – Consumo de matéria seca

**CuSO<sub>4</sub>** – Sulfato de cobre

**DFD** – Dry, firm, dark (seca, firme, escura)

**DIVMS** - Digestibilidade in vitro da matéria seca

**FOS** – Fosfoligossacarídeo

**IGH** – Fator de crescimento semelhante à insulina

**GH** – Hômonio do crescimento

**GMD** – Ganho de peso médio

**KOH** – Hidróxido de potássio

**MOS** – Mananologossacarídeo

**MS** – Matéria seca

**PCQ** – Peso de carcaça quente

**PG** – Potencial glicolítico

**PYY** – Peptídeo YY

**SNC** – Sistema nervoso central

**USDA** – Departamento de agricultura dos Estados Unidos

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
APRESENTAÇÃO.....	iii
<b>Capítulo I</b>	
REVISÃO DA LITERATURA.....	15
I.1 Fase de aleitamento e o desenvolvimento do trato gastrointestinal de bovinos.....	15
I.2 Prebióticos.....	18
I.3 Restrição alimentar e ganho compensatório.....	22
I.4 Grelina.....	25
I.5 Bovinos em fase de terminação.....	29
I.6 Carne DFD.....	30
I.7 Glicogênio.....	31
I.8 Taurina.....	33
<b>Capítulo II</b>	
Objetivos Experimento 1.....	36
Objetivos Experimento 2.....	37
<b>Capítulo III</b>	
EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR E DA SUPLEMENTAÇÃO DE PREBIÓTICO DESENVOLVIMENTO DE BEZEROS EM FASE DE ALEITAMENTO INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	51
DISCUSSÃO.....	57
<b>Capítulo IV</b>	
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE TAURINA EM BOVINOS CONFINADOS E NA PRODUÇÃO IN VITRO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS E GASES INTRODUÇÃO.....	63
MATERIAL E MÉTODOS.....	64
RESULTADOS.....	71
DISCUSSÃO.....	75
<b>Capítulo V</b>	
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS.....	97

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos fisiológicos, bioquímicos e metabólicos da restrição de leite e suplementação de prebióticos na fase de aleitamento e, os mesmos efeitos, da suplementação de taurina na fase de terminação de bovinos. Foram realizados dois experimentos para alcançar os objetivos mencionados. No primeiro ensaio foram utilizados 20 bezerros com peso inicial aproximado de 38 kg e alojados em baias individuais por 56 dias divididos em dois períodos de 28 dias cada. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: animais que receberam 6 L de leite nos períodos 1 e 2 (CON), animais com restrição de 50% do leite no primeiro período e realimentados no segundo período (RES), animais sem restrição recebendo suplementação de 5 g/dia de mananoligossacarídeo (MOS) ou frutoligossacarídeo (MFOS) em animais sem restrição. Foi verificado o ganho de peso e consumo de ração. O soro foi utilizado para a determinação de glicose, lactato, creatinina, triglicerídeos, urea, proteína total e dos hormônios grelina e leptina. Na região paraventricular do hipotálamo, foi avaliada a expressão do receptor de grelina (GHS-R1a). O rúmen e intestino delgado foram utilizados para avaliar o desenvolvimento do trato gastrointestinal: comprimento de papila ruminal, altura de vilosidade e profundidade de cripta intestinal. Foi observado um menor ganho de peso do grupo restrito no primeiro período e nenhuma diferença no ganho de peso dos grupos no segundo período. Observou-se que os animais do grupo suplementado com prebiótico (MOS) apresentaram um aumento significativo na altura da vilosidade jejunal. O desenvolvimento ruminal foi favorecido pela suplementação de mananoligossacarídeos (grupo MOS), que aumentou significativamente o comprimento das papilas ruminais. Nenhuma diferença foi encontrada entre os tratamentos nos períodos 1 e 2 ( $P > 0,05$ ) entre os grupos para concentração sérica de grelina e leptina e na expressão de receptores de grelina na região paraventricular do hipotálamo. O segundo ensaio foi realizado por um período de 123 dias com 80 bovinos de corte em fase de terminação, peso inicial médio de 507 kg e divididos em grupos com suplementação de 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% de taurina na dieta. A performance foi avaliada pelas pesagens e controle do alimento ingerido diariamente, características da carcaça foram avaliadas após o abate dos animais com dados fornecidos pelo frigorífico e as alterações metabólicas foram mensuradas pelos valores plasmáticos de glicose, lactato, taurina, triglicerídeos. Imediatamente após o abate foi coletado uma porção do músculo *Sternocephalicus ventrally* para análise do potencial glicolítico. Para complementar os dados do segundo ensaio *in vivo*, foi realizado um ensaio *in vitro* utilizando culturas de fluido ruminal. As medições incluíram concentrações de AGV, pH, DIVMS e produção de gás fermentativo para culturas contendo 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% de taurina no substrato. A suplementação de taurina não afetou as características finais de peso, PCQ, CMS, parâmetros de carcaça, os metabólitos sanguíneos, produção de gases, DIVMS e AGV não foram afetados pela administração de taurina. Uma resposta linear foi detectada para o pH ( $P = 0,006$ ), com bovinos consumindo 0,1% de taurina tiveram o pH mais baixo. O ganho compensatório apresentado pelos animais que passaram por restrição de leite, mas não acelerou o desenvolvimento intestinal e ruminal, enquanto que a suplementação de mananoligossacarídeos provocou acelerado crescimento das papilas ruminais e das vilosidades do jejuno. O manano-frutoligossacarídeo não modificou os parâmetros avaliados. A suplementação de taurina não provocou alteração na fase de terminação de bovinos, entretanto, provocou queda no PH ruminal.

**Palavras-chave:** crescimento, confinamento, ganho compensatório, manejo, suplementação.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the physiological, biochemical and metabolic effects of milk restriction and prebiotic supplementation in suckling calves, and the same effects of supplementation of taurine in the bovine termination phase. Two experiments were executed to achieve the mentioned objectives. In the first trial it was used 20 crossbred calves with approximate initial weight of 38 kg and housed in individual pens for 56 days divided into two periods of 28 days each. The animals were allocated in four experimental groups: animals receiving 6 L of milk in periods 1 and 2 (CON), animals with 50% milk restriction in the first period and re-alimented in the second period (RES), animals without restriction and supplemented of 5 g/day of mannanoligosaccharide (MOS) or mannan- frutoligosaccharide (MFOS). The weight gain and feed intake were verified. Serum was used to determinate glucose, lactate, creatinine, alkaline phosphatase, triglycerides, urea, total protein and the hormones ghrelin and leptin. In the brain, in the paraventricular region of the hypothalamus, ghrelin receptor expression (GHS-R1a) was evaluated. The rumen and small intestine were used to evaluate the development of the gastrointestinal tract: rumen papilla length, villus height and intestinal crypt depth. We observed a lower weight gain of the restricted group in the first period and no difference in the weight gain among groups in the second period. It was observed that animals from the prebiotic supplemented (MOS) group showed a significant increase in jejunal villus height. Ruminal development was favored by the supplementation of mannanoligosaccharides (MOS group), which significantly increased ruminal papillae length. No difference was found for serum concentration of ghrelin and leptin among treatments in periods 1 and 2 ( $P > 0.05$ ). Regarding the expression of ghrelin receptors in the paraventricular region of the hypothalamus, there was no difference between the groups evaluated. The second experiment was performed in 123 days with 80 finishing steers, mean initial weight of 507 kg and divided into groups supplemented with: 0; 0.025; 0.05; 0.075 and 0.1% taurine in the diet. Changes in performance were evaluated by weighing and control of the daily feed intake, carcass traits were evaluated after animals slaughter with data provided by the slaughter house, and the metabolic changes were measured by plasma glucose, lactate, taurine and triglycerides values. Immediately after slaughter, a sample of *Sternocephalicus ventralis* muscle was collected to analyze the glycolytic potential. To complement the data from the second in vivo assay, an in vitro assay was performed using ruminal fluid cultures. Measurements included concentrations of VFA, pH, IVDMD and fermentative gas production for cultures containing 0; 0.025; 0.05; 0.075 and 0.1% taurine on the substrate. Supplementation of taurine did not affect the final characteristics of weight, HCW, DMI and carcass traits. Blood metabolites were not affected by administration of taurine. In addition, the production of in vitro gases, the concentrations of IVDMD and VFA's were not affected by the addition of taurine. A linear response was detected for pH ( $P = 0.006$ ) and with cattle consuming 0.1% taurine had the lowest pH. The compensatory gain presented by the restricted milk animals, but did not accelerate the intestinal and ruminal development, while the supplementation of mannanoligosaccharides caused an accelerated growth of the ruminal papillae and villi of the jejunum. Mannan-frutoligosaccharide supplementation did not accelerate the development of suckling calves. Taurine supplementation did not cause any change in the finishing phase of cattle, however, it caused a decrease in rumen pH.

**Key words:** growth, feedlot, compensatory gain, management, supplementation.

## APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi realizado ao longo dos últimos quatro anos, durante o curso de doutorado que teve início no ano de 2015. A motivação foi a oportunidade de aprofundar os conhecimentos nas estratégias alimentares para acelerar a produção de bovinos em diferentes fases de criação. Assim, foi proposto avaliar os efeitos de duas estratégias alimentares e verificar o efeito no desenvolvimento de bezerros em fase de aleitamento, além disso, durante o doutorado sanduíche foi sugerido analisar os efeitos da suplementação do amino ácido taurina na fase de terminação de bovinos. No primeiro experimento, partiu-se da hipótese de que a restrição de leite ou a suplementação de prebióticos podem causar alterações no metabolismo, alterações no desenvolvimento do rúmen e no intestino delgado, perfil hormonal e expressão de receptores no hipotálamo. No segundo experimento, foi proposto que a suplementação de taurina poderia modificar a performance, características de carcaça, metabólitos sanguíneos e fermentação ruminal de bovinos em fase de terminação em sistema de confinamento.

Esta tese está estruturada em cinco capítulos. O capítulo I abrange a natureza e a importância do tema, destacando a fundamentação teórica dos diferentes tópicos, com base na literatura. No capítulo II estão apresentados os objetivos da tese. Os capítulos III e IV foram elaborados no formato de artigo científico, apresentando cada um deles os itens introdução, material e métodos, resultados e discussão. Por fim, o capítulo V é um resumo dos principais resultados dos dois experimentos e uma conclusão geral sobre os assuntos abordados nessa tese.

### REVISÃO DA LITERATURA

#### I.1 Fase de aleitamento e o desenvolvimento do trato gastrointestinal de bovinos

O trato gastrointestinal (TGI) e seus órgãos acessórios têm como funções primárias a digestão e a absorção de nutrientes essenciais para os processos metabólicos, sendo que, o consumo alimentar e a habilidade de digerir os alimentos podem ser influenciados pela raça, estágio de maturidade e a dieta fornecida aos animais (Klein et al., 1987; Peron et al., 1993). Diferentes mecanismos fisiológicos são responsáveis pelo crescimento e diferenciação do trato gastrointestinal, tais como, os processos bioquímicos associados com o tipo de alimento nos compartimentos digestivos e as alterações hormonais relacionadas ao crescimento e atividade orexígena, entre eles, a grelina, a leptina e o hormônio de crescimento (GH) (Arellanes-Licea e Díaz-Muñoz, 2012).

Essas diferenças na capacidade de processar o alimento digerido podem estar relacionadas às características anatômicas do TGI, como por exemplo, o tamanho relativo dos órgãos do trato digestivo com o desenvolvimento dos animais (Guilloteau et al., 2009; Gerbert et al., 2017). Ao longo do crescimento dos bovinos o TGI aumenta 3,3% da sua proporção em relação ao peso corporal e os órgãos responsáveis por esse aumento durante as primeiras semanas de vida são o intestino delgado e os estômagos (Figura 1) (Guilloteau et al., 2009; Flaga et al., 2011). As proporções ao nascimento para rúmen, omaso e abomaso são, respectivamente, 38%, 13% e 49% e avançam para 67%, 18% e 15% no animal adulto (Otterby e Lin, 1981).

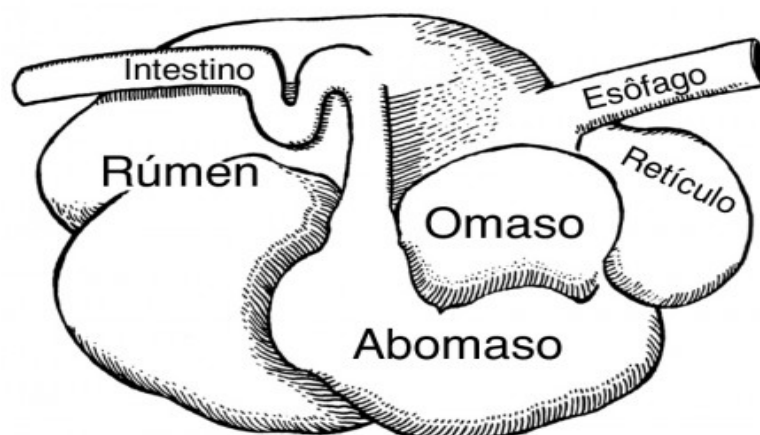


Figura 1. Ilustração dos estômagos de bovinos adultos.

Fonte: Pearson Scott Foresman - modificada (2018). Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AAbomasum\\_\(PSF\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AAbomasum_(PSF).png)

Cada compartimento gástrico desempenha um processo fisiológico específico e o desenvolvimento dos pré-estômagos divide o crescimento dos bezerras em três fases: não

ruminante (até três semanas de idade), fase de transição (três a oito semanas de idade) e ruminante adulto (a partir de oito semanas de idade) (Heinrichs, 2005). A transição dos bezerros à condição de ruminante funcional está associada ao consumo de alimentos sólidos e a produção de ácidos graxos voláteis (AGV's), especialmente os ácidos butírico e propiônico (Baldwin et al., 2004).

Nos primeiros dias de vida o leite é a principal fonte de nutrientes e, ao mesmo tempo, o abomaso é a porção do estômago com maior funcionalidade (Jasper e Weark, 2002). O leite oferecido aos bezerros permite a formação da goteira esofágica favorecendo a sua digestão no abomaso e intestino delgado. A goteira esofágica forma-se à partir da união dos lábios do sulco rúmimo-reticular, por reflexo condicionado mediado pelos nervos sensoriais glossofaríngeos e nervo vago de ação motora (Blowey, 1996). Compõe-se assim um verdadeiro canal tubular no qual o líquido é conduzido diretamente ao abomaso sem passagem pelo rúmen (Figura 2).



Figura 2. Goteira esofágica em bezerros.  
Fonte: Disponível em: <http://vetufv.blogspot.com>

Na fase de mudança (três a oito semanas de idade), a ingestão de alimentos sólidos, principalmente concentrados e volumosos fermentáveis no rúmen, induz o desenvolvimento dos estratos epiteliais e a queratinização da mucosa ruminal (Godfrey, 1961; Anderson et al., 1987). Os estudos realizados por Zitnan et al. (2005), comprovaram aumento no tamanho das papilas ruminais de bezerros em aleitamento que receberam alimentos sólidos com maior proporção de propionato na dieta. Por outro lado, quando os bezerros são alimentados somente com leite no primeiro mês de vida, apresentam limitado desenvolvimento do rúmen com relação ao peso,

capacidade, crescimento das papilas, grau de queratinização, pigmentação e desenvolvimento da musculatura ruminal (Baldwin et al., 2004).

Para animais ruminantes, as papilas são responsáveis pelo movimento da digesta e aumento da área absorptiva, pois a maior parte da absorção de ácidos graxos voláteis (AGV's) e outros metabólicos ocorre em nível de papilas ruminais (Harrison et al., 1960). 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). Este processo pode ser acelerado com a ingestão de alimentos sólidos, menor quantidade de alimentos líquidos na dieta e produção de AGV's, como relatado anteriormente.

Embora as maiores alterações durante o crescimento de bezerros estejam relacionadas ao rúmen, o desenvolvimento do intestino 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 (Bühler et al., 1998; Sauter et al., 2004). Assim, como em outras espécies, o intestino dos bovinos é dividido em delgado e grosso. 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 vilos. 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.

Nas primeiras 48 horas de vida dos bezerros essa mucosa é altamente permeável à entrada de macromoléculas para facilitar a absorção de imunoglobulinas (IGs) advindas do colostro (Baintner, 2002). Outra característica exclusiva da fase de pré-ruminante é a presença de enterócitos com grandes vacúolos para garantir o armazenamento das IGs e, segundo a teoria da substituição celular de Trahair e Robinson (1986), entre 5 e 7 dias de vida os enterócitos jovens são substituídas por enterócitos com pequenas vesículas.

Posto isto, durante os primeiros meses de vida o bezerro tem que lidar com adaptações fisiológicas e digestivas para iniciar a vida extra-uterina, para manter o estágio pré-fermentativo durante um longo período e suportar o desmame (Guilloteau et al., 2009). Entretanto, muitas vezes os animais não se adaptam a todas essas transformações e modificações na sua fisiologia digestiva (Lalles et al., 2007). Nestes casos, a suplementação de substâncias que agem como fatores de crescimento ou aplicação de estratégias alimentares para ajudar a superar esses períodos e melhorar a maturidade e digestibilidade do TGI, vem sendo cada vez mais utilizadas (Gorka et al., 2008).

## I.2 Prebióticos

Sabe-se que determinados tipos de alimentos, conhecidos como funcionais, promovem efeitos benéficos sobre a saúde de humanos e animais. Estes alimentos contribuem com a nutrição e contêm substâncias que podem ser consideradas biologicamente ativas e produtoras de benefícios clínicos ou de saúde (Komatsu et al., 2008).

Os maiores impulsionadores da indústria de aditivos usados na nutrição animal são o interesse na fisiologia do intestino, sua atividade no ecossistema microbiano e, principalmente, a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento pelos países importadores de produtos cárneos (Souza et al., 2010; Arvanitoyannis et al., 2005; Roberfroid, 2005). Quando usados em doses subclínicas os antibióticos são capazes de selecionar os microorganismos benéficos do trato gastrointestinal e melhorar o desempenho dos animais (Souza et al., 2010). Por outro lado, existe uma preocupação crescente com o uso intensivo de antimicrobianos pela possibilidade de deixarem resíduos em produtos de origem animal e causarem resistência cruzada (Leite et al., 2012).

Os prebióticos são aditivos alimentares não digestíveis, que promovem crescimento de microorganismos intestinais, que afetam benéficamente o hospedeiro (Samanta et al., 2012). Especificamente, os prebióticos são carboidratos subdivididos em categorias como os oligossacarídeos, polissacarídeos ou trissacarídeos e podem ser obtidos de plantas ou leveduras. Algumas características desejáveis de um prebiótico foram descritas por Gibson & Roberfroid (1995), entre elas, não ser metabolizado ou absorvido durante a passagem pelo trato digestivo superior; atuar como substrato para as bactérias intestinais benéficas, que serão estimuladas a crescer e/ou tornar-se metabolicamente ativas; possuir capacidade de alterar a microbiota intestinal de forma favorável ao hospedeiro e induzir efeitos benéficos sistêmicos ou apenas no intestino do hospedeiro.

Ao chegar ao intestino delgado os prebióticos são utilizados como substrato por grupos específicos de bactérias classificadas como benéficas, tais como, a família dos lactobacilos e das bifidobactérias (Samanta et al., 2012). Esses microorganismos fazem parte de um complexo ecossistema microbial composto por uma minoria, cerca de 10%, de bactérias patogênicas (Berg, 1996) e a manutenção deste equilíbrio intenta evitar o aparecimento de doenças agudas ou crônicas que podem comprometer o desempenho do animal (Cummings e Macfarlane, 2002).

O resultado final da fermentação dos prebióticos é a produção de AGV's, sendo eles, o acetato, butirato e propionato (Samanta et al., 2012). Esses AGV's são utilizados como energia pelas células intestinais, garantindo um melhor desenvolvimento e renovação celular (Figura 3) (Kleessen et al., 2001). Barcelo et al. (2000), testaram os efeitos da suplementação de prebióticos e mostraram que a suplementação deste aditivo aumentou a produção de acetato e butirato no

intestino e estimulou a produção de mucina no cólon isolado de ratos, acarretando em camada de proteção mais eficiente contra microorganismos nocivos. Entretanto, em experimentos como o realizado por Heinrichs et al. (2009), a suplementação de oligossacarídeos não beneficiou o desempenho de bezerros em fase de aleitamento, havendo apenas uma tendência no aumento de bactérias benéficas e de imunoglobulinas fecais, o que sugere melhora na saúde intestinal.

Os ácidos graxos voláteis também possuem a capacidade de se ligar aos receptores acoplados à proteína G (Gpr41 e Gpr43), expressos pelas células do epitélio intestinal produtoras do peptídeo YY (PYY) (Tazoe et al., 2008). Este hormônio age inibindo a secreção gástrica, esvaziamento gástrico, contração da vesícula biliar e reduz o tempo de trânsito gastrointestinal. Sendo assim, ao serem ativados, esses receptores aumentam a produção de PYY que favorece a redução da motilidade intestinal e propicia maior absorção de nutrientes do lúmen intestinal, em especial dos ácidos graxos voláteis (Cani et al., 2009).

O aumento da produção de PYY também estimula as funções hormonais no sistema nervoso central (SNC), inibindo neurônios orexígenos do núcleo arqueado, induzindo saciedade. Nesse contexto, estudos realizados com prebióticos indicaram que a maior produção intestinal de ácidos graxos voláteis, está associada ao aumento da saciedade e conseqüente redução da ingestão alimentar (Delzene et al., 2007). Em parte, tais efeitos relacionam-se ao aumento dos *glucagon-like peptide* (GLP-1 e GLP-2) e PYY, que, em conjunto com redução da grelina, ocasionam efeitos hipotalâmicos relacionados ao mecanismo de recompensa. Cani et al. (2004) comprovaram a redução da grelina circulante em ratos após três semanas de tratamento com diferentes tipos de prebióticos. Neste experimento, o sangue foi coletado após oito horas de privação de alimento e as modificações foram provocadas pela ingestão de frutanos.

Além das funções citadas, os prebióticos têm a capacidade de selecionar bactérias produtoras de ácido butírico e estimular o desenvolvimento das células de Goblet, que são responsáveis pela produção de muco. Este estímulo, aumenta a produção e armazenamento de muco e, conseqüentemente, aumenta a barreira de defesa no tecido intestinal, pois o muco previne a fixação e translocação de bactérias através do epitélio (Samanta et al., 2012).

A proteção do epitélio intestinal pode ser expandida pela capacidade dos prebióticos de atuar como substrato para microorganismos da família dos lactobacilos e, como resultado dessa seleção, aumentar a produção de ácido láctico e baixar o pH luminal. A queda no pH altera a fisiologia das colônias e pode inibir o crescimento e a atividade de bactérias patogênicas e reduzir várias atividades enzimáticas bacterianas prejudiciais ao epitélio (Kleessen et al., 2001) (Figura 3).

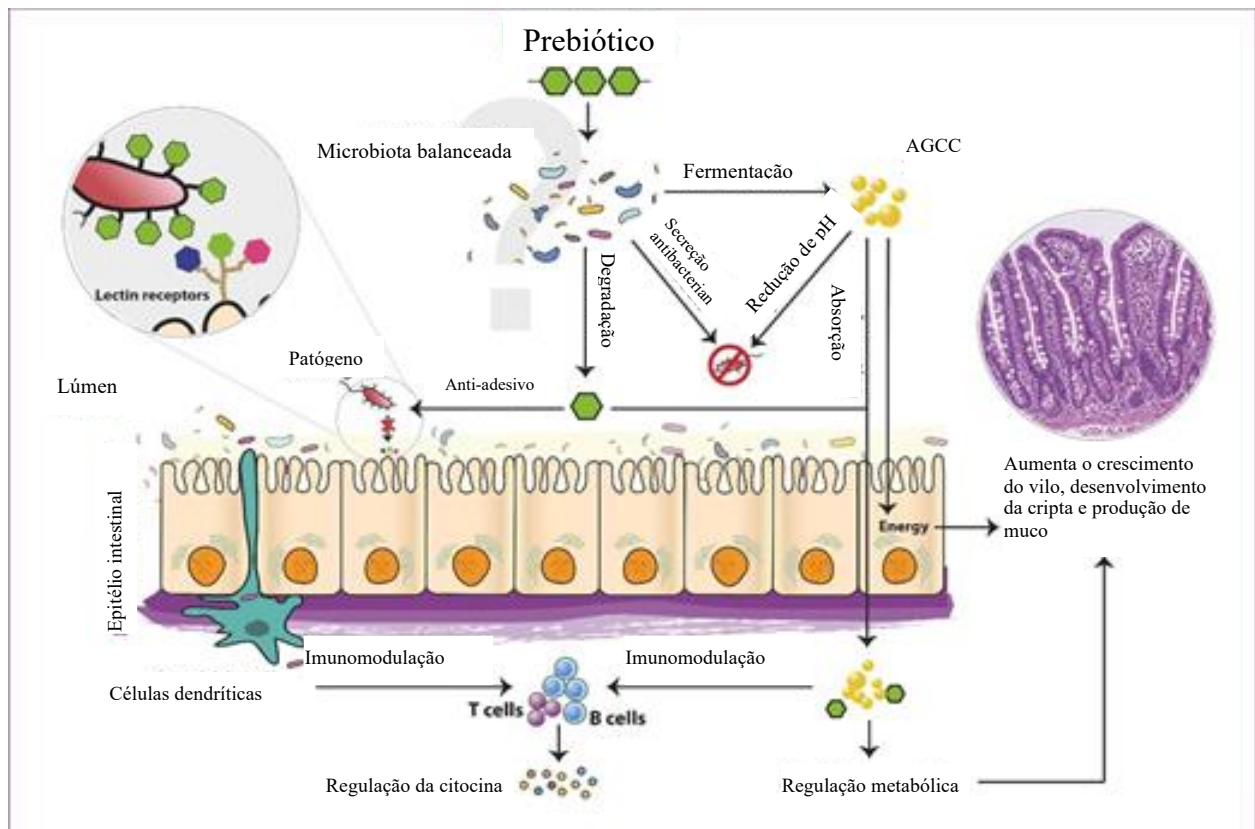


Figura 3. Mecanismo de ação dos prebióticos. A microbiota intestinal pode fermentar prebióticos em AGV's, principalmente acetato, propionato e butirato. Os AGV's diminuem o pH luminal, fornecem fontes de energia para as células epiteliais e têm efeitos profundos nos moduladores da inflamação e nas regulações metabólicas. Uma comunidade bacteriana bem equilibrada também pode melhorar a estrutura da mucosa intestinal. Algumas cepas bacterianas produzem fatores antimicrobianos ou estimulam o sistema imunológico sinalizando células dendríticas. Oligossacarídeos e monossacarídeos podem reduzir a colonização do patógeno, bloqueando os sítios receptores usados pelos patógenos para a ligação à superfície da célula epitelial.

Fonte: adaptado de Pourabedin & Zhao (2015).

Inúmeros são os oligossacarídeos que são utilizados na nutrição animal como prebióticos, com intuito de garantir a saúde intestinal e melhorar o desenvolvimento do animal. Os representantes mais comuns deste grupo são os manano e frutoligossacarídeos (Samanta et al, 2012).

Os mananoligossacarídeos (Mos) são representantes do grupo dos oligossacarídeos derivados da parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, abundantemente encontradas na natureza em frutas cítricas, cereais e vegetais. A parede celular das leveduras é formada por glucanos e mananos em proporções similares, 80 a 85%, enquanto a quitina está presente em pequena quantidade, aproximadamente 1% (Kollar et al., 1992). No processo de obtenção do Mos, de acordo com Spring et al. (2000), as leveduras são fermentadas em uma mistura complexa de açúcares, a parede celular é separada do conteúdo intracelular e o líquido contendo Mos é evaporado à baixa temperatura (*spray dry*) para evitar a destruição da sua parte funcional.

Segundo Franklin et al. (2005), os mananoligossacarídeos melhoram o desempenho, a função imunológica e inibe a colonização do trato digestivo por microrganismos indesejáveis em algumas espécies animais. Um estudo realizado por este mesmo grupo de pesquisadores

demonstrou que a suplementação de vacas com mananoligossacarídeos pode aumentar a função imune e proporcionar melhor transferência de imunidade passiva para seus descendentes, diminuindo a mortalidade dos bezerros e os gastos com medicamentos.

Os Mos têm a capacidade de se ligar à superfície celular de algumas cepas de bactérias, impedindo que as bactérias prejudiciais colonizem o trato intestinal, interferindo na ligação de resíduos de carboidratos na superfície da célula epitelial e garantindo a saúde luminal (Spring et al., 2000). Em estudo realizado por Gosh e Mehla (2012) com 36 bezerros em fase de aleitamento, o qual os animais eram alimentados com feno e concentrado inicial proporcionais ao peso corporal, e suplementados com 4 g de MOS/dia misturados no substituto do leite antes do fornecimento. Nesse experimento, a suplementação de prebiótico aumentou ganho de peso no grupo de bezerros do grupo tratado e promoveu menor custo/Kg de ganho de peso o que refletiu em melhora no crescimento e performance.

Em contrapartida, alguns experimentos que avaliaram a performance de bezerros ou bovinos em fase de crescimento não corroboram com resultados benéficos mostrados anteriormente (Donovan et al., 2002; Heinrichs et al., 2003; Morrison et al., 2010). Kara et al., (2015), investigaram os efeitos do Mos na performance, na frequência e severidade de diarreia em 20 animais. Neste experimento, os bezerros foram alimentados com leite e no grupo tratado foi adicionado 7 g/dia de Mos por um período de 51 dias. A suplementação de mananoligossacarídeos não afetou a performance e a incidência de diarreia, entretanto houve um acréscimo de 3,7% no peso final dos animais do grupo tratado.

Outras consequências da suplementação do Mos citadas por Parnell e Reimer (2011), são as alterações provocadas na secreção do hormônio da saciedade, esvaziamento gástrico retardado e o aumento do gasto energético. O mecanismo responsável por esse efeito é a redução na liberação da grelina pelas células endócrinas presentes na mucosa intestinal em resposta a estímulos de nutrientes (Cani et al., 2009).

Outro grupo representante dos oligossacarídeos que pode ser utilizado como aditivo para animais são os frutoligossacarídeos (FOS), como foi citado anteriormente. Na sua maioria, os FOS são derivados de fibras solúveis que podem ser obtidas pela hidrólise parcial da inulina (Gibson et al., 1994). Este carboidrato é conhecido por fornecer energia para plantas e é frequentemente originado das raízes da chicória, beterraba, banana, alho, cebola, trigo e tomate (Spiegel et al., 1994). Os FOS conseguem percorrer o TGI sem que sofram digestão e atingir seu local de ação seja no intestino delgado, isto é possível pois apresentam várias ligações  $\beta$ -(1,2) e  $\beta$ -(1,6) entre os monômeros de frutose e estas ligações não são hidrolisadas por enzimas endógenas (Xu et al., 2000).

Ao chegarem ao intestino na sua forma íntegra os FOS agem como substrato para microbiota intestinal benéfica e favorecem o crescimento de bactérias como os lactobacilos e as

bifidobactérias provocando modificações no ambiente luminal (Tsukahara et al., 2003). O lúmen se torna mais competitivo por substrato devido a rápida proliferação de bactérias favoráveis e, ao mesmo tempo, mais ácido devido a maior concentração de ácido láctico, tornando-o impróprio para o desenvolvimento de bactérias nocivas (Samanta et al., 2012). Além disso, as células epiteliais são estimuladas pela maior quantidade de AGV's garantindo maior proliferação e renovação celular (Gorka et al., 2009; 2011).

Em humanos, resultados de estudos comprovam que o equilíbrio produzido na flora gastrointestinal pelo consumo de FOS estimula outros benefícios no metabolismo, tais como, a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, alteração do metabolismo de ácidos gástricos, redução da absorção de carboidratos e lipídeos e a melhoria do metabolismo em diabéticos (Yamashita et al., 1984, Spiegel et al., 1994).

Em outras espécies, como os bovinos, os efeitos desses aditivos foram testados por Grand et al. (2011) que incluíram FOS em duas dosagens de 3 e 6 g no substituto do leite de 112 bezerros com idade média de 10 dias e relataram que o prebiótico é capaz de reduzir a conversão alimentar de maneira dose dependente. Houve também um aumento da produção de ácido butírico o que refletiu no aumento do peso de carcaça dos animais tratados.

Entretanto, alguns resultados não corroboram com a melhor performance de animais suplementados com FOS, como por exemplo o estudo realizado por Kalfhold et al. (2000). Neste experimento, os 14 bezerros destinados a produção de vitelo foram separados em grupo controle e animais suplementados com 10 g/dia de FOS por um período de três semanas e obtiveram o mesmo desempenho e perfil metabólico do grupo sem suplementação. Esta contradição de resultados, assim como acontece na suplementação de Mos, pode ser explicada na maioria dos estudos pela ausência de desafio sanitário ou presença de alguma enfermidade o que faz com que as potenciais vantagens de saúde e desempenho encontradas por outros autores sejam de difícil detecção (Kara et al., 2015).

### I.3 Restrição alimentar e ganho compensatório

O ganho compensatório de acordo com Muller e Teixeira Primo (1986), consiste no ganho de peso mais rápido no período de realimentação após os animais serem submetidos a um período de restrição alimentar, que é capaz de deprimir o crescimento. Sabendo disto, a maioria dos experimentos nesta área são divididos em duas fases. 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).

Um dos principais objetivos de instalar um programa de nutrição que inclua a restrição alimentar é a possibilidade de reduzir o custo com alimentação. A nutrição representa até 70% do total investido nos sistemas de criação e a possibilidade de reduzir a exigência de alimentos e, por consequência, reduzir a taxa de metabolismo basal pode acarretar em economia na cadeia produtiva (O'Donovan, 1984).

A adaptação metabólica provocada pela restrição alimentar resulta em menor peso dos animais, devido à menor exigência na energia de manutenção, com posterior ganho compensatório no período de realimentação (Leeson e Zubair, 1997). Estudos anteriores já comprovaram que animais submetidos à restrição alimentar apresentam uma recuperação rápida após perda elevada de peso em um período curto (Ryan, 1990; Nicol e Kitessa, 1995).

Kumar et al. (2015), examinaram o efeito da restrição alimentar no metabolismo, excreção de nutrientes e performance de 15 caprinos com média de um ano de idade. Os animais foram distribuídos em três grupos: controle (C), restrição de 12,5 (RF-I) e 25% (RF-II) do total de alimento oferecido aos animais do grupo C. Não houve diferença no peso final dos animais após 60 dias de experimento, porém, ao analisarem o ganho de peso neste período o tratamento com restrição de 12,5% obteve os melhores resultados. Os autores associaram esses dados com a melhora da digestibilidade e o aumento da eficiência na utilização dos nutrientes por RF-I.

Para comprovar os efeitos da restrição alimentar em bezerros Schaff et al. (2016) submeteram 14 animais a uma dieta restrita 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.

Outro estudo que corrobora com os resultados positivos do uso da restrição alimentar foi realizado por Helal et al. (2011). Dessa vez, os animais utilizados foram 21 búfalos submetidos à três grupos experimentais: controle (grupo C), restrição de 70% (grupo A) e 85% (grupo B) do concentrado fornecido ao grupo controle. Não foram encontradas diferença entre os grupos para os parâmetros peso final e ganho de peso, enquanto que os animais do grupo A foram mais eficientes economicamente por terem consumido a menor quantidade média diária de alimento, com base na matéria seca, quando comparada aos outros grupos.

Sugeta et al. (2002), avaliaram o efeito da restrição alimentar no ganho compensatório e qualidade da carcaça de frangos de corte Ross. Neste experimento, o grupo controle recebeu ração na forma *ad libitum* nos 42 dias do ciclo produtivo, os grupos tratados tiveram restrição alimentar de 30 e 70% do consumo diário do grupo controle entre o 8º e o 14º dias e foram realimentados

*ad libitum* até os 42 dias. A restrição de 70% ocasionou efeitos negativos na performance e qualidade de carcaça dos animais, enquanto que o grupo submetido à restrição de 30% conseguiu os mesmos resultados do grupo controle em todos os parâmetros avaliados, isto porque, apresentaram crescimento acelerado no período de realimentação.

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. Para os pesquisadores Ryan (1990) e Alves (2003) os principais elementos que controlam os resultados são a idade dos animais, a severidade e a duração da restrição alimentar.

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). Dados de 74 experimentos desenvolvidos por Berge (1991) demonstraram que bovinos abaixo de seis meses de idade submetidos à restrição alimentar demoraram em média 16 meses para compensar o desenvolvimento e, ao mesmo tempo, animais mais velhos precisaram de quatro a sete meses para se igualar ao grupo não restrito.

No que se trata da severidade da restrição, no sistema de criação convencional de bezerros os animais recebem uma quantidade de leite considerada restrita, de aproximadamente quatro L leite/dia (10% do peso corporal), como mostra o NRC (2001), e esta restrição vista como moderada pode causar prejuízos ao desenvolvimento dos animais. O menor ganho de peso está associado à quantidade mínima de leite que o bezerro necessita para o atendimento de sua exigência de manutenção que pode variar de dois a três L/dia. Sendo assim, o fornecido de quatro L/dia atenderia apenas as necessidades de manutenção e esse valor pode ser usado como referência para o período de restrição. Enquanto 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 (Soberon et al., 2012).

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 tireóide 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 a concentração de GH tende a aumentar e na fase de ganho compensatório diminuir (Cassady et al., 2009; Choi et al., 1997). Desta forma, o status nutricional e o consumo de alimentos influenciam marcadamente a secreção deste hormônio. Forsyth (1996), afirmou que o aumento do GH no período de restrição reflete a tentativa do animal em mobilizar as reservas de tecido adiposo e assim diminuir o efeito do balanço energético

negativo. Anteriormente, Thomas et al. (1991), sugeriram que a restrição de alimentos causa mudança na secreção dos inibidores e liberadores do GH no hipotálamo, aumentando o seu nível sanguíneo.

Associado ao aumento nos níveis do GH na fase de restrição ocorre a redução nos níveis de fator de crescimento semelhante a insulina (IGFs) no soro, que pode ser causada por redução dos efeitos anabólicos do hormônio do crescimento (Ketelslegers et al. 1995). Nesta ocasião, há síntese diminuída de tireoglobulina que é um complexo glicoprotéico fundamental para síntese de hormônios tireoideanos (T3 e T4) (Nunes, 2003; Gerrits et al., 1998).

A menor concentração dos hormônios tireoideanos media a redução da taxa de metabolismo durante a restrição alimentar, enquanto que os níveis de GH, insulina e IGF's na re-alimentação podem estar contribuindo para o efeito de crescimento compensatório, permitindo que maiores quantidades de alimento ingerido sejam divididas em direção ao crescimento do tecido, ao contrário das necessidades de energia de manutenção (Hornick et al., 2000; Choi et al., 1997).

#### I.4 Grelina

A grelina é um hormônio polipeptídico composto por 28 aminoácidos, originalmente descoberta por Kojima e seus colaboradores no ano de 1999 em pesquisa para um secretagogo endógeno do hormônio de crescimento (Kojima et al., 1999; Hosoda et al., 2000). A grelina circulante encontra-se na forma acilada e não acilada, sendo que, cerca de 80% da grelina total circulante encontra-se na forma não acilada. Este processo de acilação ocorre no aminoácido serina 3 no retículo endoplasmático e é catalisado pela enzima *O*-acyltransferase (GOAT) (Yang et al., 2008). Alguns fatores podem alterar a expressão e atividade da enzima GOAT, como por exemplo, disponibilidade de nutrientes, principalmente os ácidos graxos (Kojima et al., 2004). A acilação é necessária para que a grelina seja capaz de atravessar a barreira hemato encefálica (BHE) e ligar-se ao seu receptor (Korbonits et al., 2004).

As células produtoras de grelina se concentram, na sua maioria, na região do corpo do estômago de monogástricos e no abomaso e rúmen de ruminantes (Date et al., 2000; Gottero et al., 2004). No entanto, também foram encontradas células imunorreativas no intestino delgado, cólon e pâncreas (Kojima e Kangawa, 2005).

Foram descobertos dois tipos de receptores de grelina – GHS-R1a e GHS-R1b, entretanto somente o receptor GHS-R1a é descrito como funcional (Kojima et al., 2004). O receptor GHS-R1a é uma proteína G com sete domínios na membrana e está mais abundantemente expresso nas células do hipotálamo, na região que medeia a ingestão de alimento, homeostase energética e níveis de glicose sanguínea (Hosoda et al., 2000). Outras regiões como o pâncreas, trato

gastrointestinal e coração podem conter uma menor quantidade de receptores GHS-R1a (Kojima e Kangawa, 2005).

Acredita-se que a secreção de grelina ocorre de forma pulsátil ao longo dia e é regulada segundo a concentração das suas formas circulantes e segundo o ciclo circadiano (Hosoda et al., 2000). Esta secreção está aumentada em condições de balanço energético negativo, por exemplo, durante jejum prolongado e em estados de hipoglicemia, e têm sua concentração diminuída após a refeição ou administração intravenosa de glicose (Jurimae et al., 2003; La Cava e Matarese, 2004). Outras pesquisas envolvendo liberação desse hormônio, em humanos, mostram que são os tipos de nutrientes contidos na refeição, e não o seu volume, que são os responsáveis pelo aumento ou decréscimo pós-prandial dos níveis plasmáticos de grelina (Crispim et al., 2007; Kojima e Kangawa, 2005). Em novilhos, Wertz-Lutz et al. (2010a) demonstraram que composição e a quantidade de matéria seca ingerida não influenciou as concentrações de grelina enquanto o balanço energético positivo foi mantido.

Por algum tempo, acreditou-se que a expansão do estômago também fosse um fator limitante da liberação de grelina. Contudo, Tschop et al. (2000), mostraram que ao preencher 50% do estômago de ratos com água, para causar expansão, não houve variação do nível de grelina sérico, enquanto que ao usar solução de glicose os níveis de grelina foram reduzidos. Isto sugere que fatores como o esvaziamento gástrico e absorção de nutrientes, especialmente glicose, são essenciais para causar a redução da grelina circulante (Williams et al., 2003).

Em casos de restrição alimentar ou calórica em que há a redução de disponibilidade de nutrientes circulantes a liberação da grelina se mantém elevada para prevenir a queda da glicose sanguínea (Figura 4). Este hormônio age na redução da secreção da insulina por ação direta ou indireta nas células pancreáticas  $\beta$  (Dezaki et al., 2007); aumento na secreção de glucagon por ações diretas ou indiretas em células pancreáticas  $\alpha$  (Sun et al., 2006); ações no cérebro para aumentar a secreção de glucagon e a ingestão de alimentos; estimula a liberação do GH que, no cenário apropriado, pode induzir a autofagia hepática e fornecer substratos para a gliconeogênese. O aumento do glucagon plasmático e as ações cerebrais da grelina também estimulam a gliconeogênese pela indução da expressão da enzima gliconeogênica hepática (Chuang et al., 2011).

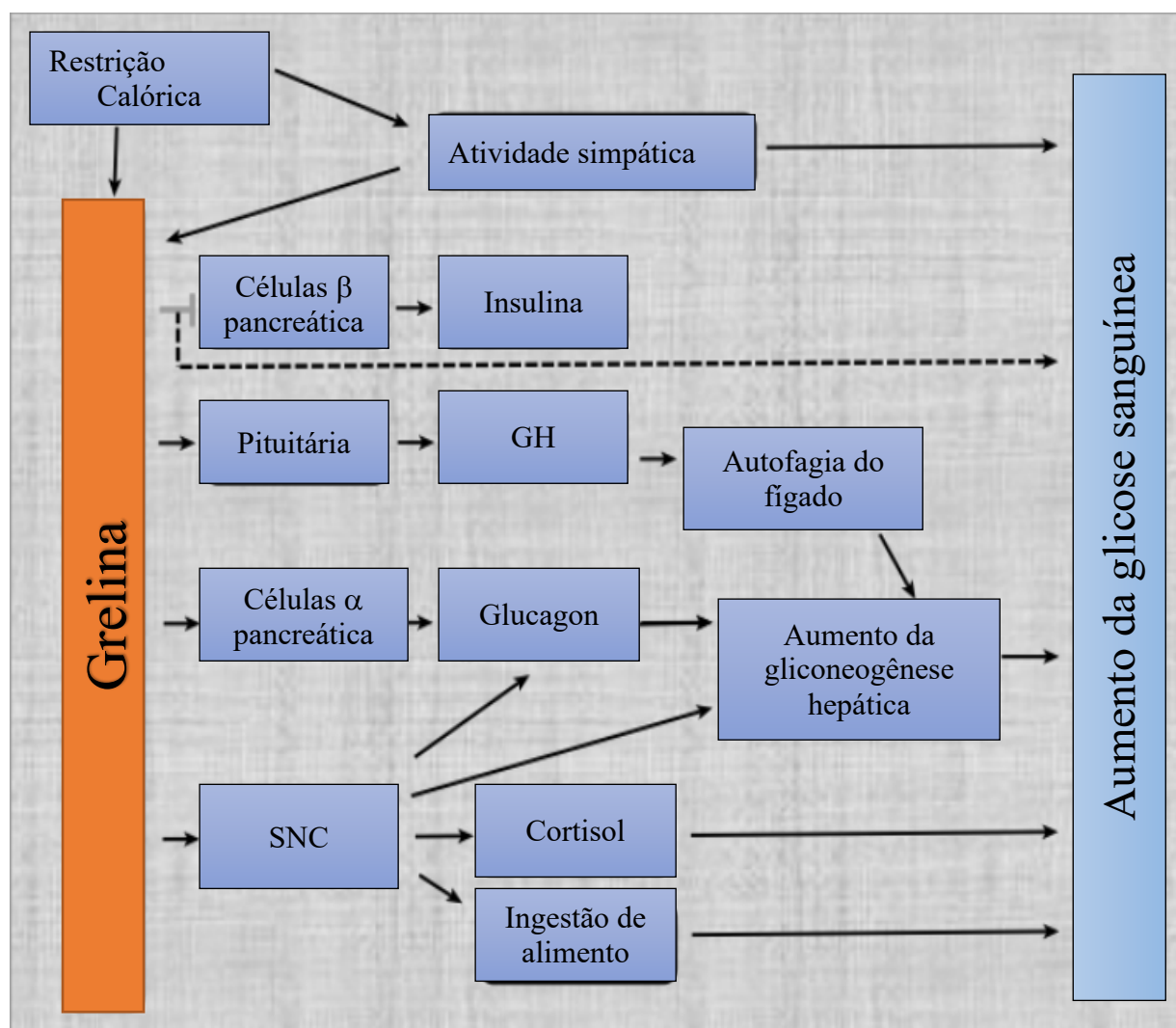


Figura 4. Mecanismos de ação da grelina na tentativa de manter os níveis séricos de glicose normais e evitar prolongada hipoglicemia.

Fonte: adaptado de Mani e Zigma (2017).

A grelina é um hormônio com múltiplas funções, conhecida por ser estimuladora da liberação de GH nas células somatotróficas da hipófise e do hipotálamo, sendo o ligante endógeno para o receptor secretagogo de GH (GHS-R) (Seoane et al., 2004). A maioria dos estudos que avaliaram a função da grelina na regulação da secreção de GH foram realizados visando à medicina humana, porém, é provável que esta função seja semelhante em animais.

Para avaliar as características da secreção de grelina em bovinos leiteiros e sua influência sobre o GH, Miura et al. (2004) utilizaram quatro vacas e três bezerros com média de 3 meses de idade. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 h) e as amostras de sangue para análise de grelina e GH foram coletadas das seis às 10 da manhã e das duas às seis da tarde com intervalos de 20 minutos. A concentração de grelina nas vacas apresentou queda após as refeições e sofreu efeito diurno, porém, não foi encontrada interação com os valores de GH. Nos bezerros, os resultados foram maiores para o hormônio GH e menores para grelina quando comparados com as vacas apesar de não ter havido ritmo diurno de excreção da grelina e nem significativa correlação com o GH sérico.

Os efeitos da grelina no balanço energético são, pelo menos em grande parte, mediados pelo hipotálamo (Nakazato et al., 2001; Lu et al., 2002). Korbonits et al. (2004) propuseram três vias diferentes para os efeitos indutores de apetite da grelina. Primeiro, após a liberação na corrente sanguínea pelo estômago, a grelina pode atravessar a BHE e se ligar a seus receptores no hipotálamo (Banks et al., 2002). Segundo, a grelina pode atingir o cérebro através do nervo vago e do núcleo do trato solitário (Ueno et al., 2005). Terceiro, a grelina é produzida localmente no hipotálamo, onde pode afetar diretamente os vários núcleos hipotalâmicos (Cowley et al., 2003).

O núcleo arqueado (ARC) apresenta duas subpopulações de neurônios orexígenos, os que produzem o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao gene Agouti (AgRP), e os que expressam pró-ópio-melanocortina (POMC) e transcritos relacionados à anfetamina e cocaína (CART), neurônios anorexígenos POMC/CART. A grelina exerce efeitos excitatórios sobre neurônios produtores de NPY/AgRP e sobre os neurônios do núcleo paraventricular e do hipotálamo lateral, estimulando o apetite. Este hormônio também atua sobre a via anorexígena, inibindo os neurônios POMC/CART e, assim, prevenindo a perda de apetite (Batterham et al., 2007; Geary, 2004).

A relação das concentrações plasmáticas de grelina com o consumo de ração e os hormônios indicativos do estado nutricional de bovinos foram avaliadas por Wertz-Lutz et al. (2014b). Nesse estudo, dois bovinos receberam dieta de terminação uma vez ao dia às 8 da manhã, enquanto que os dois animais do grupo restrito ficaram por 48 horas sem alimentação e, após esse período, houve restabelecimento da dieta. As amostras de sangue foram coletadas a partir das 22 horas de restrição com intervalos diferentes até o encerramento do período de 48 horas. Os animais que foram submetidos à restrição tiveram os níveis de grelina e GH aumentados em relação aos animais do grupo controle. Além disso, os animais que foram alimentados demonstraram oscilação na liberação da grelina, sendo esta mais elevada nos momentos que antecederam o fornecimento de alimento. Entretanto, nenhum efeito foi visto nos níveis de glicose para os dois grupos de animais.

Outro estudo com objetivo de determinar se as concentrações circulantes de grelina estavam relacionadas com a ingestão de matéria seca de animais em fase de terminação foi realizado por Foote et al. (2014). Foram utilizados 245 animais no experimento e durante os 84 dias de estudo os cochos eram vistoriados diariamente para ajustar a quantidade de ração que era oferecida aproximadamente às 8 horas da manhã. A coleta de sangue ocorreu 29 dias após o término das coletas de dados de performance e os resultados para grelina total ficaram com média 300 pg/mL. Houve correlação positiva para ingestão de matéria seca e níveis de grelina acilada e negativa para grelina total, glicose e lactato plasmático. Esses resultados sugerem que a grelina circulante pode ser usada como parâmetro para modelos de predição de consumo em bovinos em terminação.

Além das funções supracitadas, a grelina desempenha outras ações que abrangem o sistema cardiovascular, aumentando o débito cardíaco e diminuindo a pressão arterial (Nagaya et al., 2001), efeitos sobre a motilidade gástrica já são definidos como o aumento da secreção ácida, do esvaziamento gástrico e do *turnover* das células na mucosa (Masuda et al., 2000; Date et al., 2000; Yakabi et al., 2008). Trabalhos experimentais conseguiram demonstrar efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos da grelina mediante a modulação na secreção de citocinas, que atuam na cascata da inflamação, estimulando uma nova linha de pesquisa para tratamento de doenças autoimunes, respiratórias, hepáticas e inflamatórias intestinais (Otero et al., 2004; Moreno et al., 2008).

Como a grelina tem como efeitos principais a liberação do apetite e atividade de liberação do hormônio do crescimento, ela pode potencialmente moderar o efeito da anorexia em bezerros recém-nascidos, aumentar o ganho de peso corporal e potencialmente melhorar a resistência a desafios patológicos e ambientais no início da vida (Itoh et al., 2005). O peso corporal e a condição inicial de vida são os melhores preditores de desempenho produtivo e reprodutivo nas próximas fases da produção.

## I.5 Bovinos em fase de terminação

Em um ciclo de produção de bovinos a fase final é conhecida como fase de terminação e representa aproximadamente 16% da vida do animal. Neste período, o animal aumenta proporcionalmente a deposição de gordura enquanto que a deposição de proteína é menor (Owens et al., 1993). Os sistemas de gestão são moldados pelas variações no clima regional, disponibilidade de recursos naturais e cultura, e as estratégias mais utilizadas na terminação são: pastejo, confinamento convencional, confinamento no pasto e semi-confinamento (Itavo et al., 2007; Esterhuizen et al., 2008; Agastin et al., 2010).

O confinamento convencional tem como característica principal o fornecimento *ad libitum* de concentrado e volumoso diretamente no cocho. Enquanto que, o confinamento a pasto e o semi-confinamento o volumoso é oriundo da pastagem e se diferenciam pela quantidade de concentrado oferecido, *ad libitum* e quantidade controlada, respectivamente (Silva et al., 2009; Koscheck et al., 2010).

O sistema de terminação adotado tende a influenciar a qualidade da carne bovina. Estudos anteriores têm mostrado que os animais na fase final em sistema de pastejo possuem carne geralmente mais magra (menor teor de gordura intramuscular) e com diferentes características de cor quando comparada a carne bovina terminada em dietas de alto grão (Duckett et al., 2009; Dunne et al., 2006; Realini et al., 2004). Entretanto, para características de maciez, suculência e

marmoreiro não foram encontradas diferenças entre os sistemas de terminação no estudo realizado por Pardomingo et al. (2012).

## I.6 Carne DFD

A rentabilidade da indústria da carne é baseada em animais com alta eficiência alimentar, rápido crescimento e custo mínimo. No entanto, esse modelo de produção resulta em animais mais suscetíveis ao estresse e, conseqüentemente, maior incidência de cortes DFD (Figura 5), do inglês dry, firm e dark – seca, firme e escura (Adztey e Nurul, 2011).

A carne DFD apresenta coloração mais escura, alto pH e aparência seca devido a uma série de fatores, entre eles, clima, promotores de crescimento, gênero, genética, práticas de manipulação antes do abate e transporte (Scanga et al., 1998). O pH anormalmente alto ( $\geq 6$ ) resulta em menos desnaturação da mioglobina e facilita um nível mais alto de metabolismo aeróbico na superfície, além disso, promove alta capacidade de retenção de água que causa a aparência ressecada (Adztey e Nurul, 2011).

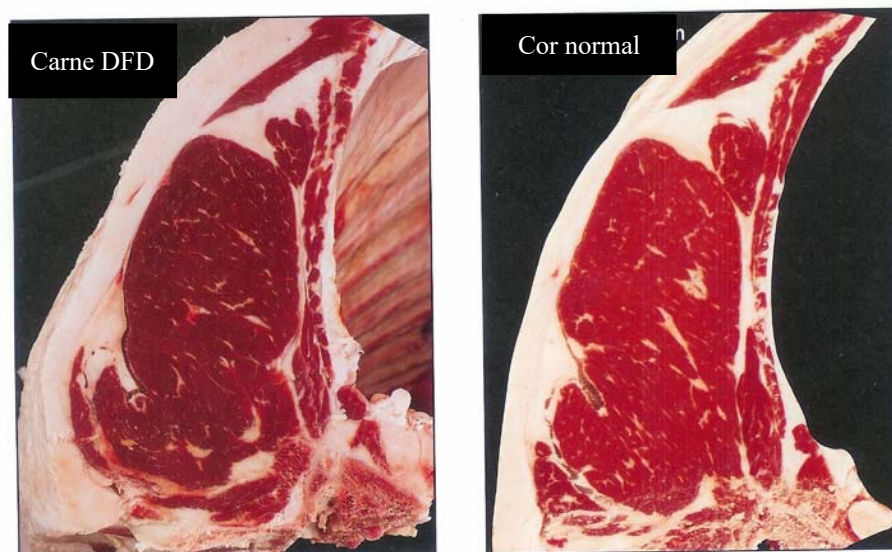


Figura 5. Carne DFD. A carne DFD apresenta coloração mais escura quando comparada a carne normal, devido ao pH mais alto no *post mortem*.

Fonte: Ana Maria Bridi - adaptado (2019). Disponível em:  
<http://www.uel.br/pessoal/ambриди/Carnesecarcacasarquivos/Transformacao.pdf>

A deterioração da carne está associada a mudanças na cor, textura, odor e sabor e o pH é um importante determinante da qualidade da carne e do crescimento microbiano, portanto, um indicador para sua resistência à deterioração (Brooks et al., 2008). O pH *post mortem* da carne é determinado pela quantidade de ácido lático produzido a partir do glicogênio muscular durante a glicólise anaeróbia, e esta reação pode ser impedida se o glicogênio disponível for esgotado por fadiga, inanição ou pelo medo e estresse do animal antes do abate (Tarrant, 1989). Desta forma, o

glicogênio é o principal precursor na formação de carne ácida e interage com outros fatores na determinação da qualidade da carne e não aparecimento da carne DFD.

## I.7 Glicogênio

O glicogênio é definido como o estoque de carboidrato (açúcar) no organismo e sua estrutura química é composta por um polímero de glicose de cadeia ramificada relativamente simples, com um pequeno núcleo de proteína (Pethick et al., 1994; 1999). Esta molécula possui cerca de 5500 resíduos de glicose e sua estrutura é adaptada para funcionar como fonte de energia e otimizar sua utilidade acumulando a glicose no menor volume possível e maximizando o número de extremidades não redutoras acessíveis para a primeira enzima do ciclo glicogenolítico – a fosforilase (Pösö e Puolanne, 2005).

Dois tipos de moléculas de glicogênio foram identificadas baseadas na solubilidade em ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) (Alonso et al., 1995). A menor forma, conhecida como proglicogênio (máximo de 400 kDa) não é solúvel em  $\text{HClO}_4$  devido sua alta taxa de proteína/carboidrato. Enquanto que a maior forma, macroglicogênio ( $\sim 10^3$  kDa) possui menor taxa de proteína/carboidrato e é solúvel em  $\text{HClO}_4$  (Ferguson e Gerrard, 2014). A concentração e utilização de cada uma dessas duas formas ainda não está completamente descrita, entretanto, o que se conhece é que em situações de baixo glicogênio disponível, tanto proglicogênio quanto macroglicogênio contribuem igualmente na glicogenólise (Rosenvold e Andersen, 2003).

Quantitativamente, o fígado e o músculo respondem pela maioria das reservas de glicogênio do corpo, apesar de vários tecidos serem capazes de sintetizá-lo, incluindo rim, coração e cérebro (Roach et al., 2016). No tecido muscular, a quantidade de glicogênio depende da espécie do animal e do tipo do músculo, além disso, acredita-se que o papel do glicogênio no músculo esquelético seja menos influenciado pela nutrição e mais pelos efeitos do estresse ou pelas demandas energéticas do músculo (McVeigh e Tarrant, 1982).

Um dos procedimentos realizados no momento do abate dos animais destinados para produção de carne que altera a fonte de energia utilizada para contração é a sangria. No músculo recém-abatido o aporte de oxigênio cessa, porém, a homeostase muscular continua e o músculo necessita de energia para que estas contrações aconteçam (Bendal e Taylor, 1972). Deste modo, o músculo passa a executar contrações com a degradação das fontes de energia de forma anaeróbica, e é neste meio que ocorre um dos fenômenos mais importantes em termos tecnológicos de carne: a glicólise *post mortem* (Tarrant, 1989).

No meio anaeróbico a energia que o músculo utiliza provém do glicogênio, mais especificamente da glicólise, que ocorre para ressintetizar o ATP e utilizá-lo na homeostase. Essa

reação gera como produto o ácido láctico, e este, sem a circulação sanguínea é incapaz de chegar até o fígado para ser metabolizado e se acumula no tecido muscular provocando queda no pH da carne (Ferguson e Gerrard, 2014). Sendo assim, a quantidade de ácido produzida pode variar conforme a disponibilidade de glicogênio presente no músculo

Em bovinos, a concentração de glicogênio em estado de repouso e saúde normal é de cerca de 94  $\mu\text{mol/g}$  e esse valor varia entre o tipo de músculo e, principalmente, ao tipo de fibra predominante (McVeigh e Tarrant, 1982). Baseado nos estudos de Pethick et al. (1999) os músculos com predominância das fibras IIa possuem maiores concentrações de glicogênio. No *post mortem* os valores encontrados são menores (45 – 55  $\mu\text{mol/g}$ ) em comparação com o nível real antes da morte pois existe o rápido consumo de glicogênio em situações de estresse (Przybylski et al., 2006). A quantidade livre de glicogênio deve ser suficiente para que o pH, em cerca de 24 horas, esteja entre os valores 5,8 – 5,5. Ao atingir esses valores há inibição enzimática e a glicólise anaeróbica paralisa (Ferguson e Gerrard, 2014).

Por outro lado, animais abatidos em condições de estresse por um período mais prolongado apresentam pouca variação do pH na massa muscular em relação aos animais abatidos em condições normais, causada pela baixa concentração do glicogênio no momento de abate. Nesse caso, o pH final fica estabilizado em um valor maior e, como consequência, as proteínas musculares tem uma maior capacidade de retenção de água e a carne é escura, ocasionando o fenômeno chamado de DFD (dark, firm, dry), como citado anteriormente (Tarrant, 1989).

Para atestar a diferença entre o aporte de glicogênio muscular antes e depois do abate Lahucky et al., (1998) realizaram um experimento com 43 bovinos. Nesse estudo os animais foram divididos em dois grupos: A (controle e não estressados) e grupo B (estressados pré-abate). Os animais percorreram uma pequena distância até o abatedouro e logo na chegada os animais do grupo A foram abatidos, enquanto que o grupo B foi misturado a outros animais na baía de espera e lá permaneceram durante uma noite (overnight). O estresse causado ao grupo B logo antes do abate causou depleção no glicogênio muscular ( $\mu\text{mol/g}$ ) *ante mortem* ( $33,3 \pm 10,2$ ) quando comparado ao grupo A ( $60,8 \pm 11,3$ ), como consequência desse resultado, o pH mensurado 48 horas após o abate também foi diferente entre os grupos  $5,66 \pm 0,23$  para o grupo A e  $6,70 \pm 0,24$  para o grupo B, comprovando que a exaustão metabólica anterior ao abate é um fator que favorece a ocorrência de cortes DFD.

Além do estresse como agente causador de baixo glicogênio durante a transformação do músculo em carne, existe um efeito relacionado a nutrição, tais como, consumo de ração e a qualidade do alimento (Pethick et al., 1999). Nesse contexto, Rosenvold et al. (2001) fizeram um estudo com o objetivo investigar se os estoques de glicogênio muscular em suínos poderiam ser diminuídos por meio de alimentação estratégica de acabamento antes do abate. Os animais ( $n=60$ ) foram separados em grupos com alimentação padrão (controle) e sete grupos com dietas pobres

em carboidratos digestíveis (grupos experimentais). Os estoques de glicogênio muscular foram reduzidos no músculo *longissimus* (LM) de 11 a 26% no momento do abate em suínos que foram alimentados com as dietas experimentais em comparação com o grupo controle. A qualidade da carne mensurada pelo pH e cor final no músculo LM em metade dos suínos 24 horas após a morte, mostrou que o pH final não foi afetado pela redução nos estoques de glicogênio nos músculos de suínos alimentados com qualquer uma das dietas experimentais. No entanto, a carne de suínos alimentados com duas das dietas experimentais foi mais escura do que a carne dos animais alimentados com a dieta controle.

Para avaliar a influência da nutrição no nível de glicogênio em bovinos em fase de terminação Pethick et al. (1994), compararam animais terminados em pastagem seca em dezembro (sudoeste da Austrália) com o nível encontrado em novilhos terminados consumindo ração. Além disso, os novilhos foram comparados quanto ao local de permanência, em baias individuais em uma estação de pesquisa comparada a um confinamento comercial. Ao final do experimento o nível de glicogênio foi drasticamente reduzido nos novilhos em pastagem seca quando comparados com a ração de confinamento. Houve uma redução menor, embora significativa, do glicogênio no confinamento comercial em relação aos animais individualmente alojados.

Além de testar a qualidade do alimento fornecido, alguns estudos investigam a suplementação de aminoácidos com a finalidade de aumentar o aporte de glicogênio para momentos de estresse e intensificação de atividade física. Entre eles, Kato et al. (2017), mostraram que, ao suplementar lisina na alimentação de ratos que foram submetidos a indução elétrica da contração (simulando exaustão muscular) o conteúdo de glicogênio muscular aumentou em cerca de 15% quando comparado a ratos que receberam o mesmo tratamento, porém sem suplementação de lisina.

## I.8 Taurina

A taurina é um aminoácido considerado condicionalmente essencial para a maioria dos mamíferos e essencial para algumas espécies, como por exemplo, gatos (Huxtable, 1992; Sturman, 1993). A quantidade total de taurina encontrada no organismo é um balanço entre três fontes: (i) síntese a partir de metionina/cisteína, (ii) absorção da taurina contida nos alimentos pelo intestino, (iii) excreção como sal biliar e taurina não conjugada em urina através do rim (Lambert et al., 2015). Em humanos a concentração plasmática de taurina varia de 10 a 100  $\mu\text{M}$ , sendo que nos tecidos metabolicamente mais ativos a concentração é superior (Huxtable, 1992).

A síntese endógena de taurina ocorre por duas vias principais, cisteína ou metionina. Entretanto, independente do precursor, a reação metabólica final consiste em uma oxidação do

grupo sulfídrico seguido por uma descarboxilação a hipotaurina, e então, a taurina é obtida por uma espontânea ou oxidação enzimática (pela hipotaurina desidrogenase) da hipotaurina (Figura 5) (Jacobsen e Smith Jr, 1968; De Luca et al., 2015).

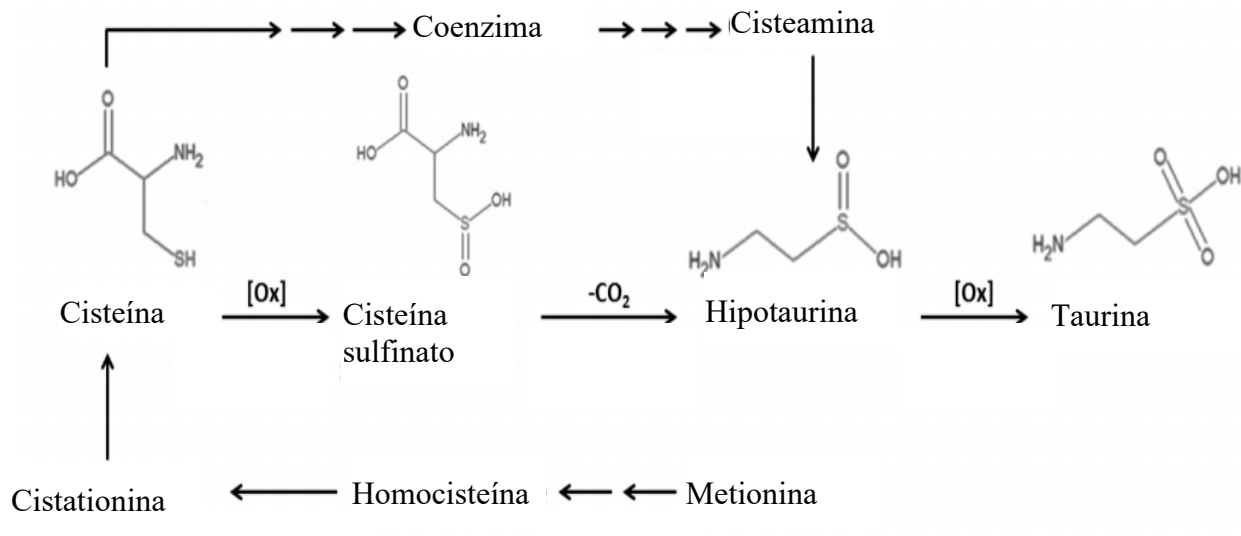


Figura 6. Biossíntese da taurina à partir dos aminoácidos cisteína e metionina. A síntese ocorre primariamente no fígado, apesar que outros tecidos podem contribuir para essa síntese baseada na presença de enzimas chaves. Algumas espécies, como os felinos, não conseguem sintetizar a taurina e dependem drasticamente da taurina ingerida (Adaptado de De Luca et al., 2015).

O transporte da taurina através da membrana é controlado por dois principais transportadores: TauT (SLC6A6) e PAT-1 (SLC36A1). O transportador TauT é sódio (Na<sup>+</sup>) e cloro (Cl<sup>-</sup>) dependente, possui alta afinidade com a taurina e, ao mesmo tempo, baixa capacidade de transporte, enquanto que o PAT-1 é pH dependente, possui baixa afinidade e alta capacidade de transporte da taurina (Anderson et al., 2009). Estudos com ratos knockout para o transportador TauT resultaram em redução de 90% da taurina nos tecidos, mostrando que o transportador PAT-1 não foi capaz de compensar a ausência de TauT (Warskulat et al., 2004; Lambert et al., 2015).

A taurina é encontrada livre, isto é, não é usado na síntese protéica e por isso é o mais abundante aminoácido livre distribuído, principalmente, nos tecidos dos mamíferos, tais como, coração, retina, fígado, encéfalo e células sanguíneas (Huxtable, 1992; Chen et al. 2012). Estudos iniciados nos anos 60 têm mostrado as principais funções da taurina (Jacobsen e Smith Jr, 1968; Huxtable, 1992; Sturman, 1993). Dentre as principais funções metabólicas desempenhadas pela taurina estão a regulação intracelular de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), redução de níveis plasmáticos de inflamação e marcadores oxidativos, função mitocondrial e aumento plasmático de adiponectina (You et al., 2013; Murakami et al., 2016).

No metabolismo lipídico a taurina está envolvida na biotransformação do colesterol em ácido biliar no fígado aumentando a secreção de insulina e, conseqüentemente, reduzindo o colesterol sanguíneo (Chen et al. 2016). No músculo esquelético a taurina pode atuar na modulação

de canal iônico, estabilidade da membrana e homeostase de  $\text{Ca}^{+2}$  (Huxtable, 1992; Warskulat et al. 2004). Este aminoácido pode ser considerado um estabilizador de membrana, pois controla a excitabilidade muscular através da proteína C kinase (PKC) com modulação mediada por canal de cloreto ou de outros canais iônicos (Conte Camerino et al., 2004).

Para comprovar o papel da taurina no músculo esquelético muitos estudos têm mostrado que a mudança na concentração muscular de taurina leva a mudanças no músculo, incluindo a menor força produzida, velocidade do potencial de ação e capacidade de exercício (Hamilton et al., 2006; Warskulat et al., 2004). Em estudo desenvolvido por Horvath et al. (2016), quatro semanas de suplementação de taurina resultou em maior resistência à fadiga e recuperação da força no músculo de contração rápida. Resultados similares foram retratados no experimento de Terril et al. (2016), em que os tratamentos com suplementação de taurina levaram a um aumento do teor de aminoácidos no músculo e a melhora da força muscular esquelética e redução da inflação.

A administração oral de taurina aumentou a concentração de glicogênio no fígado após a carga de glicose, como relatado por Kulakowski e Maturo (1984). A partir desses resultados os pesquisadores Takahashi et al. (2014), iniciaram experimentos com a intenção de descobrir se a administração de taurina estimula a reposição de glicogênio pós-exercício no músculo esquelético. De fato, foi observado aumento da reposição de glicogênio no músculo esquelético dos camundongos tratados com taurina em comparação com os ratos controle após o exercício de endurance. Além disso, os resultados mostraram que a administração de taurina aumentou significativamente a atividade voluntária de corrida de roda após o exercício extenuante em camundongos. Esses resultados sugerem que o tratamento com taurina pós-exercício aumentou a reposição de glicogênio no músculo esquelético e melhorou o desempenho durante o exercício subsequente.

Um dos mecanismos que poderia explicar o aumento do glicogênio muscular com a suplementação da taurina foi proposto por Takahashi et al. (2016). Estes autores relataram que a reposição de glicogênio no músculo esquelético e foi associada a concentrações mais altas de ácidos graxos livres (AGL) séricos durante a fase pós-exercício em camundongos, sendo assim, existe a possibilidade de que a administração de taurina possa poupar carboidrato para a reposição de glicogênio no músculo esquelético durante a recuperação pós-exercício.

Outros resultados do mesmo grupo de autores sugerem que a taurina está envolvida na regulação da glicogenólise / glicólise no músculo esquelético em repouso, durante o exercício e na recuperação pós-exercício, pois o tratamento com taurina atenuou o aumento do nível de lactato sanguíneo durante o exercício, e este é considerado como um indicador da ativação da glicogenólise / glicólise no músculo esquelético. Entretanto, até o momento, os mecanismos pelos quais a taurina melhora o aporte de glicogênio no tecido muscular não foram esclarecidos.

Visto a importância de um aporte nutricional adequado nas diferentes fases do desenvolvimento de bovinos com o intuito de maximizar o aproveitamento dos alimentos, reduzir os custos de produção e aumentar o aporte glicogênio muscular; a utilização de manobras alimentares como a restrição ou suplementação de prebióticos ou taurina possa auxiliar na performance e desenvolvimento de bovinos em diferentes estágios de crescimento.

## **OBJETIVOS**

Na presente proposta de trabalho, objetivou-se encontrar alterações metabólico-hormonais ao avaliar a inclusão de prebiótico e alimentação restrita em bezerros mestiços em fase de aleitamento. Assim como, detectar alterações no desempenho, qualidade de carcaça, perfil sérico bioquímico e glicogênio muscular de bovinos alimentados com dietas com níveis de taurina.

Para isso, foram conduzidos dois experimentos. Especificamente no experimento I pretendeu-se:

- Determinar os parâmetros bioquímicos como proteínas totais, glicose, creatinina, ureia, lactato, fosfatase alcalina e triglicerídeos de bezerros lactentes;
- Avaliar concentrações plasmáticas de leptina e grelina de bezerros lactentes alimentados com suplementação de prebióticos ou submetidos à restrição alimentar;
- Verificar a influência da restrição alimentar e da inclusão de MOS e MFOS sobre a expressão gênica de receptores de grelina na região paraventricular do hipotálamo de bezerros mestiços em fase de aleitamento;
- Avaliar o desenvolvimento do epitélio intestinal e do rúmen de bezerros lactentes.

Os objetivos específicos do experimento II foram:

- Avaliar o impacto da suplementação de taurina no desempenho e na qualidade de carcaça de bovinos em confinamento;
- Medir alterações nas concentrações sanguíneas de glicose, lactato, taurina e triglicerídeos totais;
- Avaliar o impacto da suplementação de taurina no glicogênio muscular disponível;
- Determinar variações na suplementação de taurina na qualidade da carcaça (peso da carcaça, grau de rendimento, grau de qualidade, escore de marmoreio, espessura da gordura subcutânea, área de olho de lombo).

**RESTRIÇÃO ALIMENTAR E SUPLEMENTAÇÃO DE PREBIÓTICO NO  
DESENVOLVIMENTO DE BEZEROS EM FASE DE ALEITAMENTO**

## INTRODUÇÃO

Ao nascerem, os bezerros apresentam seus compartimentos estomacais pequenos e não desenvolvidos e, por esse motivo, são considerados não ruminantes. Nesta fase inicial, o animal consome baixa quantidade de alimentos sólidos fazendo do leite a principal fonte de nutrientes e o abomaso, o estômago com maior atividade (Jasper e Weark, 2002). A transição para ruminante funcional ocorre de forma gradativa e é influenciada, principalmente, pela ingestão de concentrado e volumoso (Baldwin et al., 2004; Zitnan et al., 2005). As maiores mudanças, em termos de desenvolvimento vão ocorrer no rúmen, que representa juntamente com o retículo, apenas 30% do total dos quatro compartimentos ao nascimento (Otterby e Lin, 1981). Este órgão será colonizado por diferentes tipos de microrganismos e terá desenvolvida sua musculatura, parede interna, como também a secreção de enzimas funcionais na parede do rúmen (Carvalho et al., 2003).

Este desenvolvimento acelerado também ocorre no intestino nas primeiras semanas da vida extra uterina podendo esse órgão dobrar de comprimento. Todas essas mudanças morfológicas e fisiológicas geram estresse no animal e, muitas vezes, compromete seu desempenho (Guilloteau et al., 2009). Desta maneira, a fim de assegurar o desenvolvimento do trato gastrintestinal é extremamente importante aplicar manejos adequados na nutrição e garantir uma maior rentabilidade ao final do ciclo produtivo. Para isso, existem várias técnicas disponíveis que visam melhorar o crescimento, a saúde e amenizar os custos com alimentação dos animais em fase de aleitamento (Anderson e Nagaraja, 1987).

Os prebióticos são aditivos que possuem efeito modulador da microbiota intestinal evitando a ocorrência de diarreias e parasitoses (Oliveira et al., 2009), e em função desse efeito, podem ser utilizados como estratégia para garantir a melhoria da absorção de nutrientes, desenvolvimento intestinal e melhor crescimento dos bezerros (Samanta et al., 2012). Um dos grupos de prebióticos conhecidos são os oligossacarídeos e seus representantes mais usados para auxiliar no desenvolvimento do trato gastrointestinal (TGI) são os mananoligossacarídeos (MOS) e os frutoligossacarídeos (FOS).

Além de melhorar o ambiente intestinal, a ingestão de prebióticos pode atuar no controle da saciedade e na redução da massa gordurosa. Dados de estudos realizados por Cani et al. (2009) indicam que o mecanismo associado a esta resposta é o decréscimo na secreção de grelina, hormônio que atua estimulando a fome e a procura por alimento. Apesar dos avanços recentes, poucos autores dedicaram-se a investigar a relação entre o efeito dos prebióticos sobre a expressão da grelina em bovinos.

Outra alternativa para reduzir os custos com alimentação e acelerar o processo de desenvolvimento do trato gastrointestinal, é o uso de alimentação restrita de leite por tempo determinado, que visa um desenvolvimento acelerado na fase de realimentação (O'Donovan, 1984;

Webb et al., 2004). A restrição de leite promove redução da exigência para energia de manutenção devido ao menor peso corporal com conseqüente ganho compensatório no período de realimentação (Leeson e Zubair, 1997). Portanto, este estudo foi conduzido com intuito de comparar os efeitos da restrição de leite e da suplementação de prebióticos na alimentação de bezerros em fase de aleitamento e verificar alterações metabólicas-hormonais que possam promover melhor desenvolvimento, crescimento, ganho de peso e saúde animal para o preparar os animais para fase de desmame.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **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 nº017/2016.

O experimento foi realizado no Setor de Suinocultura da Universidade Federal de Goiás (UFG), Câmpus Samambaia – 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 quatro m<sup>2</sup> que continham cobertura e piso de concreto. No experimento foram utilizados 20 bezerros leiteiros, cruzados zebu x holandês, com peso inicial  $37,83 \pm 4,92$  Kg 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 (Figura 7), pesados e a cura de umbigo foi extendida por mais três dias com aplicação diária de solução de iodo na concentração de 7% . Os animais foram alocados em baias individuais e a limpeza e desinfecção do ambiente era realizada por meio de lavagens diárias com utilização de solução de hipoclorito (10%).



Figura 7. Bezerro do ensaio experimental. Na chegada do experimento os animais eram identificados por meio de brincos.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Após o período de adaptação os vinte bezerros foram pesados e submetidos a quatro tratamentos:

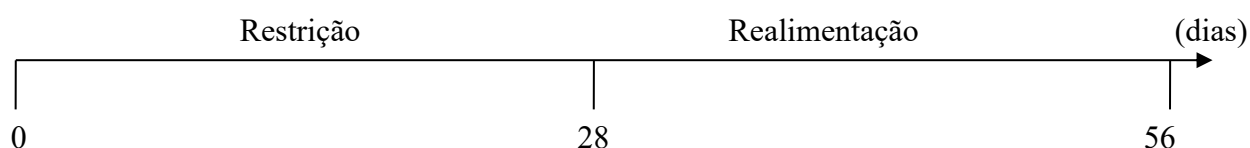
Tratamento CON: alimentação sem restrição de leite nos dois períodos (6 L/animal/dia).

Tratamento RES: alimentação com restrição de leite no primeiro período (3 L/animal/dia) e sem restrição alimentar no segundo período (6 L/animal/dia);

Tratamento MOS: alimentação sem restrição de leite nos dois períodos e suplementação de 5 g de mananoligossacarídeo.

Tratamento MFOS: alimentação sem restrição de leite nos dois períodos e suplementação de 5 g manano-frutoligossacarídeo.

A restrição alimentar do grupo experimental RES seguiu a linha do tempo abaixo:



O manejo alimentar foi constituído de leite e alimento sólido fornecido *ad libitum* e constituído de feno e concentrado experimental à base de milho, farelo de soja e premix mineral (Tabela 1). As análises dos alimentos foram realizadas no Laboratório de Nutrição da Escola de

Veterinária e Zootecnia da UFG. As amostras de concentrado e feno fornecidos e das sobras, em pool mensal de duas amostras semanais, foram pré-secas em estufa a 65°C e posteriormente analisadas para matéria seca (MS) (105°C), cinzas, proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) segundo AOAC (2000). O leite foi fornecido às 8h da manhã e 3h da tarde e os aditivos MOS (GlucanMos – Yes, Brasil) e MOS+FOS (GlucanMosFos – Yes, Brasil) foram dissolvidos no leite em quantidade de 5 g/animal, 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 (Figura 8).

Tabela 1. Composição bromatológica do leite e alimentos sólidos. Foram oferecidos feno de capim Tifton, concentrado inicial e leite aos bezerros durante o período experimental.

	Concentrado	Feno	Leite
Matéria seca (MS) (%)	88,30	92,20	13
Matéria mineral (% MS)	6,72	5,32	-
Proteína bruta (% MS)	13,62	12,17	3,50
Extrato etéreo (% MS)	2,50	1,60	-

Os bezerros foram inspecionados diariamente para avaliação do estado geral, hidratação e ocorrência de diarreia. Para tratar os dias em diarreia foi fornecido soro oral (20 g de glicose de milho, 5 g NaCl, 4 g NaHCO<sub>3</sub> e 1 g KCl para um litro de água) e, quando necessário, foi realizado exame clínico completo e adotadas as medidas indicadas pelo médico veterinário. Após 10 dias de coleta de dados um animal do grupo MOS morreu por causas desconhecidas e esse grupo permaneceu com n=4 até o final do período experimental.



Figura 8. Fornecimento de alimento sólidos. Os bezerros em fase de aleitamento tinham disponível para livre consumo feno e concentrado inicial.  
Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

## Coleta de dados e amostras

### 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 mecânica de capacidade de 100 Kg (ValFran – modelo 602, São Paulo, Brasil) para obtenção dos dados.

### Perfil metabólico e hormonal

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 grelina total, leptina, glicose, triglicerídeos, lactato, 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 aliquoteado em parcelas de 500 µL e armazenado em microtubos plásticos à -20°C para as análises dos parâmetros bioquímicos.

Nas coletas de sangue com intuito de determinar a concentração sérica de grelina e leptina as amostras foram centrifugadas imediatamente após a coleta à 200 xg em uma temperatura de 4°C por 15 minutos, o sobrenadante (500 µL) foi transferido para microtubos plásticos e armazenados em freezer a -80°C. Para grelina, os microtubos foram previamente preparados com adição de 50 µl de ácido clorídrico na concentração de 0,1 molar/mL para manter a estabilidade deste hormônio.

### Material para histomorfometria

O abate dos animais ocorreu no abatedouro do Instituto Federal Goiano na cidade de Urutaí, distante aproximadamente 170 km da cidade de Goiânia. Nesta ocasião, os bezerros foram transportados com um dia de antecedência e passaram por um jejum de, no mínimo, oito horas. Durante a necropsia, foram coletadas amostras cérebro (região paraventricular do hipotálamo) a fim de determinar a expressão de receptores de grelina (Figura 9). 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.

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



Figura 9. Coleta de material histológico. Uma amostra da região do hipotálamo foi coletada durante a necropsia para mensurar a expressão de receptores de grelina.  
Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

## Análises Laboratoriais

### Parâmetros bioquímicos

Os parâmetros séricos de fosfatase alcalina, glicose, triglicerídeos, lactato, 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.

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 Pleno (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

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 Pleno (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 Pleno (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A análise de ureia sérica foi realizada utilizando-se kit enzimático Urea 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 Pleno (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 Pleno (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 Pleno (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 Pleno (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

### Quantificação hormonal

Neste estudo, as amostras de soro que estavam em freezer - 80 °C foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo seco para o transporte da cidade de Goiânia no estado de Goiás até Maceió em Alagoas. No Laboratório de Reatividade Cardiovascular do ICB - Universidade Federal do Alagoas (UFAL), foram realizadas as dosagens séricas de grelina e leptina, pela técnica de Elisa Sanduíche, de acordo com os protocolos descritos a seguir:

#### Dosagem de grelina sérica:

Em uma placa de poliestireno com 96 poços foram pipetados 100 µL de anticorpos para grelina (AAU93610 RayBiotech®, Norcross) por poço, logo depois, a placa foi selada e incubada overnight à 4°C na concentração de 1µg/mL. Na sequência, a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem (50 mM Tris-HCl contendo Tween®-20) e bloqueada por uma hora com BSA 1%. As amostras de soro, da curva padrão e branco foram adicionadas nos poços correspondentes na quantidade de 20 µL e a placa foi incubada overnight à 4°C. Sequencialmente, a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem e, após as lavagens, adicionou-se 100 µL de anticorpo de detecção (Detection Antibody; 0,25 µg/mL) (Peprotech®) para todos os poços. Cobriu-se a placa com o selador e incubou-se à temperatura ambiente por 4 horas em um shaker em uma velocidade moderada, em torno de 150 rpm. Após a incubação, o selador foi removido, as soluções descartadas e a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem. Na sequência, 100 µL de Enzyme Solution (estreptavidina -“horseradish” peroxidase conjugada em PBS) foi pipetado em cada poço

e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora no shaker (~ 150 rpm). Ao final da incubação, a placa foi lavada 5 cinco vezes com tampão de lavagem. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de Substrate Solution (3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina em PBS com  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em cada poço, cobriu-se a placa com o selador e incubou-se no shaker por aproximadamente 30 minutos (tempo onde a cor azul começou a ser formada nos poços). Adicionou-se rapidamente 100  $\mu\text{L}$  da solução stop (Stop Solution 0,3M HCl) e a leitura da absorvância foi realizada nos  $\lambda = 450$  e 590. Registrou-se a diferença das unidades de absorvância (450 nm – 590) e os dados foram tabulados e analisados no pacote Excel® a partir da equação da reta.

#### Dosagem de leptina sérica:

Em uma placa de poliestireno, 100  $\mu\text{L}$  de anticorpos para leptina (500-P86 Peprtech®, Rocky Hill) foram pipetados por poço, posteriormente, a placa foi selada e incubada overnight à 4°C na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Na sequência, a placa foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem (50 mM Tris-HCl contendo Tween®-20) e bloqueada por 1 hora com BSA 1%. As amostras de soro que foram diluídas duas vezes, a curva padrão de leptina (0,23–30 ng/mL) e o branco foram adicionadas (20  $\mu\text{L}$ ) nos poços correspondentes e placa foi incubada overnight à 4°C. Sequencialmente, a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de Detection Antibody 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Peprtech®) para todos os poços. Cobriu-se a placa com o selador e incubou-a à temperatura ambiente por quatro horas em um shaker em uma velocidade moderada, em torno de 150 rpm. O selador foi removido, as soluções descartadas e a placa foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem. Na sequência, 100  $\mu\text{L}$  de Enzyme Solution (estreptavidina-“horseradish” peroxidase conjugada em PBS) foi pipetado em cada poço e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos no shaker (em torno de 150 rpm). Ao final da incubação, a placa foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de Substrate Solution (3 tetrametil-benzidina em PBS com  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em cada poço, cobriu-se a placa com o selador e incubou-se no shaker por aproximadamente 15 minutos para que a reação ocorresse. Adicionou-se rapidamente 100  $\mu\text{L}$  da solução stop (Stop Solution 0,3M HCl) e a leitura da absorvância foi realizada nos  $\lambda = 450$  e 590. Registrou-se a diferença das unidades de absorvância (450 nm – 590) e os dados foram tabulados e analisados no pacote Excel® a partir da equação da reta.

#### Western Blotting

A expressão de receptores de 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 BSA 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 absorbância 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 MilliQ, 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 as diferenças 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 µL/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 de 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.

#### Preparo das lâminas histológicas do rúmen e intestino delgado

No Setor de Patologia da Escola de Veterinária e Zootecnia 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 (4 µm) e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) proposta por Montanholi et al. (2013).

Os tecidos coletados durante o abate estavam fixados em álcool 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 em um processador de tecidos por 8:45 horas (Tissue processor: LupeTec PTO5TS; São Carlos, Brasil). Na sequência, os fragmentos 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 4 µm de espessura. Os cortes obtidos foram fixados em lâminas histológicas que foram coradas por hematoxina – 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 3 minutos e, depois desse tempo, foram colocadas em cubas e em água corrente por 25 minutos e finalmente imersas em eosina por 30 segundos. 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 10 segundos 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 (Leica DM2500, Nussloch, Alemanha) com aumento de

25 e 50 vezes, respectivamente, segundo metodologia proposta Lesmeister (2004b). Foram mensuradas  $10 \pm 5$  papilas e  $5 \pm 2$  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.

## 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.

## RESULTADOS

### Performance

As médias de ganho de peso nos períodos 1, 2 e o ganho total de peso de bezerros submetidos a restrição de leite ou suplementados com prebióticos estão apresentados na Figura 10. A média de ganho de peso durante o período 1 (Figura 10B) para os animais do grupo RES foi menor que o controle, o que não foi verificado nos grupos MOS e MFOS (RES:  $13,18 \pm 0,9$  Kg; CON:  $18,54 \pm 1,4$  Kg; MOS:  $17,63 \pm 1,4$  Kg; MFOS:  $18,64 \pm 1,3$  Kg). No período 2 (Figura 10C), não houve diferença entre os grupos no ganho de peso corporal. No final do experimento (dia 56 = período 1 + período 2) o ganho de peso total foi semelhante entre os grupos (Figura 10A - CON:  $86,79 \pm 8,6$  %; RES:  $85,28 \pm 9,1$  %; MOS:  $78,56 \pm 10,9$  %; MFOS:  $87,81 \pm 10,43$  %, respectivamente). As Figuras 10D e 10E representam o consumo de alimento sólido dos animais durante os períodos 1 e 2, respectivamente. Nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada para o consumo nos primeiros 28 dias de experimento, em contrapartida, no período 2 os animais RES tiveram maior consumo de alimentos sólidos comparado aos outros animais (RES:  $875,2 \pm 34,0$  g; CON:  $686,3 \pm 21,0$  g; MOS:  $640,3 \pm 22,8$  g; MFOS:  $638,4 \pm 18,1$  g).

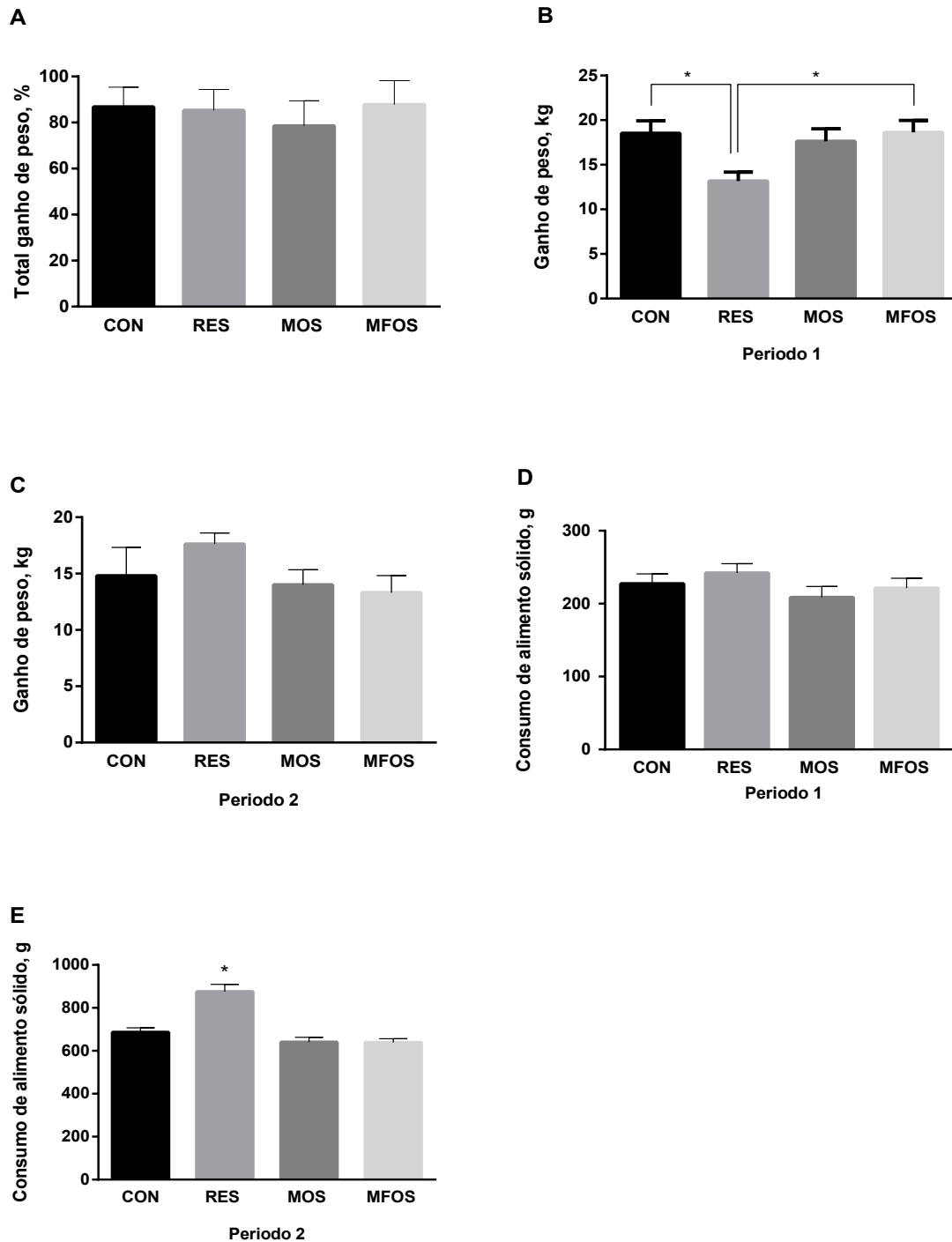


Figura 10: Performance de bezerros em fase de aleitamento. Os animais foram suplementados com prebióticos ou submetidos a restrição de leite por 28 dias (período 1). A: Porcentagem de ganho de peso ao longo do experimento; B: Ganho de peso no período 1 (28 dias); C: Ganho de peso no período 2 (28 dias); D e E: Consumo de alimento sólido. Valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \*  $P < 0,05$ .

## Parâmetros séricos bioquímicos

Os metabólitos e as concentrações hormonais obtidas de todos os grupos são mostrados nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Não houve diferenças entre grupos e períodos de tratamentos com relação aos níveis séricos de lactato (Figura 11A), proteínas (Figura 11B), creatinina (Figura 11E), ureia (Figura 11F) e fosfatase alcalina (Figura 11G). O nível de triglicerídeo (Figura 11C) foi mais alto no grupo MFOS comparado ao RES no primeiro período e nenhuma alteração foi encontrada para os outros grupos no mesmo período ou entre os grupos no período 2. A glicose não diferiu entre os grupos nos dois períodos experimentais (Figura 11D), no entanto, foi menor nos animais RES no período 1 comparado ao período 2. A restrição de leite (RES) e suplementação de prebióticos (MOS e MFOS) não modificaram os níveis séricos de grelina (Figura 12A) e leptina (Figura 12B).

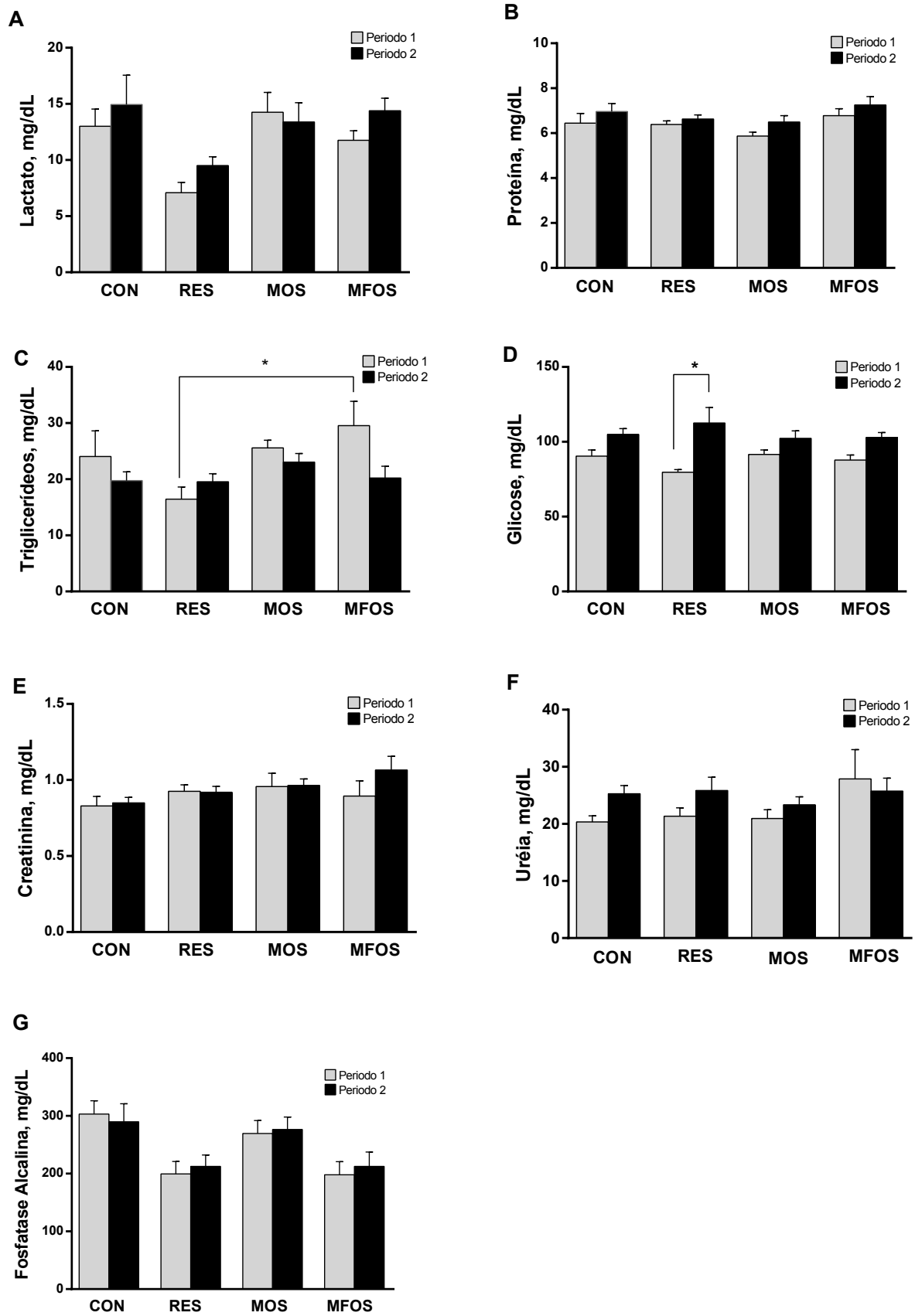


Figura 11: Parâmetros metabólicos de bezerras em fase de aleitamento. Valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \*  $P < 0,05$ .

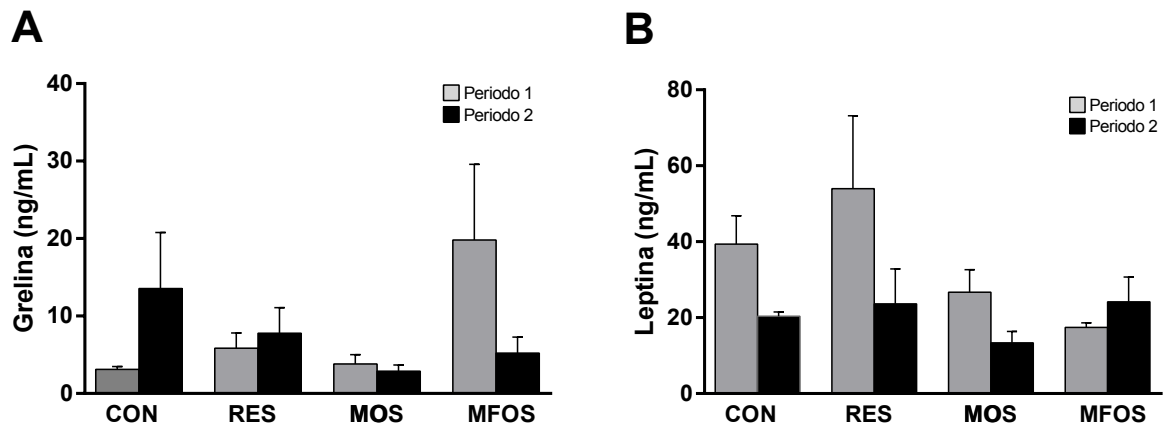


Figura 12: Concentrações hormonais de bezerros em fase de aleitamento. Os animais foram suplementados com prebióticos ou submetidos a restrição de leite por 28 dias. A: Grelina (ng/mL); B: Leptina (ng/mL). Valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \*  $P < 0,05$ .

## Histomorfometria intestinal e ruminal

A Figura 13 mostra o efeito da restrição do leite e da suplementação com prebióticos em papilas do rúmen e vilosidades do intestino delgado de bezerros. O comprimento das papilas do rúmen (Figura 13A) foi maior ( $P < 0,05$ ) nos animais alimentados com MOS ( $1536,04 \pm 67,10 \mu\text{m}$ ) quando comparado com bezerros CON ( $1284,33 \pm 58,92 \mu\text{m}$ ) e RES ( $1159,47 \pm 46,87 \mu\text{m}$ ). No entanto, a suplementação com manano-frutoligossacarídeos (MFOS) não afetou o tamanho das papilas ( $1323,95 \pm 66,34 \mu\text{m}$ ). A suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) aumentou a relação da altura das vilosidades do jejuno ( $676,21 \pm 32,59 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0,05$ ) em comparação com CON ( $551,59 \pm 27,58 \mu\text{m}$ ) e RES ( $478,08 \pm 28,64 \mu\text{m}$ ) e, ao mesmo tempo, foi similar à MFOS ( $603,29 \pm 39,04 \mu\text{m}$ ) (Figura 13B). A altura das vilosidades duodenais foi semelhante entre os tratamentos (Figura 13B) ( $P > 0,05$ ). A profundidade da cripta no duodeno e jejuno foram semelhantes entre os grupos ( $P > 0,05$ ) (Figura 13C).

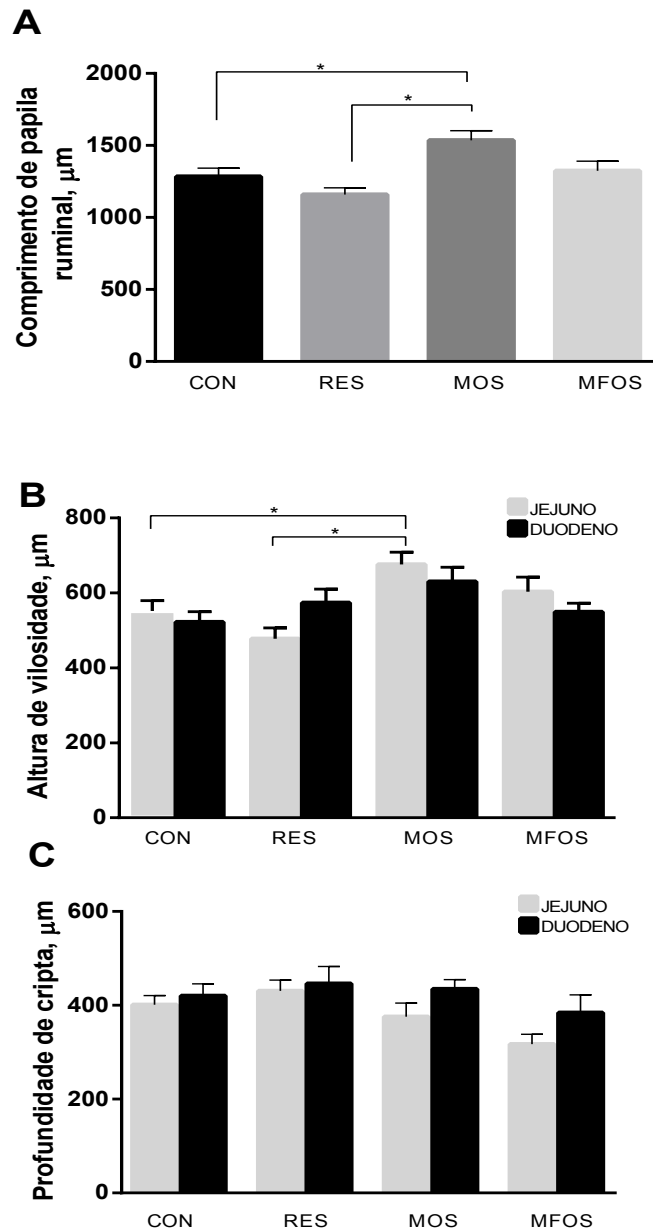


Figura 13: Histomorfometria de papilas ruminiais e mucosa do intestino delgado de bezerros. A: Comprimento de papila ruminal; B: Altura de vilosidade intestinal do jejuno e duodeno e profundidade de cripta (C) após 56 dias de estudo. Os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \*  $P < 0,05$ .

## Expressão dos receptores de grelina

A expressão dos receptores de grelina na região paraventricular do hipotálamo foi analisada pela técnica de Western Blotting e os resultados dessa análise podem ser vistos na Figura 14. Não foi verificada diferença entre os grupos C, RES, MOS e MFOS ( $P > 0,05$ ) para este parâmetro avaliado.

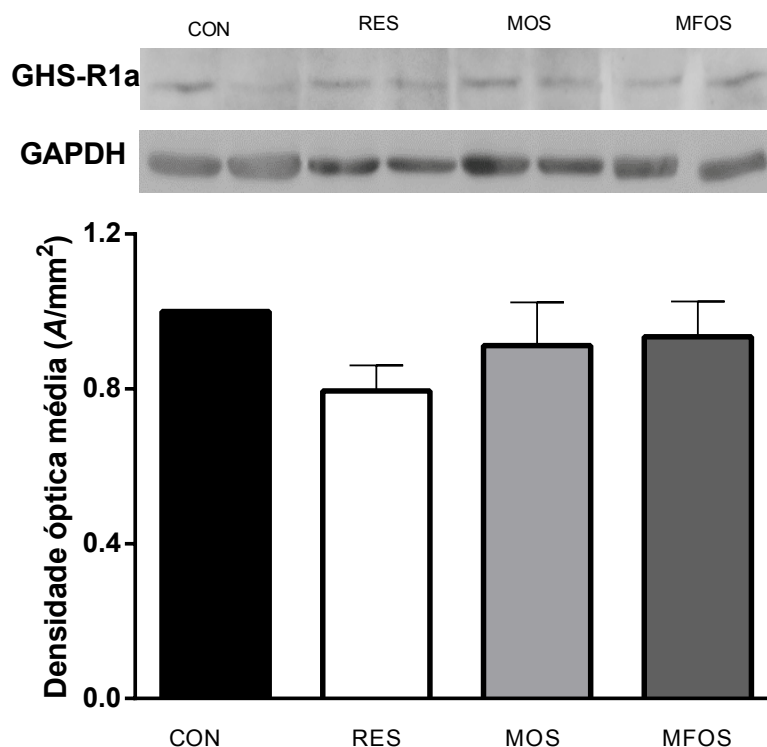


Figura 14: Expressão de receptores de grelina na região paraventricular do hipotálamo de bezerros em fase de aleitamento. Valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \*  $P < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

Durante o período 1 foi observado um menor ganho de peso dos animais que foram submetidos à restrição de leite (RES). Estes resultados estão de acordo com o proposto por Ryan (1990) e Hogg (1991) que afirmaram que durante o período de restrição alimentar pode ocorrer crescimento mais lento. Para atender as necessidades energéticas de manutenção os bezerros em fase de aleitamento necessitam diariamente de 325 g de sólidos do leite ou 2,6 Kg de leite (Dracley, 2008) e, no nosso estudo, os animais do grupo RES receberam 3 L ou cerca de 3,09 Kg de leite/dia, o que foi capaz de manter as funções vitais do corpo. Apesar disso, os 0,4 Kg de leite recebidos como nutrientes em excesso não foram suficientes para promover o mesmo crescimento observado nos outros grupos experimentais (CON, MOS e MFOS) durante o período 1.

Esse crescimento poderia ter sido compensado pelo estímulo à ingestão de alimentos sólidos quando os animais são submetidos à restrição de leite, como relatado por Baldwin et al. (2004). Entretanto, nossos resultados demonstram que não houve diferença entre os grupos para o consumo de alimentos sólidos no período 1 (Figura 10D). O consumo de concentrado é muito pequeno nas primeiras semanas, independente da quantidade de leite ou sucedâneo fornecido aos animais (Sweeney et al., 2010) e, além disso, Van Amburgh (2003) relatou que apenas após o

primeiro mês de idade os bezerros são capazes de ingerir alimentos sólidos em quantidade suficiente para suprir a demanda de energia metabólica. Corroborando com nossos achados, experimentos realizados por Jasper e Weary (2002) e Sweeney et al. (2010), demonstraram que bezerros alimentados com 4 L leite/dia não foram capazes de consumir concentrado e volumoso suficientes para satisfazer suas necessidades nutricionais de crescimento e desenvolvimento nas primeiras semanas de vida.

No período 2, ou período de realimentação, os animais do grupo RES foram capazes de recuperar e acompanhar o crescimento dos animais dos grupos CON, MOS e MFOS. O ganho compensatório (Figura 1C), observado, foi proposto por Muller e Teixeira Primo (1986), como sendo o ganho de peso rápido após um período de restrição alimentar. Schaff et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes quando compararam bezerros submetidos à restrição de leite ou com fornecimento *ad libitum*. Nesse mesmo estudo, os animais do grupo restrito tiveram melhor eficiência alimentar que o grupo sem restrição e não houve diferença na ocorrência e gravidade das diarreias no período experimental de cinco semanas. Em concordância com nossos resultados, Keogh et al. (2015), relataram recuperação de 48% no peso de touros Holstein durante os 55 dias de realimentação, após 125 dias de restrição de alimento. A melhora da eficiência alimentar resultante da restrição alimentar e subsequente ganho compensatório também foi observada em resultados de estudos de Yambayamba et al. (1996) e Ritacco et al. (1997).

No presente estudo, a resposta do GC observada, parece estar relacionada ao restabelecimento da quantidade de leite (6 L/dia) e o maior consumo de alimento sólido do tratamento RES durante o período 2 em comparação com os animais CON, MOS e MFOS. Curtis et al. (2018), mostraram que após três semanas de idade, bezerros submetidos a restrição de substituto do leite aumentaram a ingestão de alimento sólido, o que coincidiu com o aumento do crescimento desses animais quando comparados ao grupo alimentado *ad libitum*. Hogg (1991) também associou o crescimento compensatório, com a recuperação da atividade metabólica e, além disso, com melhor desenvolvimento do intestino delgado. Nossos dados de histomorfometria, no entanto, demonstram que a área absorptiva do jejuno e duodeno (Figuras 13B e 13C) não foi aumentada após 56 dias de experimento, mesmo para os animais que receberam leite restrito durante 28 dias e, em seguida, apresentaram ganho compensatório. Cavalcanti et al. (2014), observaram que ovelhas submetidas a restrição alimentar obtiveram maior digestibilidade da fração fibrosa da dieta, o que sugere maior tempo de retenção e aproveitamento do alimento nas câmaras fermentativas. Fato esse que pode compensar a não modificação da área absorptiva e manter o aporte nutricional para melhor performance do animal no período de realimentação.

A suplementação de prebióticos (MOS e MFOS) não modificou o ganho de peso dos animais e também não alterou a ingestão de alimentos sólidos ao longo do experimento (Figura 10). Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado por Donavan et al. (2002),

que ao suplementarem 45 bezerros com antibióticos ou fructoligosacarídeos não encontraram diferença entre os ganhos de peso. Similarmente, Heinrichs et al. (2003) não verificaram aumento no ganho de bezerros suplementados com mananoligosacarídeos por seis semanas, entretanto, nesse mesmo estudo foi visto um aumento no consumo de alimento sólido pelos animais suplementados com prebiótico na semana seis.

No presente estudo, apesar da suplementação de prebióticos não ter melhorado a performance dos bezerros, foi possível verificar o efeito da suplementação de mananoligosacarídeos no desenvolvimento intestinal pela maior altura das vilosidades do jejuno dos animais do grupo MOS. Wang et al., (2009), afirmam que tratamentos com suplementação de prebióticos resultam em vilosidades mais longas e cripta mais rasas, o que aumenta a eficácia de absorção de nutrientes pelo intestino, ou seja, determinam a capacidade digestiva e absorptiva do intestino delgado. Contudo, o melhor desenvolvimento das vilosidades do jejuno não refletiu no desempenho dos animais do grupo MOS deste experimento. Existem contradições no efeito do uso do prebiótico e índices zootécnicos nos primeiros meses de vida (Pourabedin et al., 2014; Gosh e Mehla, 2012; Morrison et al., 2010; Donvan et al., 2002). Modificações na mucosa intestinal provocaram melhor desempenho de bezerros somente a partir dos 90 dias de vida como relatado por Kara et al. (2015). No nosso estudo, os animais foram abatidos com média de 70 dias de idade e seja provável que, por esta razão, tenha sido observado melhora no desenvolvimento de mucosa intestinal, mas não foi encontrado resultado favorável no ganho de peso.

Ao longo do experimento atual não aconteceram modificações nos níveis séricos de creatinina, proteína total, ureia e fosfatase alcalina entre os tratamentos e períodos experimentais (Figura 11). Pouca variação da creatinina era esperada, pois aos cinco dias de idade este parâmetro já se encontra muito semelhante ao que é observado em animais adultos de acordo com o afirmado por Fagliari et al. (1998). Além disso, os valores séricos de creatinina corroboraram com a faixa de normalidade para espécie proposta por Lima et al. (2012). Os teores séricos de ureia também não variaram nos 56 dias de estudo e tais achados estão de acordo Hammon et al. (2002), que também não encontraram diferenças na ureia plasmática entre grupos alimentados com leite à vontade ou em sistema de produção convencional. Os resultados encontrados para proteínas totais e lactato não diferiram entre os grupos analisados, entretanto todos os valores se mantiveram entre os padrões estabelecidos por Lee et al. (2008), para bezerros em fase de aleitamento.

A concentração sérica de triglicerídeos estava significativamente mais baixa no grupo RES no período 1, quando comparado ao grupo MFOS. Este achado corrobora com Afsharmanesh et al. (2016), que mencionou que os lipídios totais e triglicerídeos séricos eram mais baixos em frangos de corte alimentados de forma restrita. Foi anteriormente relatado que durante a restrição alimentar consideráveis níveis de triglicerídeos podem ser utilizados para suprir a demanda de energia (Abdel-Hafeez et al., 2017). O fato da glicose ter sido significativamente mais baixa no

período 1 do que no período seguinte para animais do grupo RES, pode ter sido a chave para utilização dos triglicerídeos como fonte energética. Apesar disso, as concentrações séricas de glicose os resultados deste estudo estão inseridos nos valores pré-prandiais de glicose para bezerros lactentes que variaram entre 80 a 120 mg/dL relatados por Mohri et al. (2007). A carência de mudança da glicose entre os tratamentos durante os dois períodos sugere que a restrição imposta permite mudança compensatória na síntese e/ou utilização de glicose e manutenção da glicemia normal.

A antecipada presença de alimentos sólidos no rúmen pode ocasionar o desenvolvimento da microbiota e refletir no crescimento das papilas, grau de queratinização, pigmentação e desenvolvimento da musculatura ruminal (Klein et al., 1987; Baldwin et al., 2004). O grupo RES consumiu mais alimentos sólidos nos últimos 28 dias de experimento e não houve relação com o aumento das papilas ruminais. Resultados semelhantes foram encontrados por Roth et al. (2009), que não verificaram alterações no comprimento das papilas pela quantidade de leite fornecida ou variação no consumo de alimentos sólidos por bezerros. Lesmeister et al. (2004b) destacou que a altura de papila pode ser a principal variável de desenvolvimento do epitélio do rúmen, sendo o fator que melhor representa a influência do tratamento no desenvolvimento ruminal. No atual estudo, os animais que receberam mananoligosacarídeos dissolvidos no leite apresentaram papilas ruminais significativamente maiores que os grupos (CON, RES e MFOS) e, ao mesmo tempo, o consumo de alimento sólido não foi alterada. Isso indica que não é apenas a ingestão, composição e estrutura do alimento sólido que afeta o desenvolvimento ruminal, como é amplamente aceito.

O tipo e a composição do alimento líquido podem afetar indiretamente o comprimento das papilas ruminais pela modulação do desenvolvimento do intestino delgado (Gorka et al., 2011). O resultado final da fermentação dos prebióticos é a produção de AGV's (Kleessen et al., 2001) e, no atual estudo, o MOS suplementado aos animais pode ter sido utilizado como energia pelas células garantindo um melhor desenvolvimento e renovação celular do tecido intestinal e ruminal. O aumento de ácidos graxos voláteis disponíveis no lúmen intestinal resultou no aumento dos níveis séricos de peptídeo semelhante a glucagon (GLP – 1 e 2) e consequente aumento do desenvolvimento das papilas ruminais em experimento realizado por Gorka et al. (2009, 2011). Por outro lado, a suplementação de manano-frutoligosacarídeo (grupo MFOS) não alterou o crescimento dos tecidos citados anteriormente, corroborando com Lesmeister et al. (2004b) que não verificaram aumento significativo para altura das papilas ao suplementarem prebióticos a bezerros em fase de aleitamento.

Em ruminantes, as concentrações plasmáticas de grelina aumentam antes das refeições, em resposta ao jejum e à diminuição do enchimento ruminal, enquanto que a leptina tem picos após a ingestão de alimento (Wertz-Lutz et al., 2010; Wylie, 2010). Sendo assim, parece que os hormônios grelina e leptina podem desempenhar um papel no controle da ingestão de alimentos

em ruminantes, como sugerido em roedores (Nakazato et al., 2001). Neste estudo, as concentrações plasmáticas de grelina total e leptina foram mensuradas uma vez em cada período experimental e, provavelmente, devido a diferentes ingestões individuais de alimento sólido em relação à amostragem, não observamos aumentos pré-prandiais de grelina ou redução nos níveis de leptina durante o experimento. Vários fatores, incluindo o tamanho corporal ou a composição corporal, frequência de alimentação, composição da dieta ou quantidade ofertada podem contribuir para as variações de grelina sérica. Como no experimento de Miura et al. (2004) que demonstraram uma diferença nas concentrações de grelina no plasma pré e pós-alimentação de aproximadamente 90 pg em vacas maduras e muito menos variação em bezerros jovens. Sugino et al. (2002) relataram menor flutuação nas concentrações plasmáticas de grelina para ovinos que permitiram o consumo *ad libitum* em comparação com os alimentos ofertados duas a quatro vezes ao dia. A leptina, por sua vez, teve resultados variados com o consumo restrito ou não de alimento em vários estudos (Lee et al., 2006; Delavaud et al., 2002; Amstalden et al., 2000). Brandt et al. (2007) destacaram que esse hormônio foi mais fortemente correlacionado com a gordura corporal do que com variação na alimentação.

O hipotálamo desempenha um papel importante na regulação da homeostase energética e do comportamento alimentar em várias espécies animais (Bayle e Dela-Fera, 198; Bayle e McLaughlin, 1987; Kuenzel et al., 1999). No entanto, nesse experimento, a expressão de GHS-R1a (receptor de grelina), não foi afetada pela restrição (balanço energético negativo), realimentação (balanço energético positivo) ou suplementação de prebióticos (Figura 14). Este resultado é diferente do observado em ratos, onde o jejum aumentou significativamente o nível de mRNA do GHS-R1a no hipotálamo (Kim et al., 2003). Ao mesmo tempo, esses dados corroboram com os resultados de Chen et al. (2007), que também não encontraram diferença ao analisar a expressão dos receptores de grelina no hipotálamo de frangos de corte com 30 dias de idade submetidos a diferentes estratégias de alimentação.

Este estudo demonstrou que a alimentação restrita de leite por bezerros nas primeiras quatro semanas de vida, não prejudica o ganho de peso na fase de realimentação e aumenta a ingestão de alimento sólido. A suplementação de prebiótico não refletiu em melhor desempenho dos animais, no entanto melhorou o desenvolvimento da mucosa intestinal. As alterações metabólicas no soro sanguíneo são mais evidentes durante o período de restrição, mas diminuem depois disso. A restrição de leite ou suplementação de prebiótico não influenciam na concentração sérica de grelina e leptina ou a expressão de GHS-R1a na região paraventricular do hipotálamo.

## **Capítulo IV**

---

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE TAURINA EM BOVINOS  
CONFINADOS E NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ÁCIDOS GRAXOS  
VOLÁTEIS E GASES**

## INTRODUÇÃO

A produção mundial de carne bovina alcançou 62 milhões de toneladas em 2018 e esse montante representa quase 2% a mais que o ano anterior, sendo que os Estados Unidos e o Brasil foram os responsáveis por cerca da metade do crescimento total comparado com o ano anterior (USDA, 2018). Os principais fatores que determinam o preço que os consumidores estão dispostos a pagar pela carne e produtos cárneos são a quantidade ofertada e a qualidade ao longo da linha de distribuição desde o abate, processadores, varejistas e finalmente ao consumidor (O'Neill et al., 2003).

No momento da compra, o primeiro parâmetro avaliado pelos consumidores de carne bovina é a coloração. Isto, porque a cor do produto reflete qualidade, salubridade e os demais atributos, como por exemplo, a maciez e suculência não podem ser testados antes do consumo da carne (Rooyen et al., 2017).

Um problema clássico enfrentado pela indústria de carne fresca é o aparecimento de cortes com as características de carne seca, firme e escura, conhecida como DFD (sigla em inglês que significa dry, firm and dark) (England et al. 2016). A carne com pigmentação escura é rejeitada pelos consumidores porque é visualmente desagradável e seu alto pH permite que as bactérias de deterioração cresçam prontamente, reduzindo assim, seu prazo de validade (Tarrant, 1989). Nos Estados Unidos a preocupação com a qualidade da alimentação levou a um aumento no número das penalidades aplicadas no aparecimento dessas características e, ao mesmo tempo, aumentou o número de pesquisas na tentativa de sanar esse problema nos rebanhos (Wulf et al. 2002).

Historicamente, esse aspecto é atribuído ao baixo teor de glicogênio presente no tecido muscular no momento do abate, geralmente relacionado ao estresse crônico sofrido pelo animal em conjunto com o estresse pré-abate (Page et al., 2001). Estudos anteriores mostraram que a suplementação dietética com aminoácidos pode contribuir para melhorar a qualidade da carne em animais (Ceylan e Aksu, 2011; Ma et al., 2010).

A taurina é um ácido aminosulfônico considerado condicionalmente essencial para maioria dos mamíferos, devido as várias funções metabólicas associadas a esse aminoácido (Huxtable, 1992; Sturman, 1993). Experimentos com suplementação de taurina resultaram em aumento dos níveis plasmáticos de taurina, regulação da função mitocondrial, redução dos níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios e oxidativos, aumento da concentração de glicogênio e dos níveis plasmáticos de adiponectina (You et al. 2013; Murakami et al., 2016).

Takashi et al. (2016), demonstraram que a administração oral de taurina aumentou a disponibilidade e estoque de glicogênio no músculo esquelético de ratos submetidos a exercício. Além disso, os resultados do mesmo estudo indicam que a glicogenólise/glicólise no músculo

esquelético durante a fase pós-exercício seria suprimida pela administração de taurina. Sendo assim, esse estudo buscou incluir taurina na dieta de bovinos confinados e determinar as mudanças no desempenho em confinamento, características de carcaça, incidência e gravidade de abscessos hepáticos, alterações nos metabólitos sanguíneos quando a taurina foi incorporada nas dietas de novilhos em terminação e avaliar mudanças na produção de gás ruminal e ácidos graxos voláteis (AGV's) *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e delineamento experimental

Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo Kansas State University Institutional Animal Care and Use Committee.

O estudo foi conduzido no Beef Center Research da Kansas State University no município de Manhattan no estado do Kansas – EUA. Neste experimento foram utilizados 80 animais com aptidão para produção de carne, selecionados de um grupo de 163 animais, com média de peso inicial de  $507,44 \pm 27,49$  Kg e média de idade de 14 a 16 meses. Os animais foram separados em blocos de acordo com o peso e aleatoriamente distribuídos em cinco tratamentos: 0%; 0,025%; 0,05%; 0,075% e 0,1% de suplementação de taurina na dieta.

Os animais foram alojados em quatro galpões com 20 baias individuais que tinham piso de concreto medindo, aproximadamente,  $8,6 \text{ m}^2$  por animal (Figura 15). Cada baia era parcialmente coberta e equipada com um comedouro de concreto e um bebedouro automático compartilhado entre duas baias adjacentes.

Aproximadamente dois meses antes do início do experimento os animais foram reimplantados com Component<sup>®</sup> TE-200 (20 mg de estradiol, 200 mg acetato de trembolona e 29 mg de tartarato de tilosina, Elanco Animal Health). Além disso, os novilhos foram transferidos para dietas de terminação durante um período de 21 dias usando uma série de dietas de quatro etapas com relações de volumoso: concentrado de 46:54, 33:67, 21:79 e 8:92, durante cinco-cinco-cinco e seis dias, respectivamente. Esse cuidado foi tomado para permitir a adaptação gradual à dieta de alto grão.



Figura 15. Setor experimental Universidade Estadual do Kansas. Os animais eram alojados em baias individuais em galpões semicobertos.  
Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

### Preparação da dieta e alimentação animal

Durante 123 dias, as dietas foram preparadas diariamente e oferecidas *ad libitum* aos animais alojados individualmente. As rações totais consistiram da mistura de 92% de concentrado e 8% de volumoso, que continham (com base na MS) 60,19% de milho floculado, 30% de glúten de milho, 8% de alfafa e 1,81% de pré-mistura de vitaminas e minerais (Tabela 2). Os cochos de alimentação foram avaliados visualmente (leitura de cocho) em cada dia do experimento, aproximadamente às 06:30 h da manhã para corrigir a quantidade de alimento para oferecer a cada animal. A leitura de cocho foi projetada para permitir a permanência de 0,50 Kg de ração remanescente no cocho no momento da avaliação.

Tabela 2. Composição da dieta de animais confinados e suplementados com 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% de taurina na dieta (MS).

Item	Taurina % substrato MS				
	0%	0,025%	0,05%	0,075%	0,1%
Ingrediente, % MS					
Milho floculado	53,82	53,82	53,82	53,82	53,82
Glúten de milho	36,99	36,99	36,99	36,99	36,99
Feno de alfafa	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43
Suplemento vitamínico <sup>1</sup>	1,31	1,285	1,26	1,235	1,21
Calcário	1,45	1,45	1,45	1,45	1,45
Taurina	0	0,025	0,05	0,075	0,1
Composição dos nutrientes % (MS)					
PB	12,88	12,88	12,88	12,88	12,88
FDN	18,60	18,60	18,60	18,60	18,60
Ca	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
P	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
K	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65

<sup>1</sup> Formulado para fornecer 2,970 IU/Kg vitamina A, 20,86 IU/Kg vitamina E, 0,20 mg/Kg cobalto, 27 mg/Kg manganésio, 0,14 mg/Kg selênio, 13,53 mg/g cobre, 40,6 mg/Kg zinco, 0,68 mg/Kg iodo e 40,60 mg/Kg monensina (Rumensin<sup>®</sup>, Elanco Animal Health).

Diariamente, cada ingrediente e misturas vitamínico-minerais da dieta foram individualmente pesados e misturados em um misturador com capacidade de 0,85 m<sup>3</sup> (Davis, Bonner Springs-KS, EUA), depois disto, distribuídos em recipientes de plástico, pesados e levados para as baias por volta das 9:00 h da manhã. Os recipientes eram deixados em frente ao respectivo cocho e, após o término da distribuição, a ração era colocada no choco dos animais com intervalos de tempo mínimo entre os galpões.

Durante o período experimental foram utilizadas duas pré-misturas de vitaminas e minerais, sendo uma sem taurina e outra com 0,07% de taurina. Esses suplementos foram misturados de acordo com o tratamento para obter a ingestão correta de taurina. Nos últimos 32 dias do experimento, o cloridrato de ractopamina (Optaflexx; Elanco Animal Health, Greenfield, IN) foi suplementado a todos os novilhos à taxa de 400 mg·novilho<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>.

## Coleta de dados e amostras

Para determinar o desempenho dos 80 animais do estudo, foram realizadas pesagens individuais nos dias 0, 34, 63, 91 e 123 do experimento, sempre no período da manhã antes do fornecimento da ração. Os alimentos não consumidos foram removidos dos cochos diariamente, pesados e secos em estufa de ar forçado a 105°C por 24 h para determinar o consumo de matéria seca (CMS), tornando possível determinar o consumo real diário de ração. O CMS foi calculado como  $CMS = (\text{total de ração oferecido} \times \% MS) - (\text{total de ração recusada} \times \% MS)$ .

Amostras de sangue foram coletadas de cada animal através de punção venosa jugular nos dias 0, 34, 63 e 91 do estudo. As amostras foram coletadas após assepsia local com solução de clorexidina a 2% (Aspen, Liberty-MO, EUA), utilizando tubo de coleta de sangue de 10 mL sem aditivo para coleta de soro (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) e tubo de coleta de sangue com capacidade de 10 mL (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) contendo 20 mg de oxalato de potássio e 100 mg de fluoreto de sódio como anticoagulante para análise de glicose e lactato. As amostras de sangue foram imediatamente colocadas na geladeira por até 20 min e centrifugadas a 2000 xg por 15 min a 4°C. O soro e o plasma foram transferidos com o uso de pipeta descartáveis para microtubos de plástico de 2 mL e congelados a -20°C até as análises de glicose, lactato, triglicérides e taurina.

Para o abate e coleta de material, aos 123 dias do experimento, os bovinos foram transportados por 451 km até um abatedouro comercial em Holcomb, KS (Tyson Fresh Meats) e abatidos sob inspeção do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Imediatamente após o abate, uma amostra com cerca de 15 g do músculo esternocefálico ventral foi coletada e armazenada em gelo seco para a análise do potencial glicolítico (PG). O peso de carcaça quente para cada novilho e a incidência e gravidade dos abscessos hepáticos foram registrados no dia do abate. Os abscessos hepáticos foram pontuados de acordo com o procedimento descrito por Brown et al. (1975): 0 = sem abscessos, A- = 1 ou 2 abscessos pequenos ou cicatrizes de abscesso, A = 2 a 4 abscessos pequenos e bem organizados e A+ = 1 ou mais abscessos grandes ou ativos com ou sem aderências. Os escores de marmorização foram atribuídos por um inspetor da USDA, enquanto a área do olho de lombo (AOL) e a espessura de gordura da 12ª costela foram coletadas instrumentalmente (VBG 2000; e + v Technology GmbH & Co. KG, Oranienburg, Alemanha) pela equipe do abatedouro. As carcaças foram classificadas de acordo com o grau de marmorio em: Prime (moderado – alto), Choice (leve – moderado), Select (quase inexistente – leve) e Dark (pela presença da coloração escura). A tipificação adotada no experimento foi a mesma adotada oficialmente nos EUA: Yield Grading (YG), que ordena as carcaças do maior (YG 1) para o menor rendimento de desossa esperado (YG 5), em função, principalmente, da espessura de gordura subcutânea (EG) e da área do olho de lombo (AOL).

## Análises laboratoriais

### Triglicerídeos, glicose e lactato

O triglicerídeo sérico foi medido usando um método colorimétrico enzimático (Infinity™ Triglycerides Liquid Stable Reagent, Thermo Scientific - USA) utilizando para leitura o filtro de onda com absorvância de 505 nm (Figura 16).

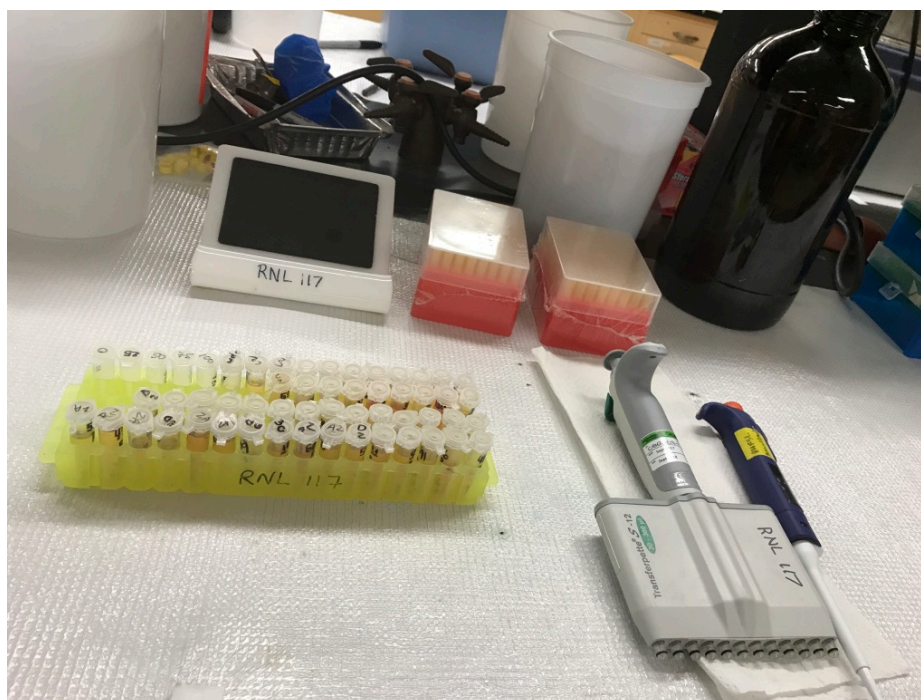


Figura 16. Preparação para análise de metabólitos séricos.  
Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

As amostras para análise de glicose e lactato foram previamente preparadas com ácido perclórico para desproteinização sérica baseada em Daykin et al. (2002). Neste processo, as amostras de soro foram descongeladas e mantidas em gelo, logo depois de descongelar totalmente com algumas agitações durante esse período, uma alíquota de 1 mL foi transferida para novo microtubo plástico e, neste momento, foi adicionado 0,1 mL de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) na concentração de 4 M. A solução foi vigorosamente agitada por cerca de um minuto e, em seguida, colocada no gelo por dez minutos. Na sequência, a suspensão foi centrifugada por cinco minutos a 10.000 xg e o sobrenadante transferido para um novo tubo plástico.

As concentrações de glicose foram determinadas colorimetricamente com glicose oxidase (Wako diagnostics, Mountain View, CA - USA). O ácido láctico foi determinado seguindo o método descrito por Barker e Summerson (1941) onde o ácido láctico é convertido em acetaldeído por tratamento com ácido sulfúrico concentrado, e o acetaldeído determinado pela reação de coloração com p-hidroxidifenil na presença de íons cúpricos.

Para a execução dessa análise, 250  $\mu\text{L}$  da amostra preparada, padrão ou água foram pipetados em tubos de plástico com dimensões 16x125 mm em duplicata. Nesses tubos foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) 20%, 2 mL de água destilada e cerca de 250 mg de hidróxido de cálcio e, logo depois, os tubos foram vigorosamente agitados e uma coloração azul claro foi obtida. A solução foi deixada em repouso por 30 minutos e depois centrifugada por dez minutos em velocidade 1000 xg. Após a centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi transferido para tubos de vidro com dimensões 13x100 mm e, em seguida, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  4%. Os tubos foram levados para capela de exaustão de gases e 3 mL de ácido sulfúrico foram adicionados com agitação imediata após a adição do ácido. Após esse procedimento, os tubos foram colocados em banho maria em temperatura de 100°C por cinco minutos e então transferidos para recipiente que continha água e gelo para resfriamento até uma temperatura de 20°C. Quando resfriados, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de p-hidroxidifenil em cada amostra, seguida de rápida agitação, logo, os tubos foram colocados em banho maria por 30 minutos na temperatura de 30°C. Ao final desse tempo, os tubos foram colocados em água fervente por 90 segundos e depois resfriados em recipiente com água e gelo. Por fim, as amostras foram lidas em absorvância de 560 nm.

#### Taurina

Para determinação dos níveis séricos de taurina, as amostras de soro foram descongeladas, agitadas e 100  $\mu\text{L}$  de soro foram transferidos para um novo microtubo plástico. Nessa alíquota foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de metanol 100% e após seis minutos de incubação, a solução foi centrifugada durante 5 minutos a 8000 xg. O sobrenadante foi transferido e neutralizado com hidróxido de potássio (KOH) 5 % (m/v) até pH 7,5 e o volume completado para 1 mL. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 8000 xg durante cinco minutos para remoção do precipitado formado. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de propileno-náilon 0,33  $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) e transferido para novo tubo. Após este procedimento, a taurina foi determinada por HPLC seguindo os métodos descritos por Wojcik et al. (2010).

Para determinação da concentração real de taurina foi usado um cromatógrafo para HPLC modelo Agilent Technologies 1200 Series, com detector Fluorescence - 333 nm Ex, 450 Em, 418 nm cut off filter H/P 1046<sup>a</sup> e dotado de coluna de troca iônica, Discovery BIO Wide Pore C18 (4,6 mm x 15 cm, 5 nm tamanho de partícula).

A fase móvel consistia em tampão de fosfato de potássio a 1,0 mmol/L, água com grau de pureza de 85% (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) e 15% de acetonitrila (Sigma-Aldrich Chromasolv Plus para HPLC  $\geq 99,9\%$ ), pH 6,8. As soluções de fosfato de potássio a 0,5 mmol/L foram preparadas dissolvendo 17,0 g de fosfato monobásico de potássio para HPLC (Fluka, Buchs,

Suíça) em 250 mL de água para HPLC e 21,8 g de fosfato de potássio anidro dibásico para HPLC (Fluka) em 250 mL de água para HPLC. As soluções de fosfato foram combinadas até o pH atingir 6,8. O fluxo da fase móvel foi estabelecido em 1 mL/min.

Cem microlitros da amostra previamente preparada e filtrada (ou 20 µL de padrão de taurina e 80 µL de metanol) foram adicionados a 150 µL de solução de trabalho e 750 µL de borato de sódio a 0,1 mM. Após exatos 7 min, 20 µL da amostra (ou padrão) foram injetados na máquina de HPLC e medidos com a coluna de HPLC mantida à temperatura ambiente. O padrão foi lido por 22 min, enquanto a amostra foi executada por 60 min.

### Potencial glicolítico (PG)

Resumidamente, uma amostra de músculo congelado (100 - 160 mg) foi transferida para microtubos de plástico e foi adicionada água destilada na proporção 1:9 do peso da amostra. Para completa homogeneização do tecido foi usado o homegeneizador de tecido (Tissuelyser II, Quiagen, Alemanha) programado para agitar as amostras 25 vezes/segundo por um período de cinco minutos. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 xg por 3 minutos. Uma alíquota de 400 µL do sobrenadante foi transferida para novo tubo, foi acrescido 50 µL de HClO<sub>4</sub> na concentração 4M e após aproximadamente dez minutos a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 10.000 xg. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo plástico, a solução foi neutralizada com KOH (30%) e congelada até a determinação do conteúdo de glicogênio e lactato.

A determinação do glicogênio foi conduzida conforme descrito por Zhang et al. (2009). O glicogênio na fração sobrenadante foi hidrolisado enzimaticamente em glicose por incubação com 2,5 µL amiloglucosidase em tampão acetato (pH 4,8) a 55°C por duas horas. Após a incubação, a fração sobrenadante foi neutralizada com 10 M KOH. A glicose foi determinada colorimetricamente com um kit comercial de glicose oxidase (Wako diagnostics, Mountain View, CA - USA). As concentrações de glicose 6-fosfato e glicose não foram determinadas individualmente e foram incluídas na determinação de glicogênio. O lactato foi determinado pela mesma metodologia descrita anteriormente.

O PG foi calculado como a soma de  $2x [\text{glicogênio}] + [\text{lactato}]$  (Monin e Sellier, 1985).

### Análise estatística

O estudo foi conduzido como um delineamento de blocos completamente aleatórios por faixa de pesos. O desempenho em confinamento, análises sanguíneas, os dados não-categorizados de carcaça e os dados do experimento *in vitro* foram analisados utilizando a análise de variância e

regressão pelo pacote ExpDes.pt do programa R versão 3.5.2. Dados de carcaça binomial foram analisados utilizando os modelos lineares generalizados usando a função glm do programa R versão 3.5.2 As diferenças entre as médias foram declaradas significativas ao nível  $P \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### Desempenho animal

O desempenho dos animais durante os 123 dias em confinamento está demonstrado na Tabela 3. O peso corporal final, o ganho médio diário (GMD) e o consumo de matéria seca (CMS) não foram afetados pela suplementação de taurina ( $P > 0,05$ ).

Tabela 3. Performance de animais em confinamento alimentados com suplementação 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% de taurina na dieta (MS).

Item	Taurina % substrato MS					SEM	P-valor
	0%	0,025%	0,05%	0,075%	0,1%		
Peso inicial, Kg	507,40	507,32	507,72	507,29	507,49	0,73	0,15
Peso final <sup>1</sup> , Kg	639,98	644,20	638,08	645,83	654,81	8,08	0,22
GMD, Kg /d	1,18	1,22	1,16	1,24	1,31	0,07	0,22
CMS, Kg /d	9,65	9,58	9,28	9,76	9,77	0,28	0,11

<sup>1</sup>Peso corporal final calculado como: Peso corporal x 0,96.

### Característica de carcaça

As características de carcaça ao final do experimento com suplementação de taurina na dieta estão presentes na Tabela 4. Neste experimento, nenhum dos parâmetros analisados para características de carcaça foram afetados pela suplementação de taurina por 123 dias.

Tabela 4. Características de carcaça de novilhos suplementados com 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% de taurina na dieta (MS).

Item	Taurina % substrato MS <sup>1</sup>					SEM	P-valor
	0%	0,025%	0,05%	0,075%	0,1%		
Peso de carcaça quente, Kg	418,41	424,19	412,19	423,68	419,96	5,82	0,86
Rendimento de carcaça, %	65,37	65,88	64,54	65,57	64,56	0,00	0,11
AOL <sup>1</sup> ,cm <sup>2</sup>	91,8	94,5	91,0	95,1	92,1	2,66	0,90
Gordura subcutânea, mm	16,2	16,0	16,0	14,2	17,0	1,3	0,95
Marmoreio <sup>2</sup>	516	438	460	432	432	23,5	0,06
USDA Choice, %	87,50	62,50	81,25	93,75	56,25	0,01	0,37
USDA Prime, %	12,50	0,00	6,25	0,00	6,25	0,00	0,48
USDA Select, %	0,00	37,50	12,50	6,25	31,25	0,01	0,31
USDA Dark, %	0,00	0,00	0,00	0,00	6,25	0,00	0,16
USDA Rendimento							
Yield grade 1, %	0,00	6,25	6,25	6,25	0,00	0,00	1,00
Yield grade 2, %	31,25	37,50	18,75	31,25	37,50	0,01	0,87
Yield grade 3, %	43,75	25,00	43,75	43,75	31,25	0,01	0,87
Yield grade 4, %	18,75	31,25	25,00	18,75	18,75	0,01	0,70
Yield grade 5, %	6,25	0,00	6,25	0,00	12,50	0,00	0,48
Abscesso no fígado <sup>3</sup>							
Total, %	87,50	81,25	81,25	93,75	81,25	0,01	1,00
Leve, %	6,25	18,75	12,50	6,25	12,50	0,01	1,00
Moderado, %	0,00	0,00	0,00	0,00	6,25	0,00	0,15
Severo, %	6,25	0,00	6,25	0,00	0,00	0,00	0,32
Potencial Glicolítico <sup>4</sup>	47,16	46,48	47,60	46,88	47,01	6,75	0,36

A taurina foi suplementada até o abate. Após 36 h de refrigeração, a AOL<sup>1</sup> (área de olho de lombo), espessura de gordura, grau de rendimento USDA (yield grade) foram obtidos a partir de imagens de câmeras (VBG 2000, E + V Technology GmbH & Co. KG, Oranienburg, Alemanha) fornecidas pelo abatedouro.

<sup>2</sup> Pontuação de marmorização determinada pelo sistema de imagens por computador (VBG 2000, E + V Technology GmbH & Co. KG, Oranienburg, Alemanha): 300 a 399 = Leve; 400 a 499 = Pequena; 500 a 599 = Modesta.

<sup>3</sup> Brown et al. (1975).

<sup>4</sup> O potencial glicolítico foi determinado de acordo com a fórmula proposta por Monin e Sellier (1985) da seguinte forma: GP = 2 × glicogênio + lactato.

## Perfil sérico bioquímico

Os níveis de triglicerídeos, glicose, lactato e taurina se encontram na Tabela 5. Nenhuma diferença foi encontrada entre os parâmetros analisados após 123 dias de suplementação de taurina em bovinos no sistema de confinamento.

Tabela 5. Concentração sérica de triglicerídeos (mg/dL), lactato (mg/dL), glicose (mg/dL) e taurina (nmol/mL) nos dias 0 e 91, de novilhos confinados alimentados com 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% de taurina na dieta (MS).

Item	Taurina % substrato MS <sup>1</sup>													
	d 0							d 91						
	0	0,025	0,05	0,075	0,1	SEM	P-valor	0	0,025	0,05	0,075	0,1	SEM	P-valor
Triglicerídeo	14,99	17,74	16,18	19,32	17,92	1,33	0,205	17,96	17,93	17,50	14,34	16,18	1,14	0,155
Lactato	45,56	34,63	36,27	39,25	31,64	6,32	0,604	55,39	50,27	53,83	54,31	48,50	6,88	0,950
Glicose	99,73 <sup>a</sup>	90,30 <sup>ab</sup>	86,14 <sup>b</sup>	89,59 <sup>b</sup>	86,83 <sup>b</sup>	2,32	0,001	96,46	85,40	96,74	88,12	86,07	4,98	0,236
Taurina	121,56	137,05	113,19	112,88	115,95	8,46	0,248	127,54	107,50	99,03	115,77	117,08	7,45	0,095

<sup>1</sup>Taurina foi suplementada até o abate.

## In vitro

Os resultados do experimento in vitro estão apresentados na Tabela 6. A produção de gás, os ácidos graxos voláteis (AGV) e a digestibilidade não foram alteradas entre os grupos experimentais. O pH teve efeito linear negativo ( $P < 0,05$ ) para a suplementação de taurina.

Tabela 6. Efeito da adição de taurina<sup>1</sup> no sistema in vitro de produção de gás, produção de AGV's, pH e DMIV após 24 h de fermentação utilizando um sistema de produção de gás da Ankon.

Item	Taurine % substrato MS <sup>2</sup>					SEM	P-valor
	0%	0,025%	0,05%	0,075%	0,1%		
Produção de gás, bar	43,58	41,04	41,08	39,46	43,24	0,78	0,50
AGV's, mmol/g	4396,70	4348,60	4206,07	4176,38	4176,44	164,15	0,24
Acetato, mmol/g	1774,02	1834,64	1735,47	1743,48	1638,24	68,76	0,09
Propionato, mmol/g	2214,57	2121,21	2124,45	2162,67	2109,48	72,54	0,40
Butirato, mmol/g	349,10	335,15	295,46	235,05	265,32	45,91	0,15
Valerato, mmol/g	48,79	44,77	42,77	39,96	47,50	5,62	0,82
pH*	5,74	5,60	5,65	5,62	5,59	0,03	0,006
DIVMS <sup>3</sup> , %	58,6	56,3	57,1	57,5	56,4	0,82	0,17

<sup>1</sup>Os níveis de taurina 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1% (substrato MS) foram adicionados ao tampão de Mc Daugall's, combinado com 10 mL de conteúdo ruminal.

<sup>2</sup>O substrato utilizado para cada frasco foi de 3 g de milho moído utilizando uma peneira de 1 mm.

\* Efeito linear ( $P < 0,01$ ),  $y = - 0,011x + 5,76$

<sup>3</sup>Digestibilidade in vitro da matéria seca

## DISCUSSÃO

A suplementação de taurina por 123 dias não melhorou o ganho de peso ou a performance dos animais nesse estudo. No entanto, foi possível observar um aumento no peso final, que foi 14,83 Kg maior no grupo com 0,1% de taurina do que no grupo com 0% de suplementação com taurina. Lu et al. (2018) não relataram efeitos significativos no desempenho de frangos alimentados com a dieta basal suplementada com 5 g de taurina/Kg de ração e submetidos a estresse térmico constante. Vários estudos em diferentes tamanhos e espécies de peixes e crustáceos demonstraram os efeitos benéficos da suplementação de taurina na dieta sobre o crescimento, consumo de ração e eficiência de utilização de alimentos (Park et al., 2002; Al-Feky et al., 2016; Dong et al. 2018). Abdel-Tawwab & Monier (2017) relataram melhor eficiência

alimentar e melhor ganho de peso em carpa comum suplementada até 15 g de taurina /kg de dieta, o que foi explicado pelo aumento na síntese proteica associada a elevação das atividades de amilase intestinal, lipase e protease. A importância da taurina no ganho de peso também foi estudada por Ito et al. (2015) usando camundongos knockout para transportadores de taurina e, neste experimento, a depleção de taurina causou baixo peso corporal e diminuiu a massa muscular esquelética. Os estudos sobre os efeitos da suplementação de taurina em animais em crescimento estão disponíveis principalmente para gatos e peixes, e nenhum estudo foi publicado sobre seus efeitos em bovinos em fase de terminação.

A taurina é um aminoácido condicionalmente essencial encontrado em alta concentração em todos os tecidos animais, não é incorporado nas proteínas (Huxtable, 1992), pode afetar o peso do músculo esquelético e o tamanho das células musculares (Ito et al., 2014). A suplementação de taurina para bovinos de corte, nesse estudo, não alterou significativamente o peso de carcaça quente, rendimento de carcaça, área de olho de lombo, espessura de gordura subcutânea na 12<sup>a</sup> costela, marmoreio, escore de abscesso hepático ou graus de qualidade USDA. Da mesma forma, Alzawqari et al. (2016) relataram que a suplementação de taurina não afetou os parâmetros de carcaça de frangos de corte aos 42 dias de idade. Por outro lado, Lu et al. (2018) mostraram que a proporção de músculo do peito de frangos foi significativamente maior no grupo suplementados com 5 g/Kg de taurina na ração após 7 e 14 dias de exposição a estresse térmico, porém a suplementação com taurina não afetou a carcaça.

O potencial glicolítico (GP) é definido como a quantidade de compostos glicídicos suscetíveis à conversão em ácido láctico durante a fase post-mortem (Monin e Sellier, 1985). Discordando com nossos resultados, administração de taurina foi capaz de aumentar a concentração de glicogênio e a repleção no músculo esquelético dos camundongos após a fase de exercício, no entanto, o mecanismo pelo qual a taurina oral aumenta o glicogênio não foi totalmente determinado (Takahashi et al., 2014; Takahashi et al., 2016). Silva et al. (2014) realizaram um experimento com 21 homens na fase adulta separados em dois grupos: suplementados com 50 mg de taurina/kg de peso ou não suplementados com taurina e após 14 dias de suplementação houve melhora do desempenho e redução do dano muscular e do estresse oxidativo.

As concentrações de glicose e lactato estão associadas ao metabolismo de carboidratos e lipídios e são importantes componentes do metabolismo celular (Van Bibber-Krueger et al., 2016). No presente estudo, a glicose no início do experimento estava mais baixa em novilhos suplementados com 0,5, 0,75 e 1% de taurina comparado ao grupo 0%. No entanto, os valores estão de acordo com o resultado do estudo de Huntington (1983) que demonstrou uma variação de 75 a 100 mg/dL para glicose em dois experimentos com novilhos Hereford x Angus. O lactato foi semelhante entre os tratamentos ao longo do experimento. De Carvalho et al. (2017) testaram os

efeitos da taurina no desempenho atlético de nove nadadores competitivos que tomaram 6 g de suplementos de taurina ou placebo 120 minutos antes do desempenho. No final, o lactato sanguíneo não apresentou diferenças significativas após realizar dois nados crawl de 400 m.

Estudos anteriores (Leao et al., 2018; Tenner et al., 2003; Park et al., 1998) demonstraram que a adição de taurina na dieta reduziu significativamente o nível plasmático de triglicérides, mas os mecanismos que explicam essa redução ainda não estão claros nesse momento. O nível sérico de triglicérides no presente estudo não foi afetado pela suplementação de taurina ( $P > 0,05$ ). Yan et al. (1993) mostraram que ratos suplementados com 1% de taurina em água corrente não afetaram o triglicerídeo plasmático. No entanto, nossos resultados contradizem os relatos de Park et al. (1998) mostrando aumento nos triglicerídeos do plasma em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol e suplementada com 15 g/Kg de taurina na dieta. Além disso, os autores relataram que o efeito da suplementação de taurina sobre os triglicerídeos plasmáticos varia dependendo da espécie de animal utilizado, composição das dietas e duração da suplementação de taurina.

O nível sérico de taurina não foi modificado entre os grupos após 123 dias de suplementação de taurina. O fato de a taurina usada neste experimento não ter sido protegida da digestão ruminal pode explicar a ocorrência de nenhum efeito sobre a taurina plasmática ter sido observada. Chalupa (1976) relatou que os aminoácidos livres não poderiam sobreviver à degradação ruminal. Em experimentos com ratos, Park et al. (1999) e Tenner et al. (2003) observaram um aumento nas concentrações plasmáticas de taurina quando a suplementação de taurina foi aumentada na dieta de ratos.

A taurina desprotegida usada neste experimento não alterou a produção de gás, a produção de AGV e o DIVMS, como mostrado na Tabela 4. Yu et al. (2016) encontraram um efeito da taurina natural e sintética na microbiota intestinal em camundongos, além disso, a administração de 165 mg/Kg de taurina natural aumentou a produção de AGV's. Sasaki et al. (2017), não observaram diferenças para a produção de AGV's e composição de espécies bacterianas em vasos inoculados com amostras fecais de 8 humanos saudáveis e suplementados com taurina. As diferenças observadas entre os estudos pode ser reflexo da diferença nas espécies animais e da proporção da taurina suplementada.

O pH ruminal tem profundo efeito nas populações microbianas e nos produtos de fermentação (Nagaraja e Titgemeyer, 2007). Este parâmetro pode variar de aproximadamente de 8 a 5 e, em pH ácido, a produção de AGVs pode ser reduzida (Ha et al., 1983; Nagaraja e Titgemeyer, 2007). No presente estudo, após 24 horas de fermentação o pH teve uma redução linear ( $P < 0,05$ ). O pH mais baixo foi encontrado no grupo suplementado com 1% de taurina (5,59), porém todos os grupos experimentais apresentaram pH em torno de 5,5. Este valor é considerado o ponto crítico, pois há um risco crescente de acidose láctica (Owens et al., 1998). Yu et al. (2016) suplementaram taurina natural e sintética para camundongos e observaram que a

taurina pode ter efeito na microbiota intestinal aumentando a abundância de bactérias do gênero Lactobacillales e, conseqüentemente, aumentar a produção de ácido láctico. A contribuição relativa de cada gênero ou espécie de microrganismo para a atividade global amilolítica, produção de ácido láctico e AGV não é totalmente conhecida (Nagaraja e Titgemeyer, 2007).

Este estudo demonstrou que a suplementação de taurina para animais em fase de terminação em sistema de confinamento não alterou a performance, características de carcaça, padrões séricos bioquímicos, glicogênio muscular, fermentação ruminal e produção de AGV's. enquanto que o pH ruminal apresentou redução linear com a suplementação da taurina.

## **CONCLUSÃO GERAL**

No sistema de produção de bovinos o uso de técnicas que auxiliem no melhor desenvolvimento e desempenho dos animais é expandido para todas as fases de criação. Nesses dois estudos, analisamos a aplicação de estratégias alimentares e seus benefícios nas fases inicial (aleitamento) e final (terminação) de bovinos. Na fase inicial, os bezerros precisam se preparar para o desmame, muitas vezes precoce, e todas as mudanças fisiológicas causadas nesse período. O primeiro estudo desenvolvido avaliou os efeitos da suplementação de prebióticos e da restrição de leite nessa fase do crescimento. Foi encontrado que os animais que passaram pela restrição de 50% do leite fornecido ao grupo controle, por um período de 28 dias, tiveram pior desempenho nessa fase. Entretanto, quando a quantidade de leite oferecida foi restabelecida no período 2, os mesmos animais apresentaram ganho compensatório e maior consumo de alimento sólido. A restrição não alterou a histomorfometria das papilas ruminais e da mucosa intestinal. Os bezerros que receberam suplementação de mananoligossacarídeo tiveram maior comprimento de papila ruminal e altura de vilosidade do jejuno quando comparados aos animais do grupo controle e restrito. Nenhuma alteração foi encontrada entre os tratamentos para os parâmetros séricos bioquímicos analisados, grelina e leptina sérica e expressão de receptores de grelina na região paraventricular do hipotálamo. No segundo experimento, na fase de terminação de bovinos suplementados com taurina não foi constatado modificações no desempenho, características de carcaça, metabólitos sanguíneos, potencial glicolítico no músculo e na fermentação e produção de gases em sistema *in vitro*. Foi verificado um efeito linear para o pH no experimento *in vitro* e o grupo que recebeu a maior concentração de taurina na dieta apresentou menor pH. Sendo assim, podemos concluir que na fase inicial, o ganho de peso pode ser compensado em até 30 dias após um igual período de restrição moderada de leite; a suplementação de mananoligossacarídeo melhora o desenvolvimento das mucosas intestinais e ruminal e, com isso, pode preparar os animais para fase de desaleitamento e a suplementação de manano-frutoligossacarídeo não alterou os parâmetros avaliados. Enquanto que, na fase final de bovinos, a suplementação de taurina desprotegida da fermentação ruminal não modificou a performance, características de carcaça, padrões séricos bioquímicos, glicogênio muscular, fermentação ruminal e produção de AGV's. enquanto que o pH ruminal apresentou redução linear com a suplementação da taurina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAFEEZ, H. M., SALEH, E. S. E., TAWFEEK, S. S., YOUSSEF, I. M. I., ABDEL-DAIM, A. S. A. 2017. Effects of probiotic, prebiotic and synbiotic with and without feed restriction on performance, hematological indices and carcass characteristics of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 30(5):672-682.

ABDEL-TAWWAB, M., MONIER, M. N. 2017. Stimulatory effect of dietary taurine on growth performance, digestive enzymes activity, antioxidant capacity, and tolerance of common carp, *Cyprinus carpio* L., fry to salinity stress. *Fish Physiological Biochemistry*. 44(2):639-649.

ADZITEY, F., NURUL, H. 2011. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences - a mini review. *International Food Research Journal*. 18: 11- 20.

AFSHARMANESH, M., LOTFI, M., MEHDIPOUR, Z. 2016. Effects of wet feeding and early feed restriction on blood parameters and growth performance of broiler chickens. *Animal Nutrition*. 2(3):168-172.

AGASTIN, A., NAVES, M., FARANT, A., GODARD, X., BOCAG, B., ALEXANDRE, G., BOVAL, M. 2013. Effects of feeding system and slaughter age on the growth and carcass characteristics of tropical-breed steers1. *Journal of Animal Science*. 91(8):3997-4006.

ALVES, D.D. 2003. Crescimento compensatório em bovinos de corte. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 98: 61-67.

AL-FEKY, S. S. A., EL-SAYED, A. F., EZZAT, A. A. 2016. Dietary taurine enhances growth and feed utilization in larval Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) fed soybean meal-based diets. *Aquaculture Nutrition*. 22(2):457-464.

ALONSO, M.D., LOMAKO, J., LOMAKO, W.M. 1995. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J*. 9: 1126 -1137.

ALZAWQARI, M. H., AL-BAADANI, H. H., ALHDARY, I. B., AL-OWAIMER, A. N., ABUDABOS, A. M. 2016. Effect of taurine and bile acid supplementation and their interaction on performance, serum components, ileal viscosity and carcass characteristics of broiler chicken. *South African Journal of Animal Science*. 46: 448-457.

AMSTALDEN, M., GARCIA, M. R., WILLIAMS, S. W., STANKO, R. L., NIZIELSKI, S. E., MORRISON, C. D., WILLIAMS, G. L. 2000. Leptin Gene Expression, Circulating Leptin, and Luteinizing Hormone Pulsatility Are Acutely Responsive to Short-Term Fasting in Prepubertal Heifers: Relationships to Circulating Insulin and Insulin-Like Growth Factor II. *Biology of Reproduction*. 63(1):127-133.

ANDERSON, K., NAGARAJA, J. 1987. Ruminant metabolic development in calves weaned conventionally or early. *Journal of Dairy Science*. 70:1000-1005.

- ANDERSON, C.M., HOWARD, A., WALTERS, J.R., GANAPATHY, V., THWAITES, D.T. 2009. Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H<sup>(+)</sup>-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na<sup>(+)</sup>- and Cl<sup>(-)</sup>-dependent TauT (SLC6A6). *Journal of Physiology*. 587: 731–744.
- ANDERSON, K.L, NAGARAJA, T.G., MORRILL, J. L., AVERY, T. B., GALITZER, S. J., BOYER, J. E. 1987. Ruminal microbial development in conventionally or early-weaned calves. *Journal of Animal Science*. 64, 1215–1226.
- ARVANITTOYANNIS, I.S.; HOUWELINGEN KOUKALIAROGLOU, M.V. 2005. Functional foods: a survey of health, claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45: 385-404.
- ARELLANES-LICEA, E., DÍAZ-MUÑOZ, M. 2012. Ritmicidad biológica de la secreción de Ghrelina, GH e IGF-I, y su regulación por la Alimentación. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 20 (2):74-87.
- AOAC (2000) ‘Official methods of analysis.’ 17th edn. (Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC).
- BAILE, C. A., MCLAUGHLIN, C. L. 1981. Mechanisms Controlling Feed Intake in Ruminants: A Review. *Journal of Animal Science*. 64(3):915–922.
- BAILE, C. A., DELLA-FERA, M. A. 1987. Nature of hunger and satiety control systems in ruminants. *Journal of Dairy Science*. 64:1140-1152.
- BAINTNER K. 2002. Vacuolation in the young. In: *Biology of the Intestine in Growing Animals*, R. Zabielski, P.C. Gregory, B. Westrom (eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 55-110.
- BALDWIN VI, R. L; McLEOD, K. R; KLOTZ, J. L. et al. 2004. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *Journal of Dairy Science*. 87: 55-65.
- BANKS, W. A., TSCHOP, M., ROBINSON, S.M., HEIMAN, M.L. 2002. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 302: 822–827.
- BARCELO, A; CLAUSTRE, J; MORO, F; et al. 2000. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut*. 46:218–224.
- BAKER, S. B AND W. H. SUMMERSON. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *Journal of Biological Chemistry*. 138:535-554.
- BATTERHAM, R. L., FFYTCH, D. H., ROSENTHAL, J.M., ZELAYA, F. O., BARKER, G. J., WITHERS, D. J., WILLIAMS, S. C. 2007. PYY modulation of cortical and hypothalamic brain areas predicts feeding behaviour in humans. *Nature*. 450(1766):106-9.
- BEHARKA, A.A., NAGARAJA, T.G., MORRILL, J.L. 1998. 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.
- BENDALL, J. R., TAYLOR, A. A. 1972. Consumption of oxygen by the muscles of beef animals and related species. II. Consumption of oxygen by post-rigor muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 23(6):707–719.

- BERGE, P. 1991. Long-term effects of feeding during calthood on subsequent performance in beef cattle (a review). *Livestock Production Science*. 28(3):179-201.
- BERG, R. D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*. 4:430-435.
- BLOWEY, R. 1996. Calf feeding practices in relation to calf health. *Agri-Practice*. 17(10): 20-22.
- BRANDT, M. M., KEISLER, D. H., MEYER, D. L., SCHMIDT, T. B., BERG, E. P. 2007. Serum hormone concentrations relative to carcass composition of a random allotment of commercial – fed beef cattle. *Journal of Animal Science*. 85:267–275.
- BROWN, H., BING, R. F., GRUETER, H. P., MCASKILL, J. W., COOLEY, C. O., RATHMACHER, R. P. 1975. Tylosin and chlortetracycline for the prevention of liver abscesses, improved weight gains and feed efficiency in feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 40:207–213.
- BROOKS, J. C., ALVARADO, M., STEPHENS, T. P., KELLERMEIER, J. D., TITTOR, A. W., MILLER, M. F., BRASHEARS, M. M. 2008. Spoilage and safety characteristics of ground beef packaged in traditional and modified atmosphere packages. *Journal of Food Protection*. 71(2): 293–301.
- BÜHLER, C., HAMMON, H., ROSSI, G. L., BLUM, J. W. 1998. 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.
- CANI, P. D., DEWEVER, C., DELZENNE, N. M. 2004. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *British Journal of Nutrition*. 92: 521- 526.
- CANI, P. D., LECOURT, E., DEWULF, E. M., SOHET, F. M., PACHIKIAN, B.D., NASLAIN, D. et al. 2009. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *American Journal of Clinical Nutrition*. 90:1236-43.
- CARVALHO, P. A., SANCHEZ, L. M. B., VIEGAS, J., VELHO, J. P., JAURIS, G. C., RODRIGUES, M. B. 2003. Desenvolvimento de estômago de bezerros holandeses desaleitados precocemente. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32(6): 1461- 1468.
- CASSADY, J. M., MADDOCK, T. D., DICOSTANZO, A., LAMB, G. C. 2009. Initial body condition score affects hormone and metabolite response to nutritional restriction and repletion in yearling postpubertal beef heifers. *Journal of Animal Science*. 87:2262–2273.
- CAVALCANTI, L. F. L., BORGES, I., SILVA, V. L., SILVA, F. V., SA, H. C. M., MACIEL, I. C. F., PAULA, F. A. P., COSTA, E. H. O. 2014. Morfologia dos pré-estômagos e de papilas ruminais de cordeiras Santa Inês em crescimento submetidas a dois planos nutricionais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34(4): 374-380.
- CEYLAN, S., AKSU, M. İ. 2011. Free amino acids profile and quantities of “sirt”, “bohca” and “sekerpare” pastirma, dry cured meat products. *Journal of Science Food Agriculture*. 91(5):956–962.

CERVIERI, R. C.; ARRIGONI, M. B.; CHARDULO, L. A. L.; SILVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, H. N.; MARTINS, C. L. 2005. 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.

CHALUPA, W. 1976. Degradation of amino acids by the mixed rumen microbial population. *Journal of Animal Science*. 43:828-834.

CHEN, L.L., JIANG, Q.Y., ZHU, X.T., SHU, G., BIN, Y.F., WANG, X.Q., GAO, P., ZHANG, Y.L. 2007. Ghrelin ligand–receptor mRNA expression in hypothalamus, proventriculus and liver of chicken (*Gallus gallus domesticus*): studies on ontogeny and feeding condition. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 147, 893–902.

CHEN, W., GUO, J. X., CHANG, P. 2012. The effect of taurine on cholesterol metabolism. *Molecular Nutrition of Food Research*. 56: 681-690.

CHEN, W., GUO, J. X., ZHANG, Y., ZHANG, J. 2016. The beneficial effects of taurine in preventing metabolic syndrome. *Food and Function: review*. 7: 1849-63.

CHOI, Y.J.; HAN, I.K.; WOO, J.H.; et al. 1997. Compensatory growth in dairy heifers: the effect of a compensatory growth pattern on growth rate and lactation performance. *Journal of Dairy Science*.80: 519-524.

CHUANG, J.C., SAKATA, I., KOHNO, D., PERELLO, M., OSBORNE-LAWRENCE, S., REPA, J. J. 2011. Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Molecular Endocrinology*. 25:1600–161.

CONTE-CAMERINO, D., TRICARICO, D., PIERNO, S., DESAPHY, J. F, et al. 2004. Taurine and skeletal muscle disorders. *Neurochemical Research*. 1:135-142.

COWLEY, M. A., SMITH, R. G., DIANO, S., TSCHOP, M., PRONCHUK, N., GROVE, K. L., STRASBURGER, C. J., BIDLINGMAIER, M., ESTERMAN, M., HEIMAN, M. L., GARCIA-SEGURA, L. M., NILLNI, E. A., MENDEZ, P., LOW, M. J., SOTONYI, P., FRIEDMAN, J. M., LIU, H., PINTO, S., COLMERS, W. F., CONE, R. D., HORVATH, T. L. 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 37: 649–661.

CRISPIM, C. A; ZALCMAN, I; DÁTILLO, M; PADILHA, H. G; TUFIK, S; MELLO, M. T. 2007. Relação entre Sono e Obesidade: uma Revisão da Literatura Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. 51: 1041-1049.

CUMMINGS, J. H., MACFARLANE, G. T. 2002. Gastrointestinal effects of prebiotics. *The British Journal of Nutrition*. 87:145-151.

CURTIS, G., MCGREGOR ARGO, C., JONES, D., GROVE-WHITE, D. 2018. The impact of early life nutrition and housing on growth and reproduction in dairy cattle. *PloS one*.13(2): e0191687.

DATE, Y., KOJIMA, M., HOSODA, H., SAWAGUCHI, A., MONDAL, M.S., SUGANUMA, T., MATSUKURA, S., KANGAWA, K., NAKAZATO, M. 2000. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 141: 4255–4261.

- DAYKIN, C. A., FOXALL, P. J. D., CONNOR, S. C., LINDON, J. C., NICHOLSON, J. K. 2002. The Comparison of Plasma Deproteinization Methods for the Detection of Low-Molecular-Weight Metabolites by  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 304: 220-230.
- DE CARVALHO, F. G., BARBIERI, R. A., CARVALHO, M. B., DATO, C. C., CAMPOS, E. Z., GOBBI, R. B., PAPOTI, M., SILVA, A. S. R., DE FREITAS, E. C. 2017. Taurine supplementation can increase lipolysis and affect the contribution of energy systems during front crawl maximal effort. *Amino Acids*. 50(1):189–198.
- DELAVAUD, C., FERLAY, A., FAULCONNIER, Y., BOCQUIER, F., KANN, G., & CHILLIARD, Y. 2002. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *Journal of Animal Science*. 80(5):1317–1328.
- DE LUCCA, A., PIERNO, S., CAMERINO, D. C. 2015. Taurine: the appeal of a safe amino acid for skeletal muscle disorders. *Journal of Translational Medicine*. 13: 243-261.
- DELZENNE, N. M., CANI, P. D., NEYRINCK, A. M. 2007. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *Journal of Nutrition*. 137(11 Suppl): 2547S-51S.
- DEZAKI, K., KAKEI, M. A., YADA, T. 2007. Ghrelin Uses  $G\alpha_{i2}$  and Activates Voltage-Dependent  $K^+$  Channels to Attenuate Glucose-Induced  $Ca^{2+}$  Signaling and Insulin Release in Islet  $\beta$ -Cells. *Diabetes*. 56 (9): 2319-2327.
- DONAVAN, D.C; FRANKLIN, S.T; CHASE, C.C.L., HIPPEN, A.R., 2002. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or enteroguard. *Journal of Dairy Science*. 85:947–950.
- DONG, J., R. CHENG, Y. YANG, Y. ZHAO, G. WU, R. ZHANG, X. ZHU, L. LI AND X. LI. 2018. Effects of dietary taurine on growth, non-specific immunity, anti-oxidative properties and gut immunity in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol*. Accepted manuscript. doi: 10.1016/j.fsi.2018.08.029.
- DRACKLEY, J. K. Calf nutrition from birth to breeding. 2008. *Vet. Clin. Food Anim*. 24:55-86.
- DUCKETT, S. K., J. P. S. NEEL, J. P. FONTENOT, W. M. CLAPHAM, W. M. 2009. Effects of winter stocker growth rate and finishing system on: III. Tissue proximate, fatty acid, vitamin, and cholesterol content. *Journal of Animal Science*. 87:2961–2970.
- DUNNE, P. G., F. P. O'MARA, F. P. MONAHAN, A. P. MOLONES. 2006. Changes in colour characteristics and pigmentation of subcutaneous adipose tissue and M. longissimus dorsi of heifers fed grass, grass silage, or concentrate-based diets. *Meat Science*. 74:231–241.
- EGLAND, E. M., MATARNEH, S. K., OLIVER, A. A. SCHEFFLER, T. L., SHI, H. AND GERRARD, D. E. 2016. Excess glycogen does not resolve high ultimate pH of oxidative muscle. *Meat Science*. 114: 95–102.
- ESTERHUIZEN, J., GROENEWALD, B., STRYDOM, P. E., HUGO, A. 2008. The performance and meat quality of Bonsmara steers raised in a feedlot, on conventional pastures or on organic pastures. *South African Journal of Animal Science*. 38:303-314.
- FAGLIARI, J. J., SANTANA, A. E., LUCAS, F. A., CAMPUS FILHO, E., CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa

- (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.253-262, 1998.
- FERGUNSON, D. M., GERRARD, D. E. 2014 Regulation of post-mortem glycolysis in ruminant muscle. *Animal Production Science*. 54:464 – 481.
- FLAGA, J., P. GÓRKA, Z. M. KOWALSKI, U. KACZOR, P. PIETRZAK, R. ZABIELSKI. 2011. Insulin-like growth factors 1 and 2 (IGF-1 and IGF-2) mRNA levels in relation to the gastrointestinal tract (GIT) development in newborn calves. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 14:605–613.
- FOOTE, A. P., HALES, K. E., LENTS, C. A., FREETLY, H. C. 2014. Association of circulating active and total ghrelin concentrations with dry matter intake, growth, and carcass characteristics of finishing beef cattle. *Journal of Animal Science*. 92: 5651- 5658.
- FORSYTH, I.A. 1996. The insulin-like growth factor and epidermal growth factor families in mammary cell growth in ruminants: action and interaction with hormones. *Journal of Dairy Science*.79: 1085-1096, 1996.
- FRANKLIN, S. T., NEWMAN, M. C., NEWMAN, K. E., MEEK, M. I. 2005. Immune parameters of dry cow fed mannan oligosaccharide and subsequent transfer of immunity to calves. *Journal of Dairy Science*. 88: 766-775.
- GEARY N. 2004. Endocrine controls of eating: CCK, leptin, and ghrelin. *Physiology Behavior*. 81(5):719-33.
- GERBERT, C., FRIETEN, D., KOCH, C., DUSEL, G., EDER, K., ZITNAN, R., HAMMON. H. 2017. Organ and epithelial growth in the gastrointestinal tract of Holstein calves fed milk replacer ad libitum and supplemented with butyrate. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*. 26:24.
- GERRITS, W. J. J., DECUYPERE, E., VERSTEGEN, M. W. A., KARABINAS, V. 1998. Effect of protein-free energy intake on plasma concentrations of insulin-like growth factor I and thyroid hormones in preruminant calves. *Journal Animal Science*. 76: 1356–1363.
- GHOSH, S., MEHLA, R. K. 2012 Influence of dietary supplementation of prebiotics (mannanoligosaccharide) on the performance of crossbred calves. *Tropical Animal Health Production*. 44:617-622.
- GIBSON, G. R., WILLIS, C. L., VAN LOO, J. 1994. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria implications for health. *International Sugar Journal*. 96 (1150): 381-387.
- GIBSON, G.R., ROBERFROID M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125: 1401-1412.
- GODFREY, N. W. 1961. The functional development of the calf. ii. Development of rumen function in the calf. *Journal of Agriculture Science*. 57(2):177.
- GORKA, P., PIETRZAK, P., KOTUNIA, A. 2008. Sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter mixture on rumen development in calves. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 59 (suppl.3): 22-22.

GORKA, P., KOWALSKI, Z.M., PIETRZAK, P., KOTUNIA, A., JAGUSIAK, W., ZABIELSKI, R. 2011. Is rumen development in newborn calves affected by different liquid feeds and small intestine development? *Journal of Dairy Science*. 94:3002-3013.

GOTTERO, C., BROGLIO, F., PRODAM, F., DESTEFANIS, S., BELLONE, S., BENSO, A., GAUNA, C., ARVAT, E., VAN DER LELY, A. J., GHIGO, E. 2004. Ghrelin: A link between eating disorders, obesity and reproduction. *Nutritional Neuroscience*. 7(5-6): 255-270.

GRAND, E., RESPONDEK, F., MARTINEAU, C., DETILLEUX, J., BERTRAND, G. 2011. Effects of short-chain fructooligosaccharides on growth performance of pre-ruminant veal calves. *Journal of Dairy Science*. 96:1094–1101.

GUILLOTEAU, P., ZABIELSKI, R., BLUM, J.W. 2009. Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 60(3): 37-46.

HA, J. K., R. J. EMERICK AND L. B. EMBRY. 1983. In Vitro Effect of pH Variations on Rumen Fermentation, and In Vivo Effects of Buffers in Lambs before and after Adaptation to High Concentrate Diets. *Journal of Animal Science*. 56(3): 698–706.

HAMILTON, E.J., BERG, H.M., EASTON, C.J., BAKKER, A.J. 2006. The effect of taurine depletion on the contractile properties and fatigue in fast-twitch skeletal muscle of the mouse. *Amino Acids*. 31: 273–278.

HAMMON, H. M., DONKIN, S. S. 2002. Growth hormone influences growth performance but does not affect gluconeogenesis from lactate or propionate in 60-d old veal calves. *Journal of Animal Science*. 80(1): 337.

HARRISON, H. N., R. G. WARNER, E. G. SANDER, J. K. LOOSLI. 1960. 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.

HEINRICHS, A. J., JONES, C. M., HEINRICHS, B. S. 2003. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 86:4064–4069.

HEINRICHS, J. 2005. Rumen development in the dairy calf. *Advances and Dairy Science and Technology*. 17:179–187.

HEINRICHS, A. J., JONES, C. M., ELIZONDO-SALAZAR, J. A., TERRIL, S. J. 2009. Effects of prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. *Livestock Science*. 125:149-154.

HELAL, F.I.S., ABDEL RAHMAN, K.M., AHMED, B.M. AND OMAR, S.S. 2011. Effect of feeding different levels of concentrates on buffalo calves performance, digestibility and carcass traits. *American- Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science*. 10: 186-192.

HOOG, B.W. Compensatory growth in ruminants. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. (Eds.) *Growth regulation in farm animals: advance in meat science research*. Corvallis Oregon: Elsevier, 1991. v.7, p.103-134.

HORVATH, D. M., MURPHY, R. M., MOLLICA, J. P., HAYES, A., GOODMAN, C. A. 2016. The effect of taurine and beta-alanine supplementation on taurine transporter protein and fatigue resistance in skeletal muscle from mdx mice. *Amino Acids*. 1–11.

- HORNICK, J. L., VAN EENAEME, C., GERARD, O., DUFRASNE, I., ISTASSE, L. 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domestic Animal Endocrinology*. 19: 121–132.
- HOSODA, H., KOJIMA, M., MATSUO, H., KANGAWA, K. 2000. Ghrelin and Des-acyl Ghrelin: Two Major Forms of Rat Ghrelin Peptide in Gastrointestinal Tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 279: 909–913.
- HUXTABLE, R.J. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*. 72:101–163.
- ITAVO, L. C. V., ITAVO, C. C. B. F., SOUZA, S. R. M. B. O., DIAS, A. M., COEHLO, E. M., MORÁIS, M. G., SILVA, F. F. 2007. Evaluation of production of calves in feed lot or in creep feeding systems. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59:948-954.
- ITO, T., YOSHIKAWA, N., INUI, T., MIYAZAKI, N., SCHAFFER, S. W., AZUMA, J. 2014. Tissue depletion of taurine accelerates skeletal muscle senescence and leads to early death in mice. *PLoS One*. Manuscripto aceito. 9: e107409. doi:10.1371/journal.pone.0107409.
- ITO, T., YOSHIKAWA, N., ITO, H., SCHAFFER, S. W. 2015. Impact of taurine depletion on glucose control and insulin secretion in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*. 129:59-64.
- ITOH, F., KOMATSU, T., YONAI, M., SUGINO, T., KOJIMA, M., KANGAWA, K., HASEGAWA, Y., TERASHIMA, Y., HODATE, K. 2005. GH secretory responses to ghrelin and GHRH in growing and lactating dairy cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 28: 34–45.
- JASPER, J., WEARY, D. M. 2002. Effects of ad libitum intake on dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 85:3054-3058.
- JURIMAE, J., MAESTU, J., JURIMAE, T. 2003. Leptin as a maker of training stress in highly trained male rowers. *European Journal of Applied Physiology*. 90: 533-538.
- KARA, C., H., TEMIZEL, M., CATIK, S., MERAL, Y., ORMAN, A., YIBAR, A., GENCOGLU, H. 2015. Effects of supplemental mannanoligosaccharides on growth performance, faecal characteristics and health in dairy calves. *Asian Australasian Journal of Animal Science* 28:1599-1605.
- KATO, H., MIURA, K., SUZUKI, K., BANNAI, M. 2017. Leucine-enriched essential amino acids augment muscle glycogen content in rats seven days after eccentric contraction. *Nutrients*. 9(10):1159.
- KAUFHOLD, J. N; HAMMON, H. M; BLUM, J. W. 2000. Fructo- oligosaccharide supplementation: Effects on metabolic, endocrine and hematological traits in veal calves. *Journal of Veterinary Medicine*.47:17–29.
- KEOGH, K., WATERS, S. M., KELLY, A. K., KENNY, D. A. 2015. Feed restriction and subsequent re-alimentation in Holstein Friesian bulls: I. Effect on animal performance; muscle, fat, and linear body measurements; and slaughter characteristics1. *Journal of Animal Science*. 93(7):3578–3589.
- KETELSLEGERS, J.M., MAITER, D., MAES, M., UNDERWOOD, L.E., THISSEN, J.P. 1995. Nutritional regulation of insulin-like growth factor I. *Metabolism* 44:50-57.

- KIM, M.-S., YOON, C.-Y., PARK, K.-H., SHIN, C.-S., PARK, K.-S., KIM, S.-Y., CHO, B.-Y., LEE, H.-K. 2003. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *NeuroReport*. 14(10):1317–1320.
- KLEESSEN B., HARTMANN L., BLAUT M. 2001. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition*. 86: 291–300.
- KLEIN, R. D., KINCAID, R. L., HODGSON, A. S., HARRISON, J. H., HILL-ERS, J. K., CRONRATH, J. D. 1987. Dietary fiber and early weaning on growth and rumen development of calves. *Journal of Dairy Science*. 70:2095– 2104.
- KOJIMA, M; HOSODA, H; DATE, Y; et al. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 402, 656-660.
- KOJIMA, M., HOSODA, H., KANGAWA, K. 2004. *Clinical endocrinology and metabolism*. Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing and appetite-stimulating peptide from stomach. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology Metabolism*, 18: 517-30.
- KOJIMA, M.; KANGAWA, K. 2005. Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews*, 85: 495-522.
- KOLLAR, R., STURDIK, E., SAJBIDOR, J. 1992. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Food Biotechnology*. 6: 225-237.
- KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. 2008. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 44: 329-348.
- KORBONITS, M; GOLDSTONE, A. P; GUEORGUIEV, M; GROSSMAN, A. B. 2004. Ghrelin – a hormone with multiple functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 25: 27–68.
- KOSCHECK, J. F. W., J. T. ZEVOUDAKIS, D. M. G. CARVALHO, L. S. CABRAL, K. P. AMORIM, R. G. F. SILVA, R. P. SILVA. 2010. Suplementação de bovinos de corte em sistema de pastejo. *UNICiências*, v.15, n.1.
- KUENZEL, W. J., BECK, M. M., TERUYAMA, R. 1999. Neural sites and pathways regulating food intake in birds: A comparative analysis to mammalian systems. *Journal of Experimental Zoology*. 283:348–364.
- KULAKOWSKI, E. C., MATURO, J. 1984. Hypoglycemic properties of taurine: not mediated by enhanced insulin release. *Biochemistry Pharmacology*. 33: 2835 – 2838.
- KUMAR, S., DUTTA, N., BALIYAN, S., PATTANAIK, A.K., SINGH, S.K. 2015. Effect of feed restriction on nutrient metabolism, metabolic profile and excretion of nutrients in goats. *Animal Nutrition and Feed Technology*. 15: 361-374.
- KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. 2006. Western blotting. *Methods*. 38: 283-293.
- LA CAVA, A.; MATARESE, G. The weight of leptin in immunity. 2004. *Nature Reviews Immunology*. 4: 371-379.

- LAHUCKY, R., PALANSKA, O., MOJTO, J., ZAUJEC, K., HUBA, J. 1998. Effect of preslaughter handling on muscle glycogen level and selected meat quality traits in beef. *Meat Science*. 3: 389 – 393.
- LALLES, J.P; BOSI, P; SMIDT, H; STOKES, R. 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of Nutrition Society*. 66: 260-268.
- LAMBERT, I. H., KRISTENSEN, D. M., HOLM, J. B., MORTENSEN, O. H. 2015. Physiological role of taurine – from organism organelle. *Acta Physiology – review*. 213: 191 – 212.
- LEÃO, V. F., FERREIRA, L. L. D. M., MELO, C. M., BONFLEUR, M. L., DA SILVA, L. L., CARNEIRO, E. M., RAIMUNDO, J. M., RIBEIRO R. A. 2018. Taurine supplementation prevents endothelial dysfunction and attenuates structural changes in aortas from hypothalamic obese rats. *European Journal of Nutrition*. Manuscripto aceito. doi:10.1007/s00394-018-1616-2
- LEE, H. G., HONG, Z. S., KIM, M. K., KANG, S. K., XU, C. X., CHO, J. S., SEO, K. S., ROH, S. G. AND CHOI, Y. J. 2006. The response of plasma leptin and feed intake to growth hormone administration in Holstein calves with different planes of nutrition. *Canadian Journal of Animal Science*. 86(2): 225-233.
- LEE, H. J., KHAN, M. A., LEE, W. S., KIM, K. S., KI, K. S., KAMG, S. J., KHAN, M. S., CHOI, Y. J. 2008. Growth, blood metabolites, and health of holstein calves fed milk replacer containing different amounts of energy and protein. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 21(2): 198-203.
- LEITE, P. R. S. C., MENDES, F. R., PEREIRA, M. L. R., LIMA, H. J. A., LACERDA, M. J. R. 2012. Aditivos Fitogênicos em Rações de Frangos. *Enciclopédia Biosfera*.15: 09 – 26.
- LESMEISTER, K. E., HEINRICHS A.J., GABLER, M.T. 2004a. Effects of supplemental yeast (*saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *Journal. Dairy Science*. 87:1832-1839.
- LESMEISTER, K. E., TOZER, P. R., HEINRICHS, A. J. 2004b. Development and analysis of a rumen tissue sampling procedure. *Journal of Dairy Science*. 87(5): 1336-1344.
- LESSON, S., ZUBAIR, A. K. 1997. Nutrition of the Broiler Chicken Around the Period of Compensatory Growth. *Poultry Science*. 76:992–999.
- LIMA, P.O., CÂNDIDO, M.J.D., QUEIROZ, M.G.R., FERREIRA, J.M., MODESTO, E.C., LIMA, R.N., GOMES, J.M.C., AQUINO, R.M.S. 2012. Parâmetros séricos de bezerros submetidos a diferentes tipos de dietas líquidas. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 13:529-540.
- LU, S; GUAN, J. L; WANG, Q. P; UEHARA, K; YAMADA, S; GOTO, N. 2002. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett*. 321(3):157-60.
- LU, Z., HE, X. F., MA, B. B., ZHANG, L., LI, J. L., JIANG, Y., ZHOU, G. H., GAO, F. 2018. The alleviative effects and related mechanisms of taurine supplementation on growth performance and carcass characteristics in broilers exposed to chronic heat stress. *Poultry Science*. pey433 Manuscripto aceito. doi: 10.3382/ps/pey433.

- MA, X., LIN, Y., JIANG, Z., ZHENG, C., ZHOU, G., YU, D., CAO, T., WANG, J., CHEN, F. 2010. Dietary arginine supplementation enhances antioxidative capacity and improves meat quality of finishing pigs. *Amino Acids*. 38(1):95–102.
- MANI, B. K., ZIGMAN, J. M. 2017. Ghrelin as a Survival Hormone. *Trends in Endocrinology e Metabolism*. 28(12): 843-854.
- MASUDA, Y; TANAKA, T; INOMATA, N; OHNUMA, N; TANAKA, S; ITOH, Z. 2000. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 276(3):905-8.
- MCVEIGH, J.M., TARRANT, P.V. 1982. Glycogen content and repletion rates in beef muscle, effects of feeding and fasting. *Journal of Nutrition* .112: 1306-14.
- MIURA, H., TSUCHIYA, N., SASAKI, I., KIKUCHI, M., KOJIMA, M., KANGAWA, K., HASEGAWA, Y., OHNAMI, Y. 2004. Changes in plasma ghrelin and growth hormone concentrations in mature Holstein cows and three-month-old calves. *Journal of Animal Science*. 82: 1329 – 1333.
- MOHRI, M., SHARIFI, K., EIDI, S. 2007. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults. *Research in Veterinary Science*.83(1):30–39.
- MONIN, G., SELIER, P. 1985. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post- mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Science*. 13:49–63.
- MONTANHOLI, Y., FONTOURA, A., SWANSON, K., COOMBER, B. R., YAMASHIRO, S., MILLER, S. 2013. Small intestine histomorphometry of beef cattle with divergent feed efficiency. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55: 9-15.
- MORENO, M; CHAVES, J. F; SANCHO-BRU, P; RAMALHO, F; RAMALHO, L. N; MANSEGO, M. L. 2010. Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. *Hepatology*. 51(3):974-85.
- MORGAN, J. H. L. 1972. 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.
- MORRISON, S. J., DAWSON, S., CARSON, S.F. 2010. The effects of mannan oligosaccharide and *Streptococcus faecium* addition to milk replacer on calf health and performance. *Livestock Science*. 131(2), 292–296.
- MULLER, L., TEIXEIRA PRIMO, A. 1986. Influência do regime alimentar no crescimento e terminação de bovinos e na qualidade da carcaça. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 21(4): 445-452.
- MURAKAMI, S., FUJITA, M., NAKAMURA, M., SAKONO, M., NISHIZONO, S., SATO, M., IMAIZUMI, K., MORI, M., FUKUDA, N. 2016. Taurine ameliorates cholesterol metabolism by stimulating bile acid production in high cholesterol-fed rats. *Clinic Experimental Pharmacology Physiology*. 43(3):372–8.
- NABUURS, M. J. A. 1995. Microbiological, structural and functional changes of the small intestine of pigs at weaning. *Pigs News and Information*. Oxfordshire. 16: 93 – 97.

- NAKAZATO, M., MURAKAMI, N., DATE, Y., KOJIMA, M., MATSUO, H., KANGAWA, K. 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 409: 194-8.
- NAGAYA, N., MIYATAKE, K., UEMATSU, M., OYA, H., SHIMIZU, W., HOSODA, H. 2001. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *Journal Clinic Endocrinol Metabolism*. 86: 5854-9.
- NAGARAJA, T. G., TITGEMEYER, E. C. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutrition outlook. *Journal of Dairy Science*. 90:17-38.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requeriments of dairy cattle. 7.rev.ed. Washinton, D.C.: 2001. 381p.
- NICIEZA, A. G., ÁLVAREZ, D. 2009. Statistical Analysis of Structural Compensatory Growth: How Can We Reduce the Rate of False Detection? *Oecologia*. 159:27-39.
- NICOL, A. M., KITESSA, S. M. 1995. Compensatory growth in cattle - refis. In: proceedings of the new zeeland society of animal production. Conference... New Zeeland: Otago University, 55, 157-160.
- NUNES, M. T. 2003. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo*. 47: 639 -643.
- O'DONOVAN, P. B. 1984. Compensatory gain in cattle and sheep. *Nutrition Abstracts*. 33: 54-389.
- OLIVEIRA, M. C., CANCHERINI, L. C., MARQUES, R. H., GRAVENA, R. A., MORAES, V. M. B. 2009. Mananligossacarídeos e complexo enzimático em dietas para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38: 879-886.
- O'NEILL, D. J., LYNCH, P. B., TROY, D. J., BUCKLEY, D. J., KERRY, J. P. 2003. Influence of the time of year on the incidence of PSE and DFD in Irish pig meat. *Meat Science*. 64: 105-111.
- OTTERBY, D. E., LINN, J. G. 1981. Advances in nutrition and management of calves and heifers. *Journal of Dairy Science*. 64:1365-1377.
- OTERO, M., NOGUEIRAS, R., LAGO, F., DIEGUEZ, C., GOMEZ-REINO, J. J., GUALILLO, O. 2004. Chronic inflammation modulates ghrelin levels in humans and rats. *Rheumatology (Oxford)*. 43(3): 306-10.
- OWENS, F. N., DUBESKI, P., HANSON, C. F. 1993. Factors that alter the growth and development of ruminants. *Journal of Animal Science*. 71: 3138-3150.
- OWENS, F. N., SECRIST, D. S., HILL, W. J., GILL, D. R. 1998. Acidosis in cattle: a review *Journal of Animal Science*. 76:275-286.
- PAGE, J.K., WULF, D.M., SCHWOTZER, T.R. 2001. A survey of beef muscle color and pH. *Journal of Animal Science*. 79:678-687.

- PARK, T., LEE, K., UM, Y. 1998. Dietary taurine supplementation reduces plasma and liver cholesterol and triglyceride concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutrition Research*. 18(9):1559–1571.
- PARK, G. S., TAKEUCHI, T., YOKOYAMA, M., SEIKAI, T. 2002. Optimal dietary taurine level for growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys Olivaceus*. *Fisheries Science*. 68(4):824–829.
- PARNELL, J.A., REIMER, R.A. 2011. Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *British Journal of Nutrition*. 107 (4): 601-613.
- PERON, A.J., FONTES, C.A., LANA, R.P. et al. 1993. Tamanho de órgãos internos e distribuição da gordura corporal em novilhos de cinco grupos genéticos submetidos à alimentação restrita e “ad libitum”. *Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 22: 813-819.
- PETHICK, D.W., ROWE, J.B., MCINTYRE, B.L. 1994. Effect of diet and exercise on glycogen levels in the muscle of cattle. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*. 20:403.
- PETHICK, D.W., CUMMINS, L., GARDNER, G.E., KNEE, B.W., MCDOWELL, M., MCINTYRE, B. L., TUDOR, G., WALKER, P.J., WARNER, R.D. 1999. The regulation by nutrition of glycogen in the muscle of ruminants. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*. 12:145-151.
- PORDOMINGO, A. J., GRIGIONI, G., CARDUZA, F., LAGRECA, G. V. 2012. Effect of feeding treatment during the backgrounding phase of beef production from pasture on: I. Animal performance, carcass and meat quality. *Meat Science*. 90(4):939–946.
- PÖSÖ A.R., PUOLANNE, E. 2005. Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Science*. 70, 423–434.
- POURABEDIN, M., ZHAO, X. 2015. Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiology Letters*. 362(15): fmv122.
- POURABEDIN, M., XU, Z., BAURHOO, B., CHEVAUX, E., ZHAO, X. 2014. Effects of mannan oligosaccharide and virginiamycin on the cecal microbial community and intestinal morphology of chickens raised under suboptimal conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. 60: 255-266.
- PRZYBYLSKI, W., MONIN, G., KOĆWIN-PODSIADŁA, M., KRZĘCIO, E. 2006. Glycogen metabolism in muscle and its effects on meat quality in pigs – a mini review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 3: 257 – 262.
- REALINI, C. E., DUCKETT, S. K., BRITO, G. W., DALLA RIZZA, M., DE MATTOS, D. 2004. Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Science*. 66:567–577.
- RITACCO, G., RADECKI, S. V., SCHOKNECHT, P. A. 1997. Compensatory growth in runt pigs is not mediated by insulin- like growth factor I. *Journal of Animal Science*. 75:1237–1243.
- RYAN, W.J. (1990). Compensatory growth in cattle and sheep. *Nutrition abstracts and reviews*. 50: 653-664.

- ROACH, P. J., DEPAOLI-ROACH, A. A., HURLEY, T. D., TAGLIABRACCI, V. S. 2016. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochemistry Journal*. 441(3): 763–78.
- ROBERFROID, M.B. Introducing inulin-type fructans. 2005. *British Journal of Nutrition*. 93:S13-S25.
- ROOYEN, L. A. V., ALLEN, P., CRAWLEY, S. M., O'CONNOR, D. I. 2017. The effect of carbon monoxide pretreatment exposure time on the colour stability and quality attributes of vacuum packaged beef steaks. *Meat Science*. 129:74–80.
- ROSENVOLD, K., PETERSEN, J. S., LAERKE, H. N., JENSEN, S. K., THERKILDSEN, M., KARLSSON, A. H., MOLLER, H. S., ANDERSEN, H. J. 2001. Muscle glycogen stores and meat quality as affected by strategic finishing feeding of slaughter pigs. *Journal of Animal Science*. 79: 382 – 391.
- ROSENVOLD, K., ANDERSEN, H. J. 2003. Factors of significance for pork quality—A review. *Meat Science*. 64(3):219–237.
- ROTH, B. A., KEIL, N. M., GYGAX, L., HILLMANN, E. 2009. Influence of weaning method on health status and rumen development in dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 92:645–656.
- SAMANTA, A. K., SENANI, S., KOLTE, A. P., SRIDHAR, M. B. R., JAYAPAL, N. 2012. Effect of prebiotic on digestibility of total mixed ration. *Indian Veterinary Journal*. 89:41-42.
- SASAKI, K., SASAKI, D., OKAI, N., TANAKA, K., NOMOTO, R., FUKUDA, I., YOSHIDA, K., KONDO, A., OSAWA, R. 2017. Taurine does not affect the composition, diversity, or metabolism of human colonic microbiota simulated in a single- batch fermentation system. *PLoS One*. 12(7): e0180991. doi:10.1371/journal.pone.0180991.
- SAUTER, S. N., ROFFLER, B., PHILIPONA, C., MOREL, C., ROMÉ, V., GUILLOTEAU, P., HAMMON, H. M. 2004. Intestinal development in neonatal calves: Effects of glucocorticoids and dependence on colostrum feeding. *Neonatology*. 85(2): 94–104.
- SCANGA, J. A., BELK, K. E., GRADIN, T., SMITH, G. C. 1998. Factors contributing to the incidence of dark cutting beef. *Journal of Animal Science*. 76: 2040-2047.
- SCHÄFF, C. T., GRUSE, J., MACIEJ, J., MIELENZ, M., WIRTHGEN, E., HOEFLICH, A., ... HAMMON, H. M. 2016. 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.
- SEOANE, L.M.; LAGE, M.; AL-MASSADI, O.; DIÉGUEZ, C; CASANUEVA, F.F. 2004. Papel de la Ghrelina en la fisiopatología del comportamiento alimentario. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*. 48: 11-17.
- SILVA F. F., SÁ, J. F., SCHIO, A. R., ÍTAVO, L. C. V., SILVA, R. R., MATEUS, R. G. 2009. Suplementação a pasto: disponibilidade e qualidade x níveis de suplementação x desempenho. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38:371-389.
- SILVA, L. A., TROMM, C. B., BOM, K. F., MARIANO, I., POZZI, B., DA ROSA, G. L., et al. 2014. Effects of taurine supplementation following eccentric exercise in young adults. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*. 39(1):101–104.

- 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.
- SOUZA, L.F.A., ARAÚJO, D.N., ASTOLPHI, J.L.L., DIAS, L.B.M., AMBIEL, A.C., SANTOS, L.S., CARMO, A.J., SILVA, P.C.G. 2010. Probiótico e antibiótico como promotores de crescimento para frangos de corte. *Colloquium Agrariae*. 2: 33-39.
- SUGETA, S. M., GIACHETTO, P. F., MALHEIROS, E. B., MACARI, M., FURLAN, R. L. 2002. Efeito da restrição alimentar quantitativa sobre o ganho compensatório e composição da carcaça de frangos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37(7): 903-908.
- SUGINO, T., HASEGAWA, Y., KIKKAWA, Y., YAMAURA, J., YAMAGISHI, M., KUROSE, Y., KOJIMA, M., KANGAWA, K., TERASHIMA, Y. 2002. A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep. *Biochemistry Biophysical Research Communications*. 295:255–260.
- SUN, Y., ASNICAR, M., SAHA, P. K., CHAN, L., SMITH, R. G. 2006. Ablation of *ghrelin* improves the diabetic but not obese phenotype of *ob/ob* mice. *Cell Metabolism*.3(5): 79–386.
- SPIEGEL, J. E., ROSE, R., KARABELL, P., FRANKOS, V. H., SCHMITT, D. F. 1994. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technology*. 48(1): 85-89.
- SPRING, P., WENK, C., DAWSON, K.A. et al. 2000. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science*. 79: 205-211.
- STURMAN, J.A. 1993. Taurine in development. *Physiology Review*. 73:119–147.
- STRYDOM, P. E., ROSENVOLD, K. 2014. Muscle metabolism in sheep and cattle in relation to high rigor temperature – overview and perspective. *Animal Production Science*. 54:510–518.
- SWEENEY, B. C., RUSHEN, J., WEARY, D. M., PASSILLÉ, A. M. B. 2010. Duration of weaning, starter intake, and weight gain of dairy calves fed large amounts of milk. *Journal of Dairy Science*. 93:148-152.
- TAKAHASHI, Y., TAMURA, Y., URUSHIBATA, E., TERADA, S., HATTA, H. 2016. Effects of Taurine Administration on Carbohydrate Metabolism in Skeletal Muscle during the Post-Exercise Phase. *Journal of Nutrition Science Vitaminology* 62: 257–264.
- TARRANT, P.V. 1989. Animal behaviour and environment in the dark-cutting condition in beef — A review. *Irish Journal of Food Science & Technology*, 13:1–21.
- TAZOE, H., OTOMO, Y., KAJI, I., TANAKA, R., KARAKI, S. I., KUWAHARA, A. 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *Journal of Physiology Pharmacology*. 59(Suppl 2):251-62.
- THOMAS, G.B., CUMMINGS, J.T., FRANCIS, H., et al. 1991. Effect of restricted feeding on the relationship between hypophysial portal concentration of growth hormone releasing factor and somatostatin, and jugular concentrations of GH in ovariectomized ewes. *Endocrinology*. 128: 1151-1158.

- TENNER, T. E., ZHANG, X. J., LOMBARDINI, J. B. 2003. Hypoglycemic effects of taurine in the Alloxan-Treated Rabbit, a Model for Type 1 Diabetes. *Taurine*. 5: 97–104.
- TERRILL, J. R., PINNIGER, G. J., GRAVES, J. A., GROUNDS, M. D., ARTHUR, P. G. 2016. Increasing taurine intake and taurine synthesis improves skeletal muscle function in the mdx mouse model for Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Physiology*. 594: 3095–110.
- TRAHAIR, J.F., ROBINSON, P.M. 1989. Enterocyte ultrastructure and uptake of immunoglobulins in the small intestine of the neonatal lamb. *Journal of Anatomy*. 166: 103-111.
- TSCHOP, M., SMILEY, D. L., HEIMAN, M. L. 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* .407(6806):908-913.
- TSUKAHARA, T; NAKAYAMA, K; USHIDA, K. 2003. Stimulation of butyrate production in the large intestine of weaning piglets by dietary fructooligosaccharides and its influence on the histological variables of the large intestinal mucosa. *Journal of Nutrition Science Vitaminology*. 49(6): 414-21.
- UENO, H., YAMAGUCHI, H., KANGAWA, K., NAKAZATO, M. 2005. Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regulatory Peptides*. 126: 11–19.
- USDA – National Agricultural Statistics Service. Disponível em: <https://www.nass.usda.gov/Newsroom/2018/index.php>. Data de acesso: 10 de Janeiro de 2019.
- VAN AMBURGH. M. E. Calf growth and development: New requirements and implications for future performance. In: *SOUTHWEST NUTRITION AND MANAGEMENT CONFERENCE, 2003, Tucson. Southwest Dairy management Proceedings, Tucson, 2003.* p. 1-13.
- VAN BIBBER-KRUEGER, C. L., MILLER, K. A., APERCE, C. C., ALVARADO-GILIS, C. A., HIGGINS, J. J., DROUILLARD, J. S. 2016. Effects of crystalline menthol on blood metabolites in Holstein steers and in vitro volatile fatty acid and gas production1. *Journal of Animal Science*. 94(3): 1170–1178.
- WANG, Y.H., XU, M., WANG, F.N. et al. Effect of dietary starch on rumen and small intestine morphology and digesta pH in goats. *Liv. Sci.*, v.122, p.48-52, 2009.
- WARSKULAT, U., FLOGEL, U., JACOBY, C., HARTWIG, H.G., THE- WISSEN, M., MERX, M.W., MOLOJAVYI, A., HELLER-STILB, B., SCHRADER, J., HAUSSINGER, D. 2004. Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *FASEB J*. 18: 577–579.
- WEBB, R., GARNSWORTHY, P.C., GONG, J.G., ASRMSTRONG, D.G. 2004. Control of follicular interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82: 63-74.
- WERTZ-LUTZ, A. E., JENNINGS, J. S., CLAPPER, J. A. 2010. Plasma ghrelin concentrations of beef cattle consuming a similar amount of dietary energy supplied by different ingredients. *Journal of Animal Science*. 88:2289–2299
- WERTZ-LUTZ, A. E., KNIGHT, T. J., PRITCHARD, R. H., DANIEL, J. A., CLAPPER, J. A. SMART, A. J., TRENKLE, A., BEITZ, D. C. 2014. Circulating ghrelin concentrations fluctuate relative to nutritional status and influence feeding behavior in cattle. *Journal of Animal Science*. 88:2289–2299

- WILLIAMS, D. L., D. E. CUMMINGS, H. J. GRILL, AND J. M. KAPLAN. 2003. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology* 144(7):2765-2767.
- WISE, G.H., ANDERSON, G.W., LINNERRUD, A.C. 1984. Relationship of milk intake by sucking and by drinking to reticular groove reactions and ingestion behavior in calves. *Journal of Dairy Science*. 67:1983-1992.
- WOJCIK, O. P., KOENIG, K. L., ZELENIUCH-JACQUOTTE, A., COSTA, M., CHEN, Y. 2010. Temporal reproducibility of taurine measurements in frozen serum of healthy postmenopausal women. *Brazilian Journal of Nutrition*. 104: 629–632.
- WULF, D., EMNETT, R., LEHESKA, J. AND MOELLER, S. 2002. Relationships among glycolytic potential, dark-cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. *Journal of Animal Science*, 80: 1895–1903.
- WYLIE, A. R. G. 2010. Leptin in farm animals: where are we and where can we go? *Animal*. 5(02):246–267.
- XU, Z.R., ZOU, X. T., HU, C. H., XIA, M. S., ZHAN, X. A., WANG, M. Q. 2000. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 15(12):1784-1789.
- YAKABI, K., KAWASHIMA, J., KATO, S. 2008. Ghrelin and gastric acid secretion. *World Journal Gastroenterol*. 14(41):6334-8.
- YAMASHITA, K., KAWAI, K., ITAKAMURA, M. 1984. Effects of fructooligosaccharids on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutrition Research*. 4: 961-966.
- YAMBAYAMBA, E. S. K., PRICE, M. A., JONES, S. D. M. 1996. Compensatory growth of carcass tissues and visceral organs in beef heifers. *Livestock Production Science*. 46:19–32. doi:10.1016/0301-6226(96)00014-0.
- YAN, C. C., BRAVO, E., CANTAFORA, A. 1993. Effect of taurine levels on liver lipid metabolism: An in vivo study in the rat. *Experimental Biology and Medicine*. 202(1):88–96.
- YANG, J., BROWN, M. S., LIANG, G., GRISHIN, N. V., GOLDSTEIN, J. L. 2008. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 132: 387–396.
- YOU, J. S., ZHAO, X., KIM, S. H., CHANG, K. J. 2013. Positive correlation between serum taurine and adiponectin levels in high-fat diet-induced obesity rats. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 776, 105–111.
- ZHANG, L., YUE, H. Y., ZHANG, H. J., XU, L., WU, S. G., YAN, H. J., GONG, Y. S., QI, G. H. 2009. Transport stress in broilers: I. Blood metabolism, glycolytic potential, and meat quality. *Poultry Science*. 88: 2033-2041
- ZITNAN, R., KUHLA, S., SANFTLEBEN, P., BILSKA, A., SCHNEIDER, F., ZUPCANOVA, M., VOIGT, J. 2005. Diet induced ruminal papillae development in neonatal calves not related with rumen butyrate. *Veterinari Medicina –Czech*. 50(11): 472-479.

# ANEXOS

## Aprovação Comitê de Ética no uso de Animais – Experimento 1



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



Goiânia, 18 de abril de 2016.

### PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N°. 017/16

#### I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** Manejo Alimentar e uso de MOS no desenvolvimento do trato digestivo de bezerras
2. **Pesquisador Responsável:** Reginaldo Nassar Ferreira
3. **Unidade/Órgão do pesquisador:** Departamento de Ciência Biológicas – Fisiologia-UFG
4. **Pesquisadores Participantes:** Natália Alves Costa; Carlos Henrique Castro; Aline Priscila Pansani, Diego Basile Colugnati
5. **Unidade onde será realizado:** Escola de Veterinária e Zootecnia -UFG
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 11/03/2016
7. **Data de Atendimento das Pendências:** 07/04/2016

#### II - Parecer da CEUA:

##### As pendências foram atendidas, segundo carta de atendimento às pendências.

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em março de 2018.

#### III - Data da reunião: 18/04/2016

**Dra. Renata Mazaro e Costa**  
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

## Aprovação Comitê de Ética no uso de Animais – Experimento 2



TO: Dr. James Drouillard  
Animal Sciences and Industry  
133 Call Hall

Protocol Number: 3970

FROM: Sally Olson, Chair  
Institutional Animal Care and Use Committee

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Sally Olson", is written over the printed name.

DATE OF APPROVAL: 08/28/2017  
DATE OF EXPIRATION: 08/28/2020

RE: Approval of Animal Care and Use Protocol Entitled, "Impact of taurine supplementation on cattle performance and meat quality".

The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) for Kansas State University has reviewed the protocol identified above and has approved it for three years from the date of this memo. During the period of approval, the protocol will be subject to annual monitoring, which may include the examination of records connected with the project. Announced post-approval monitoring (PAM) may be performed during the course of this approval period by a member of the University Research Compliance Office staff. Changes in the protocol affecting the care or use of animals must be reviewed by the IACUC prior to implementation. Unanticipated problems related to the humane care or use of animals must be reported to the IACUC immediately.

It is important that your animal care and use project is consistent with submissions to funding/contract entities. It is your responsibility to initiate notification procedures to any funding/contract entity of any changes in your project that affects the use of animals.

Milk restriction or prebiotic supplementation in calves improves compensatory gain and digestive tract development without changing hormone levels

Natália A. Costa <sup>1#</sup>, Aline P. Pansani<sup>1&</sup>, Carlos H. Castro<sup>1&</sup>, Diego B. Colugnati<sup>1&</sup>, Carlos H. Xaxier<sup>1∨</sup>, Katia C. Guimarães<sup>2&</sup>, Luiza A. Rabelo<sup>3φ</sup>, Valéria N. Souza<sup>4φ</sup>, Luis F.S. Caixeta<sup>1^</sup>, Reginaldo N Ferreira<sup>1#\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences. Federal University of Goiás, Goiania, Goiás, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Animal Science, Animal Nutrition Laboratory. Goiano Instituto Federal, Rio Verde, Goiás, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences. Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Physiological and Pharmacology Sciences, Institute of Biological Sciences. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

\*Corresponding author

E-mail: reginaldonassar@gmail.com

Artigo submetido à revista PlosOne.

Data da submissão: 11/02/2019

Protocolo de submissão: PONE-D-19-04127

## Abstract

We estimated the effect of prebiotic supplementation and feed restriction on lactating calves. The study was divided into two experimental periods of 28 days each with 20 crossbred calves that had initial body weight of 37 Kg and housed in individual pens. The animals were split in four experimental groups: animals fed 6 L milk/day (CON) in the two periods, animals fed milk restricted (3 L milk/day) in the first period and followed by CON feeding in the second period (RES), animals receiving supplementation of 5 g/day of mannanoligosaccharide (MOS) and animals receiving supplementation of 5 g/day mannan and frutoligosaccharide (MFOS). At the end of the study, all the animals were slaughtered. The average weight gain was lower in the restricted group when compared with CON and MFOS groups in the first period ( $P < 0.05$ ) and there were no difference among the groups in the second period. Animals supplemented with MOS showed a significant increases in jejunal villus height and rumen papillae, which were not observed for MFOS group ( $P < 0.05$ ) compared with RES and CON groups. There were no difference in ghrelin and leptin levels among treatments during periods 1 and 2 ( $P > 0.05$ ). Also, the expression of ghrelin receptors in the paraventricular region of the hypothalamus did not differ among groups. We conclude that milk restriction during the first weeks of life in calves resulted in compensatory gain and did not modify the hormonal profile and expression of the ghrelin receptor in the hypothalamus. Moreover, prebiotic supplementation changed the development of intestinal and ruminal epithelium.

**KEY WORDS:** compensatory gain, growth, management.

## Introduction

The pre-weaned calf is the most at-risk population of cattle on the farm for gastrointestinal malfunction [1], the first three months of calves' life are marked by several physiological and digestive changes [2]. Often at this stage the animals do not adapt to all transformations and modifications in their digestive physiology [3] resulting in high morbidity and mortality. The use of dietary strategies and supplementation of substances that act as growth factors are frequently chosen as a strategy to help overcoming these periods and to improve the maturation and digestive function of the gastrointestinal tract (GIT) [4-6].

Prebiotics are able to modulate the intestinal microbiota and may be a choice while the aim is to improve growth of lactating calves, nutrient absorption and intestinal development [7]. Oligosaccharide is a group of prebiotics well known for boosting the gastrointestinal tract development. Within this group, mannanoligosaccharides (MOS) and fructooligosaccharides (FOS) display good results [8,9]. Previous studies have shown that addition of prebiotics to animal diets can improve mucosal immune system function, average daily gain and fecal scoring [10-12]. Calves receiving supplementation of 4 g/day of MOS had improvement in body weight (BW) and structural growth measurements were better compared to control group [9]. Prebiotics may also be involved in secretion of the hormone of satiety, delayed gastric emptying and increased energy expenditure [13]. The mechanisms underlying these effects comprise reductions in the release of the orexigenic hormone ghrelin by the endocrine gastrointestinal cells in response to nutritional stimuli [14].

Another alternative to improve intestinal and ruminal development and accelerate the transition to the stage of functional ruminants is the milk restricted feeding for a period, which accelerates the development during the re-alimentation post-restriction period [15]. The dietary restriction promotes a reduction in the requirement for maintenance energy due to the lower body weight with consequent compensatory gain (CG) upon re-alimentation [15,16]. However, the mechanisms controlling the CG are ambiguous and the interpretation of the results from these studies is often confounded due to methodological differences in the timeframe of feed restriction

and subsequent re-alimentation, as well as changes in diet composition between restricted and re-alimented periods [17,18]. Therefore, to further understand the mechanisms underlying the CG, it is important to investigate how the molecular aspects of tissues metabolically activates during the CG. This comprehension would lead to a better exploration and a possible incorporation of this approach in the management of beef cattle [18]. The aim of this study was to compare two feeding techniques for suckling calves and verifying metabolic-hormonal changes that could promote better development, growth, weight gain and animal health to prepare calves for weaning period.

## **Material and methods**

All procedures involving animals were approved by Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from Federal University of Goiás (UFG) – Protocol 017/16 (S1 File).

### **Animals and feeding**

Twenty crossbred dairy calves were used in this study, at the beginning of the experiment calves had a mean live weight of  $37.83 \pm 4.92$  Kg. The animals were identified by ear rings and housed individually in twenty covered pens with concrete floors. Cleaning and disinfection of the environment was performed by daily washing using hypochlorite solution (10%). Calves were fed pooled colostrum before their arrival at the experimental site for the first two days of life. The calves went through an adaptation period of four days, receiving in this period 6 L of whole milk/day and *ad libitum* initial concentrate (based on corn, soybean meal and mineral premix), hay and water.

Thereafter, the animals were randomly distributed into four different experimental groups, CON, RES, MOS and MFOS with 5 animals in each. After 10 days of data collection, one calf of MOS group (n=4) died of unknown causes. CON calves received 6 L of milk/day for 56 days. RES calves received restriction milk (3 L/day) for 28 days (Period 1) followed by 6 L milk/day for 28 days (Period 2). MOS animals had supplementation of 5 g/day of mannanoligosaccharides

(GlucanMos – Yes, Brazil) and same diet of CON animals. MOS calves had supplementation of 5 g/day of manan-fructooligosaccharides (GlucanMosFos – Yes, Brazil) and same diet of CON animals. Calves had ad libitum access to water, tifton hay and the starter grain diet (based on corn, soybean meal and mineral premix), which met the requirements for pre-weaned calves throughout the study. The milk was offered twice a day, at 8:00 h in the morning and 3:00 h in the afternoon, using plastic buckets. Prebiotics were dissolved in milk prior to suckling.

## **Growth and blood sampling**

The calves were weighed immediately after arriving at the experimental site and each 15 days thereafter. The animals were weighed before the morning suckling using a mechanic scale with capacity of 100 Kg (ValFran – model 602, Sao Paulo, Brazil) and the body weight gain were calculated as sum of the entire experimental period. Individual blood samples were collected from each animal at 10, 22, 37 and 49 days of the study. The blood samples were taken via jugular venipuncture after local asepsis, using a 10-mL blood collection tube (VacuPlast, Sao Paulo, Brazil) containing no additive for serum dosage of alkaline phosphatase, total ghrelin, leptin, glucose, triglycerides, lactate, creatinine, protein and urea. For this, the blood samples were immediately placed on ice, followed by centrifugation ( $2,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min) transferred by pipette into 2-mL plastic tubes and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further biochemical parameters analysis. For serum ghrelin assay, 500  $\mu\text{L}$  of the serum were separately acidified with 50  $\mu\text{L}$  of HCl 1M and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The serum collected for quantification of leptin was transferred to identified plastic microtubes and stored in a freezer at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **Animal harvest and tissue sampling**

The calves were shipped 170 km to a Research Institute's abattoir in Urutai, GO (Instituto Federal Goiano) at the 56<sup>th</sup> day of the experiment. The final body weight was determined immediately before transporting the cattle. After the slaughter, the brain was promptly removed from skull and

the paraventricular region of the hypothalamus was quickly collected, packed in plastic microtubes, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  to determine the expression of ghrelin receptor. Transverse sections from the medial part of the duodenum and jejunum, as well as fragments from the left cranial rumen sac were collected from all calves. The sample fragments were washed in distilled water and immediately placed in 10% buffered formalin (pH 7.4) for 24 hours. After this time, the tissues were carefully washed in running water and kept in 70% alcohol until the histological procedures were performed.

## **Metabolites and hormones**

The metabolites were analyzed by commercial kits from Labtest (Lagoa Santa, MG, Brazil), which were read by automatic spectrophotometer (Labmax Plenno Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil). The following kits were used: glucose (1012), lactate (86), creatinine (127), total protein (99), urea (27), alkaline phosphatase (40) and triglycerides (87).

The total serum ghrelin and serum leptin were obtained by the Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) sandwich technique [18]. In a 96-well polystyrene plate, 100  $\mu\text{L}$  of rat anti-ghrelin antibody (AAU93610 RayBiotech<sup>®</sup>, Norcross, GA, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were added per well, then the plate was sealed overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Rat ghrelin has been used and validated to detect bovine ghrelin in another study [19]. The plate was washed five times using washing buffer (50 mM Tris-HCl containing Tween<sup>®</sup>-20) and blocked with 1% BSA for one hour. After, 20  $\mu\text{L}$  of serum samples and standards were added to the wells and the plate was incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  followed by five washes with washing buffer. Sequentially, 100  $\mu\text{L}$  of detection antibody (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (PeproTech<sup>®</sup>) was added to all wells. The plate was covered and incubated for four hours at room temperature in a shaker at a moderate speed. After incubation, the plate was washed five times and 100  $\mu\text{L}$  of enzyme solution (streptavidin-polyHRP80 conjugated peroxidase in PBS) was added and incubated for one hour at room temperature. Finally, the plate was washed five times, and 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  of Substrate Solution (3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina in PBS with  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) were added. After 30 minutes of development, 100  $\mu\text{L}$  of stop solution (0.3M HCl) were added

rapidly and the plate was read in a Genios plate reader (Phoenix Research Products, Candler, NC) with an excitation wavelength of 535 nm and an emission filter of 590 nm. The leptin analyzes followed the same methodology used for ghrelin analyze and it was used the anti-human leptin antibody (500-P86 Peprotech<sup>®</sup>, Rocky Hill, NJ). Leptin human homology with bovine leptin was validated in other study [21].

## **Histology**

The samples from jejunum, duodenum and rumen were processed for 8:45 hours in a tissue processor (Tissue processor: LupeTec PTO5TS; Sao Carlos, Brazil). Fixed samples were embedded in paraffin and serially sectioned into 5  $\mu\text{m}$  thickness slices with an automatic rotator microtome (Leica RM2155, Nussloch, Germany). The sections were stained with hematoxylin and eosin according to the method described previously by [22]. Tissue morphologic characteristics were evaluated under light microscope (Leica DM 2500, Nussloch, Germany) equipped with a video camera QICAM Fast 1394 (QcaptureW, Surrey, BC, Canada) connected to the computer-based image analysis software QImaging (QcaptureW, Surrey, BC, Canada). Duodenum and jejunum tissues were evaluated for villi height and crypt depth (50x of magnification), while rumen tissue was evaluated for rumen papillae length (25x of magnification) [23]. Data from all calves were pooled for procedure analysis.

## **Western blot analysis**

Quantitative Western blot analysis was used for the detection of bovine ghrelin receptor [24]. The hypothalamus sample was homogenized for extract preparations in 250  $\mu\text{L}$  ice-cold mild lysis buffer, containing 1% Nonidet P-40, 0.05 mol/L NaCl, 0.01 mol/L sodium phosphate (pH 7.2), 2 mmol/L ethylene diamine tetra acetic acid, 50 mmol/L sodium fluoride, 0.2 mmol/L sodium vanadate, and 1 g/mL of aprotinin. The tissue homogenates were sonicated on ice (3 cycles, twice for 10 s) and centrifuged at  $20\,000 \times g$  for 10 min and supernatants were collected. Protein levels in the homogenates were determined using the Bradford methodology [25].

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on an equivalent amount of protein samples using precast 10% resolving / 5% stacking Tris-HCl gels (Bio-Rad, Hercules, CA). Separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). Membranes were blocked in 5% nonfat milk in TBS buffer containing 0.1% Tween 20 (TBST) for one hour at room temperature. Blocked membranes were incubated in primary antibody specific for mouse ghrelin receptor bs-11529R, (Bioss, Woburn, Massachusetts) at a concentration of 1:1000, in TBST overnight at 4 °C. The membranes were washed and probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) for one hour at room temperature. Chemiluminescence detection was performed with the Amersham enhanced chemiluminescence detection kit according to the manufacturer's instructions. To ensure a similar amount of protein in each sample, the membranes were "stripped off", reprobed with GAPDH, developed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, and visualized by enhanced chemiluminescence.

## **Statistics and analyses**

Values are reported as the mean  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). All the variables were examined by one-way ANOVA, considering treatment as factor. When a significant main effect of treatment was observed, the Tukey's multiple comparisons test was used to compare groups. Data were analyzed using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), with  $p < 0.05$  considered as significant.

## **Results**

### **Changes in body weight gain and food intake**

Fig 1 shows the changes in the average weight gain, the total weight gain and solid food intake of calves that underwent milk restriction or supplemented with prebiotics. The average of weight gain during period 1 (Fig 1B) for RES animals was smaller than control, which was not seen in MOS

and MFOS animals (RES:  $13.18 \pm 0.9$  Kg; CON:  $18.54 \pm 1.4$  Kg; MOS:  $17.63 \pm 1.4$  Kg; MFOS:  $18.64 \pm 1.3$  Kg). Conversely, during period 2 (Fig 1C) there were no differences among groups with regard to body weight gain. At the end of experiments (day 56 = period 1 + period 2) the total weight gain was similar among groups (Fig 1A - CON:  $86.79 \pm 8.6\%$ ; RES:  $85.28 \pm 9.1\%$ ; MOS:  $78.56 \pm 10.9\%$ ; MFOS:  $87.81 \pm 10.43\%$ , respectively). Figures 1D and 1E show the intake of solid food by treatments during periods 1 and 2, respectively. No difference was found for the consumption in the first 28 days of the experiment, in contrast, in the period 2 RES animals had higher consumption of solid food compared to other animals (RES:  $875.2 \pm 34.0$  g; CON:  $686.3 \pm 21.0$  g; MOS:  $640.3 \pm 22.8$  g; MFOS:  $638.4 \pm 18.1$  g).

**Fig 1. Calves weight gain and solid food intake.** The average weight gain during periods 1 and 2 (Fig 1B and 1C, respectively), the total weight gain (Fig 1A) and solid food intake during periods 1 and 2 (Fig 1D and 1E, respectively) of calves underwent milk restriction or supplemented with prebiotics. Data are presented as mean  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). \*Represent significant differences among groups.

## Metabolites and Hormones

The comparison of the changes in metabolites and in hormone concentrations obtained from all groups and treatments are shown in Fig 2 and 3, respectively. There were no differences among groups and periods of treatments regarding to serum levels of lactate (Fig 2A), protein (Fig 2B), creatinine (Fig 2E), urea (Fig 2F) and alkaline phosphatase (Fig 2G). Triglyceride level (Fig 2C) was higher in the MFOS group compared to RES during period 1, no change was found for the other groups in the same period or between groups in period 2. Glucose did not alter between groups in the two periods (Fig 2D), in contrast was lower in the RES animals in period 1 compared to period 2. Restriction (RES) and supplementation (MOS and MFOS) were unable to modify the serum levels of ghrelin (Fig 3A) and leptin (Fig 3B).

**Fig 2. Changes in metabolites of calves underwent milk restriction or supplemented with prebiotics.** Serum levels of lactate (Fig 2A), protein (Fig 2B), triglycerides (Fig 2C), glucose (Fig 2D), creatinine (Fig 2E), urea (Fig 2F) and alkaline phosphatase (Fig 2G) of calves fed milk restricted or supplemented with prebiotics during period 1 (gray bars) and period 2 (black bars). Data are presented as mean  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). \*Represent significant differences among groups.

**Fig 3. Hormone concentrations of calves underwent milk restriction or supplemented with prebiotics.** Ghrelin (Fig 3A) and leptin (Fig 3B) serum levels during period 1 (gray bars) and period 2 (black bars). Data are presented as mean  $\pm$  the standard error of the mean (SEM).

## Epithelial Growth

Fig 4 shows the effect of both milk restriction and of prebiotics supplementation in rumen papillae and villus of the small intestine of calves. The length of the rumen papillae (Fig 4E) was greater ( $P < 0.001$ ) in MOS ( $1536.04 \pm 67.10 \mu\text{m}$ ) compared to CON ( $1284.33 \pm 58.92 \mu\text{m}$ ) and RES ( $1159.47 \pm 46.87 \mu\text{m}$ ) group. However, the supplementation with manan-fructooligosaccharides (MFOS group) did not affect the papilla size ( $1323.95 \pm 66.34 \mu\text{m}$ ). Concerning the villus height, MOS supplementation significantly increased jejunum villus height (Fig 4J) ( $676.21 \pm 32.59 \mu\text{m}$ ) ratio ( $P < 0.001$ ) compare with CON ( $551.59 \pm 27.58 \mu\text{m}$ ) and RES ( $478.08 \pm 28.64 \mu\text{m}$ ) groups, but MOS group was not different from MFOS ( $603.29 \pm 39.04 \mu\text{m}$ ) (Fig 4J). No statistical differences were observed in duodenal villi height among groups (Fig 4J) ( $P > 0.05$ ). At the same time, no differences were found in the crypt depth in both duodenum and jejunum among groups ( $P > 0.05$ ) (Fig 4O).

#### **Fig 4. Histomorphometry of ruminal papillae and small intestine mucosa of calves.**

Representative images of ruminal papillae (Fig 4 A-C), jejunum villi (Fig 4 F-I) and duodenum villi (Fig 4 K-N). Length of ruminal papillae (Fig 4 E); height of villi (Fig 4 J) of jejunum (gray bars) and duodenum (black bars); Crypt depth (Fig 4 O) of jejunum (gray bars) and duodenum (black bars) after 56 days of study of calves that underwent milk restriction or supplemented with prebiotics. Data are presented as mean  $\pm$  the standard error of the mean (SEM). \*Represent significant differences among groups.

### **Expression of ghrelin receptor in hypothalamus**

The expression of GHS-R1a in the hypothalamus is presented in Fig 5 and was not different among control and treatments (RES, MOS and MFOS) ( $P > 0.05$ ).

**Fig 5. Gene expression of ghrelin in hypothalamus of calves.** Expression of ghrelin receptor (GHS-R1a) in the paraventricular region of the hypothalamus of calves underwent milk restriction or supplemented with prebiotics. Values are presented as mean  $\pm$  standard error.

## **Discussion**

Our main findings were: i) Milk restriction caused lower weight gain during restriction period; ii) After milk restriction, calves had greater solid feed consumption and compensatory gain weight; iii) Mannanooligosaccharides supplementation improved rumen and intestinal mucosa development; iv) Milk restriction or prebiotics supplementation did not alter serum ghrelin and leptin and ghrelin receptor in the hypothalamus. The compensatory gain observed for RES group in this study was initially proposed as the fast weight gain after a period of feed restriction [26, 27]. The CG results may vary among individuals, despite the literature considers that the compensatory gain may be improved if the duration of growth restriction is short and not so severe [15]. In our study, the methodological choice of dietary restriction was not severe enough to change calves solid feed intake during the period 1. The consumption of concentrate and roughage is very

small in the first two weeks of calves life [28] and cannot immediately compensate the reduction in milk intake, which explains the reducing in the body weight gain observed in period 1 of RES group. In prior reports, faster weight gain of restricted and re-alimented periods is firstly associated with the recovery of metabolic activity and thereafter with the development of the liver and small intestine in the second period [6]. However, in our experiment, milk restriction for 28 days did not modify villi and crypt development in duodenum and jejunum, as observed in RES calves. Furthermore, the GC responses may be attributed to the restoration of the amount of milk (6 L/day) and the increase in solid food intake in RES group, during period 2, when compared to the CON, MOS and MFOS groups. Curtis and colleagues [29] showed that 3-week-old calves submitted to milk substitute restriction increased solid food intake, which coincided with the increase in growth of these animals when compared to the group fed *ad libitum*.

It has been shown that solid food intake increases the size of the rumen as well as the dimensions of rumen papillae [30,31]. Although our results showed that the RES group had higher solid food intake in the period 2, there were no differences in rumen papillae length. Intriguingly, however, supplementation with MOS dissolved in milk resulted in increasing of rumen papillae length papillae, in spite of the lack of difference in dry matter intake when compared to CON group. Papilla measures may be the main developmental variable of rumen epithelium, being the gold standard method to detect the influence of treatment on rumen development [22]. The type and composition of the liquid food may indirectly affect the length of the ruminal papillae by modulating the development of the small intestine [32].

The final products of the prebiotics fermentation are the production of volatile fatty acids (VFA's) [33]. In the present study, the manan-oligosaccharide supplementation (MOS group) improved the intestinal and ruminal tissue, probably due to promoting a boosted energy availability, thus favoring a better development and renewal of cells in intestinal and ruminal tissue. The increase in available VFA's in the intestinal lumen is associated with increased serum levels of glucagon like peptide (GLP) and consequent increasing in ruminal papillae development [32,34]. On the other hand, our results showed that the supplementation of manan-fructoligosaccharide (MFOS

group) did not alter the ruminal tissue growth, which corroborates with an earlier study that reported no significant increase in height of the papillae when prebiotics were given as supplement to lactating calves [4].

The current study confirmed that prebiotics supplementation boost on intestinal development, as seen in the higher villus height of the MOS group. The VFA butyrate is used as an energy source by enterocytes, stimulates cell proliferation, differentiation and improves intestinal barrier function which leads to higher villus and depth crypts [2, 7, 8, 9]. Changes in villus structure obtained with prebiotic supplementation result in a greater capacity of absorption of nutrients by the intestine. However, the improved development of jejunal villus did not reflect the performance of the animals in this currently study. Literature comprises conflicting data on the effect of prebiotics use and animal performance in the first months of life [9, 11, 12, 32, 35]. Current findings of our study indicate that during weaning, calves must transit from a milk- based diet to one based on solid feed intake, in which MOS supplementation may prepare the calves for faster adaptation during weaning.

We did not find changes in serum creatinine, total protein, urea and alkaline phosphatase levels among the treatments and experimental periods (Fig 2). In fact, little variations were expected, concerning some metabolites parameters, since at 5 days of age creatinine levels are already close to those observed in adult animals [36], and the previous study did not find differences in plasma urea between calves fed with *ad libitum* milk or conventional system [37]. On the other hand, we found that serum triglyceride concentration was significantly lower in the RES group in period 1 compared to the MFOS group. It has been previously reported that during the food restriction considerable levels of triglycerides can be used to supply the energy expenditure [38,39], which corroborate this result. Also, the lower glucose level in period 1 than in the period 2 in RES group support the hypothesis that triglycerides are being used as an energy source. The lack of glucose changes among treatments in both periods suggests that the restriction allows a compensatory change in the synthesis and/or use of glucose maintaining a normal glycemia. In fact, literature reports normal pre-prandial glucose levels (70 to 120 mg/dL) in suckling calves [40].

In cattle, there is an increase in ghrelin and a decrease in leptin levels just before meals in response to fasting and decreased ruminal filling [41]. In the current study, serum concentrations of total ghrelin and leptin, as measured once in each experimental period, did not differ among treatments. Miura and coworkers showed a difference in pre and post-prandial plasma ghrelin concentrations of approximately 90 ng/mL in adult cows and much less variation in young calves [20]. Several factors, including body size and/or composition, feeding frequency and diet composition or amount supplied may affect ghrelin responsiveness among experiments [42,43,44]. In our study, solid feed was available *ad libitum*, and this could interfere in the ghrelin and leptin results.

To further investigate the mechanisms underlying the faster gastrointestinal development, we measured the expression of ghrelin receptor by western blotting assay in the hypothalamus at the end of the experiment. The hypothalamus plays an important role in regulating energy homeostasis and food seeking and intake behaviors in several animal species [45,46,47]. Ghrelin receptor (GHS-R) is expressed throughout the hypothalamus, mainly in the arcuate nucleus [48]. Our results showed that GHS-R1a levels in hypothalamus were not affected by restriction (negative energy balance), re-alimented period (positive energy balance) or prebiotic supplementation. This result is strikingly different from that observed in rats (a non-ruminant species), in which fasting periods significantly increased the level of GHS-R1a mRNA in the hypothalamus [49]. On the other hand, our data on cattle corroborate with those from Chen and colleagues [50] that also did not find difference in the expression of ghrelin receptors in the hypothalamus of broilers with 30 days of age submitted to different feeding strategies.

## Conclusions

Calves feeding milk restricted in the first 4 weeks of life had a smaller gain of weight during restriction period followed by compensatory gain of weight and increasing in solid food intake during the re-alimented period. Prebiotic supplementation did not reflect better performance of the animals, although it had improved the development of intestinal and ruminal mucosa. However, these alterations presented by the different treatments did not alter the metabolic, hormonal

parameters and the expression of GHS-R1a in the hypothalamus. In summary, supplementation of mannan-oligosaccharide was efficient to accelerate the development of the gastrointestinal tract and prepares the animals for the weaning period.

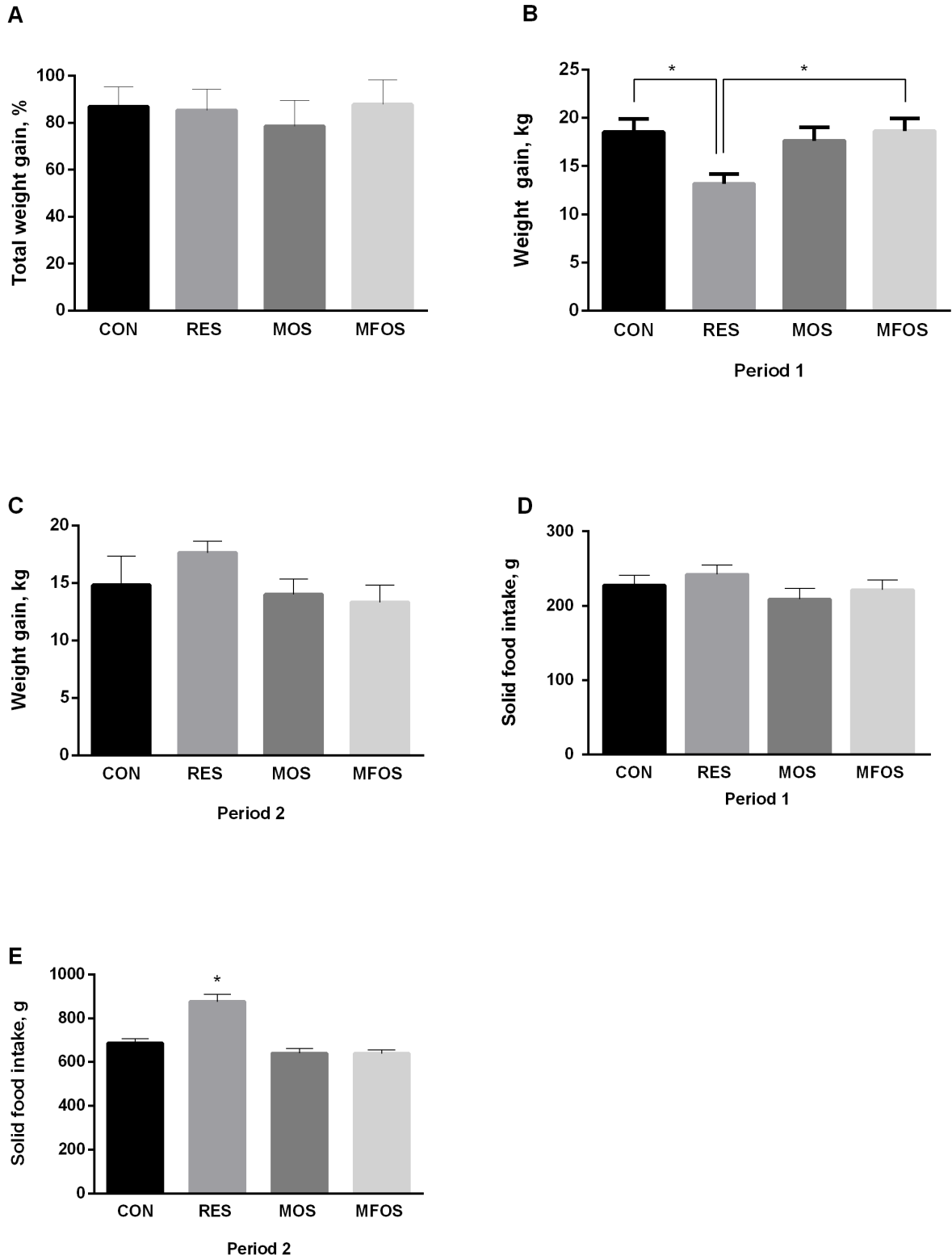
## References

1. Steele, MA, Penner, GB, Chaucheyras-Durand F, Guan LL. Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. *J Dairy Sci.* 2016;99: 4955-4966.
2. Guilloteau P, Zabielski R, Blum JW. Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60: 37-46.
3. Lalles JP, Bosi P, Smidt H, Stokes R. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc Nutrit Soc.* 2007;66: 260-268.
4. Lesmeiste KE, Heinrichs AJ, Gabler MT. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 1832-1839.
5. Jasper J, Weary DM. Effects of ad libitum intake on dairy calves. *J Dairy Sci.* 2002; 85: 3054-3058.
6. Choi YJ, Han IK, Woo JH, Lee HJ, Jang K, Myung KH, et al. Compensatory growth in dairy heifers: the effect of a compensatory growth pattern on growth rate and lactation performance. *J Dairy Sci.* 1997;80: 519-524.
7. Samanta AK, Senani S, Kolte AP, Sridhar MBR, Jayapal N. Effect of prebiotic on digestibility of total mixed ration. *Indian Vet J.* 2012;89: 41-42.
8. Xu ZR, Zou XT, Hu CH, Xia MS, Zhan XA, Wang MQ. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of growing pigs. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2000;15: 1784-1789.
9. Ghosh S, Mehla RK. Influence of dietary supplementation of prebiotics (mannanoligosaccharide) on the performance of crossbred calves. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44: 617-622.
10. Heinrichs AJ, Jones CM, Heinrichs BS. Effects of mannan oligosaccharides or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2003;86: 4064–4069.
11. Heinrichs AJ, Jones CM, Elizondo-Salazar JA, Terrill SJ. Effects of a prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. *Livest Sci.* 2009;125: 149–154.
12. Donovan DC, Franklin ST, Chase CCL, Hippen AR. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or Enteroguard. *J Dairy Sci.* 2002;85: 947–950.
13. Parnell JA, Reimer RA. Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *Br J Nutr.* 2011;107: 601-613.
14. Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, Naslain D et al. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90: 1236–1243.
15. Hornick JL, Van Eenae C, Gerard O, Dufrasne I, Istasse L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest Anim Endocrinol.* 2000;19: 121–132.

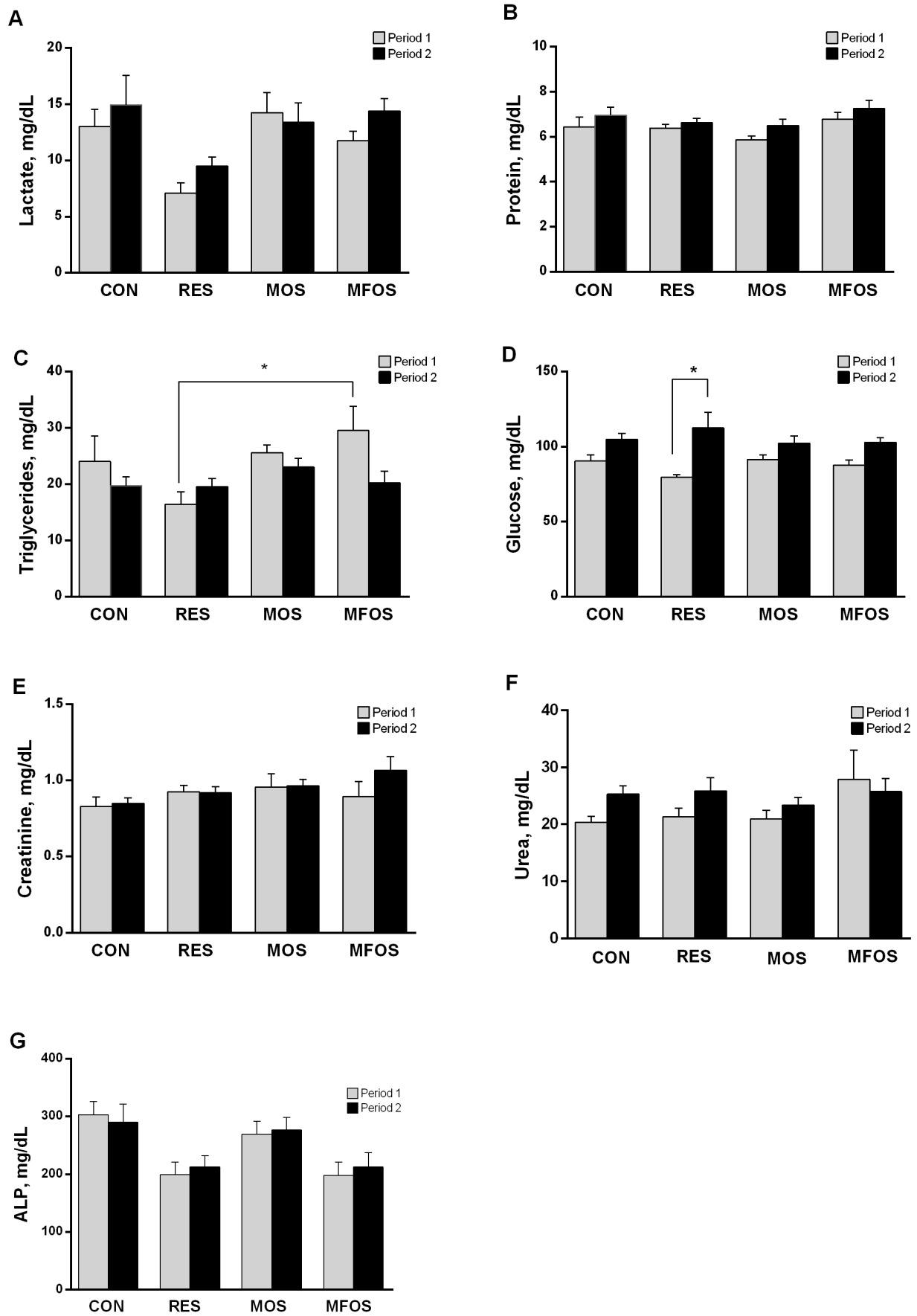
16. Lesson, S; Zubair, A. K. Nutrition of the Broiler Chicken Around the Period of Compensatory Growth. *Poult Sci.* 1999;76: 992–999.
17. Keogh K, Waters SM, Kelly AK, Kenny DA. Feed restriction and subsequent re-alimentation in Holstein Friesian bulls: I. Effect on animal performance; muscle, fat and linear body measurements; and slaughter characteristics. *J Anim Sci.* 2015;93: 3578–3589.
18. Keogh K, Waters SM, Cormican P, Kelly AK, Kenny DA. Effect of dietary restriction and subsequent re-alimentation on the transcriptional profile of bovine jejunal epithelium. *PLoS One.* 2018; 13(3): e0194445.
19. Cox KL, Devanarayan V, Kriauciunas A, Manetta JBS, Montrose C, Sittampalam S. Immunoassay Methods. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>.
20. Miura H, Tsuchiya N, Sasaki I, Kikuchi M, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Ohnami Y. Changes in plasma ghrelin and growth hormone concentrations in mature holstein cows and three-month-old calves. *J Anim Sci* 2004;82: 1329–1333.
21. Shaoguan JI, Willis GM, Scott RR, Spurlock ME. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. *Anim Biotechnol.* 1998;9: 1–14.
22. Montanholi Y, Fontoura A, Swanson K, Coomber BR, Yamashiro S, Miller S. Small intestine histomorphometry of beef cattle with divergent feed efficiency. *Acta Vet Scand.* 2013; 55: 9-15.
23. Lesmeister KE, Tozer PR, Heinrichs AJ. Development and analysis of a rumen tissue sampling procedure. *J Dairy Sci.* 2004; 87(5): 1336–1344.
24. Wang X, Cao J, Sun BW, Liu DD, Liang F, Gao L. Exogenous carbon monoxide attenuates inflammatory responses in the small intestine of septic mice. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(40): 5719-5728.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
26. Wilson PN and Osbourn DF. Compensatory growth after undernutrition in mammals and birds. *Biol Rev.* 1960;35: 324–363.
27. Winchester CF, Hiner RL Scarborough VC. Some effects on beef cattle of protein and energy restriction. *J Anim Sci.* 1957;16: 426–436.
28. Sweeney BC, Rushen J, Weary DM, Passille AM. Duration of weaning, starter intake, and weight gain of dairy calves fed large amounts of milk. *J Dairy Sci.* 2010;93: 148-152.
29. Curtis G, Mcgregor Argo C, Jones D, Grove-White D. The impact of early life nutrition and housing on growth and reproduction in dairy cattle. *PloS one.* 2018; 13(2): e0191687.
30. Khan MA, Weary DM, von Keyserlingk MAG. Invited review: Effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers. *J Dairy Sci.* 2011;94: 1071–1081.
31. Baldwin VI RL, McLeod KR, Klotz JL, Heitmann RN. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *J Dairy Sci.* 2004;87: 55-65.
32. Gorka P, Kowalski ZM, Pietrzak P, Kotunia A, Jagusiak W, Zabielski R. Is rumen development in newborn calves affected by different liquid feeds and small intestine development? *J Dairy Sci.* 2011;94: 3002-3013.
33. Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br J Nutr.* 2001;86: 291–300.
34. Gorka P, Pietrzak P, Kotunia A. Sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter mixture on rumen development in calves. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 (3): 22-22.
35. Kaufhold JN, Hammon HM, Blum, JW. Fructo- oligosaccharide supplementation: Effects on metabolic, endocrine and hematological traits in veal calves. *J Vet Med.* 2000;47: 17–29.

36. Fagliari JJ, Santana AE, Lucas FA, Campus Filho E, Curi PR. Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. Arq Bras Med Vet Zootec. [Portuguese].1998; 33(3): 253-262.
37. Hammon, H. M., S. S. Donkin. Growth hormone influences growth performance but does not affect gluconeogenesis from lactate or propionate in 60-d old veal calves. J Anim Sci. 2002;80(1): 427-435.
38. Abdel-hafeez, H. M., Saleh, E. S. E., Tawfeek, S. S., Youssef, I. M. I., Abdel-daim, A. S. A. Effects of probiotic, prebiotic and synbiotic with and without feed restriction on performance, hematological indices and carcass characteristics of broiler chickens. Asian-Australas J Anim Sci. 2017;30(5): 672-682.
39. Afsharmanesh M, Lotfi M, Mehdipour Z. Effects of wet feeding and early feed restriction on blood parameters and growth performance of broiler chickens. Anim Nutr. 2016;2(3): 168-172.
40. Franklin ST, Newman MC, Newman KE, Meek MI. Immune parameters of dry cow fed mannan oligosaccharide and subsequent transfer of immunity to calves. J Dairy Sci. 2005;88: 766-775.
41. Morrison SJ, Dawson S, Carson SF. The effects of mannanoligosaccharide and *Streptococcus faecium* addition to milk replacer on calf health and performance. Livest Sci. 2010;131(2): 292–296.
42. Akbarian-Tefaghi M, Ghasemi E, Khorvash M. Performance, rumen fermentation and blood metabolites of dairy calves fed starter mixtures supplemented with herbal plants, essential oils or monensin. J Anim Physiol Anim Nutr. 2018;102(3): 630–638.
43. Knowles TG, Edwards JE, Bazeley KJ, Brown SN, Butterworth A, Warriss PD. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. Vet Rec. 2000;147(21): 593–598.
44. Wertz-Lutz AE, Jennings JS, Clapper JA. Plasma ghrelin concentrations of beef cattle consuming a similar amount of dietary energy supplied by different ingredients. J Anim Sci. 2010;88: 2289–2299.
45. Sugino T, Yamaura J, Yamagishi M, Ogura A, Hayashi R, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Terashima Y. A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep. Biochem Biophys Res Commun. 2002;298: 785–788.
46. Kuenzel WJ, Beck MM, Teruyama R. Neural sites and pathways regulating food intake in birds: A comparative analysis to mammalian systems. J Exp Zool. 1999;283: 348–364.
47. Bayle CA, Della-Fera MA. Nature of hunger and satiety control systems in ruminants. J Dairy Sci. 1981;64: 1140–1152.
48. Baile CA, McLaughlin CL. Mechanisms controlling feed intake in ruminants: A Review. J Animal Sci. 1987;64(3): 915–922.
49. Kim MS, Yoon CY, Park KH, Shin CS, Park KS, Kim SY, Cho BY, Lee HK. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. NeuroReport. 2003;14(10): 1317–1320.
50. Chen LL, Jiang QY, Zhu XT, Shu G, Bin YF, Wang XQ, Gao P, Zhang YL. Ghrelin ligand–receptor mRNA expression in hypothalamus, proventriculus and liver of chicken (*Gallus gallus domesticus*): studies on ontogeny and feeding condition. Comp Biochem Physiol A. 2007;147: 893–902.

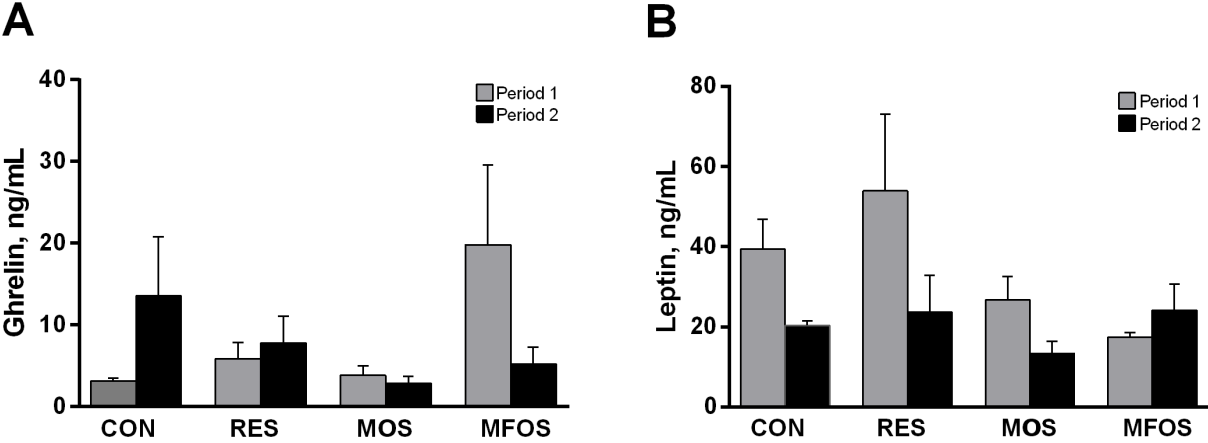
**Fig 1. Calves weight gain and solid food intake.**



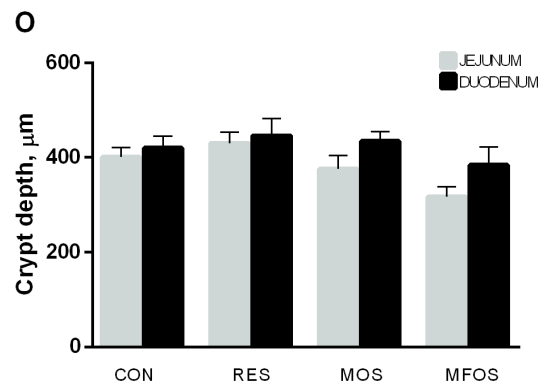
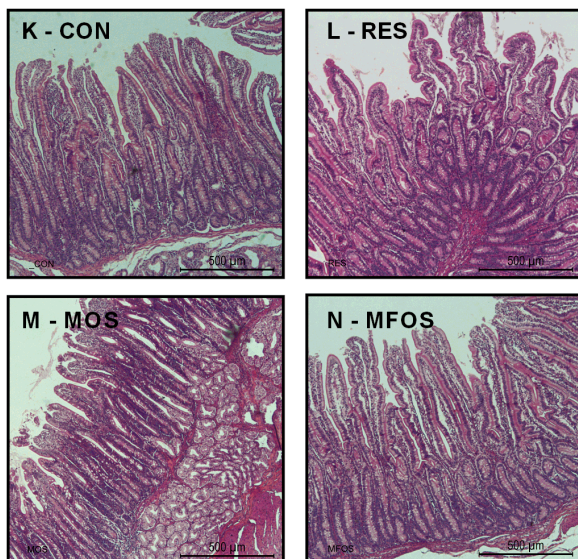
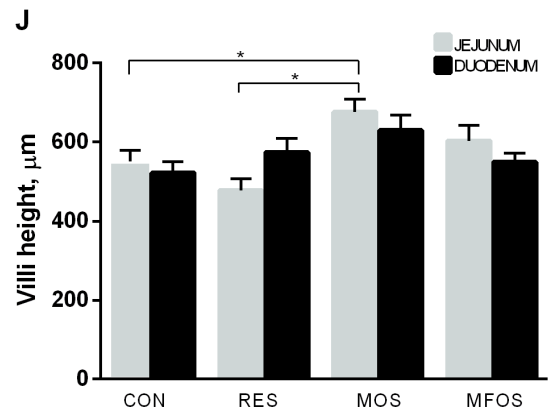
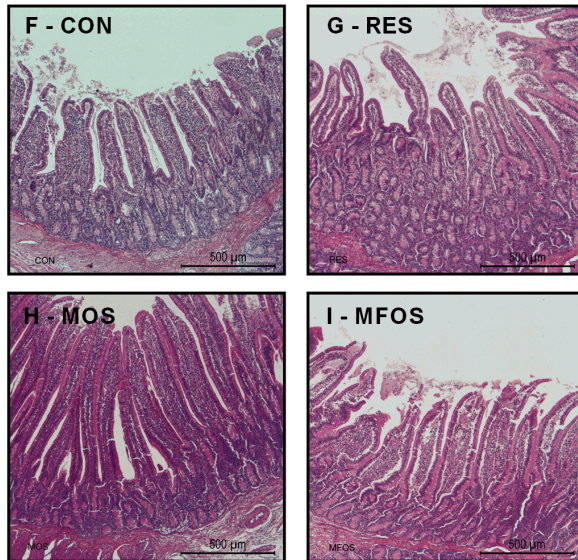
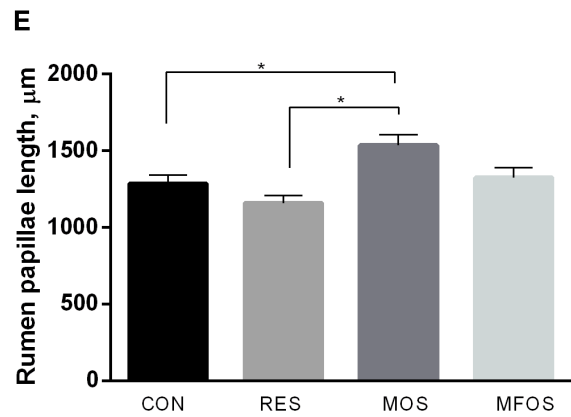
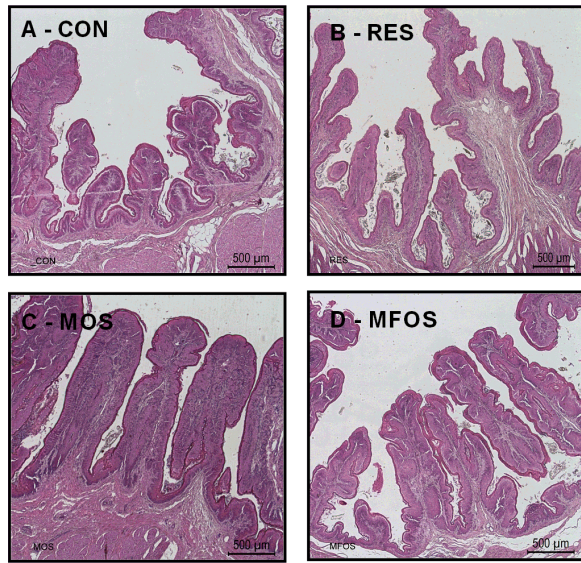
**Fig 2. Changes in metabolites of calves underwent milk restriction or supplemented with prebiotics.**



**Fig 3. Hormone concentrations of calves underwent milk restriction or supplemented with prebiotics.**



**Fig 4. Histomorphometry of ruminal papillae and small intestine mucosa of calves.**



**Fig 5. Gene expression of ghrelin in hypothalamus of calves.**

