



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

EVANDRO FERNANDO FERREIRA DIAS

Microbioma e caracterização do epitélio ruminal e cecal de bovinos de corte
submetidos à programação fetal

Pirassununga

2022



EVANDRO FERNANDO FERREIRA DIAS

Microbioma e caracterização do epitélio ruminal e cecal de bovinos de corte

submetidos à programação fetal

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Miguel Henrique de Almeida Santana

Pirassununga

2022



Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D541m Dias, Evandro Fernando Ferreira
Microbioma e caracterização do epitélio ruminal e
cecal de bovinos de corte submetidos à programação
fetal / Evandro Fernando Ferreira Dias ; orientador
Miguel Henrique de Almeida Santana ; coorientadora
Cristiane Gonçalves Titto. -- Pirassununga, 2022.
67 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Suplementação. 2. Pré-natal. 3. Gestação. 4.
Nelore. 5. Nutrição. I. Santana, Miguel Henrique de
Almeida, orient. II. Titto, Cristiane Gonçalves ,
coorient. III. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Fenômica da Programação Fetal na Produção de Bovinos de Corte: Uma Abordagem Sistêmica ", protocolada sob o CEUA nº 1843241117, sob a responsabilidade de **Miguel Henrique de Almeida Santana** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 09/03/2018.

We certify that the proposal "Fenomics of Fetal Programming Effects on Beef Cattle Production: A Systemic Approach ", utilizing 250 Bovines (males and females), protocol number CEUA 1843241117, under the responsibility of **Miguel Henrique de Almeida Santana** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 03/09/2018.



Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 12/2012 a 07/2020 Área: Bovino de Corte

Origem: Prefeitura do Campus da FZEA da USP

Espécie: Bovinos Sexo: Macho e Fêmea Idade: 0 a 6 anos N 250

Linhagem Nelore Peso: 30 a 550kg

Resumo: Indicações de que perturbações em fases críticas da vida pré e pós-natal causam efeitos permanentes na saúde e produtividade na vida dos mamíferos, conhecido como programação fetal (PF), não são novidade na literatura científica. Porém, ainda há muito a estudar quanto aos mecanismos desses estímulos/deficiências nutricionais durante a gestação, em especial a importância quantitativa do fenômeno em relação aos seus efeitos na eficiência produtiva dos bovinos. No caso específico do Brasil, onde predomina a raça Nelore, a partir do terço médio da gestação, ocorre um déficit nutricional nesta época porque as pastagens já não suprem qualitativa e quantitativamente os nutrientes necessários para a vaca. Adicionalmente, no terço final da gestação, quando há uma demanda maior do feto, o déficit nutricional é agravado pela estação seca. No presente projeto serão estudados os efeitos fisiológicos, morfológicos e econômicos do estímulo nutricional durante a gestação de vacas Nelore sobre a reprodução, desempenho, ingestão, eficiência alimentar, características de carcaça e qualidade de carne de suas progênes de forma sistêmica. Serão usadas 150 vacas gestantes de um único touro. Durante a gestação das matrizes receberão suplementação proteico-energética por toda gestação, outro das matrizes somente no terço final e ? não receberão esse estímulo nutricional. As vacas e suas crias serão avaliadas nas fases de cria, recria e terminação pela biologia de sistema via diversas avaliações fisiológicas, morfológicas e por abordagens ômicas (nutrigenômica,



genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica). Complementarmente, a viabilidade econômica da PF será avaliada na venda do bezerro à desmama e na renda obtida ao abate. Os resultados desse projeto ajudarão a determinar os mecanismos fisiológicos da PF por todo ciclo de produção de bovinos de corte, além fomentar o desenvolvimento de novas abordagens de avaliação que poderão impactar positivamente em todas as esferas dessa cadeia produtiva.

Local do experimento: Piquetes de pastagem, Confinamento e Abatedouro

Pirassununga, 10 de março de 2018

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP



DEDICATÓRIA

A minha mãe Áurea Maria Pereira Ferreira Dias, que sempre esteve ao meu lado me dando forças e que nunca mediu esforços para me ajudar, me orientar e me mostrar o melhor a se fazer, a minha irmã Nathália Cassia Ferreira Dias que junto da minha mãe somam forças para continuar a luta diária e fazer alcançar todos os objetivos que desejo e ao meu pai José Dias Sobrinho (in memoriam) que tive muitas orientações quando mais novo e hoje estou aqui graças ao apoio que ele sempre me deu.



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me ajudar a vencer cada obstáculo imposto pela vida.

Aos meus avôs Jaime Leite Ferreira (*in memoriam*) e Adelina Pereira Ferreira, aos meus tios Adriana Pereira Ferreira, Alexandre Pereira Ferreira e Aroldo Pereira Ferreira que foram fundamentais para minha formação, tanto profissional como pessoal, auxiliando com orientações pessoais e até mesmo profissionais.

Agradeço aos meu orientador, professor Miguel Henrique de Almeida Santana, pela oportunidade que me cedeu de começar a trabalhar no GoPec e todo apoio nas minhas decisões. Agradeço também, toda a dedicação em nós auxiliar a qualquer momento independente se fosse uma dúvida, um e-mail ou uma mensagem e essa atitude demonstra a sua dedicação pelo trabalho.

Aos professores, Heidge Fukumasu, Ricardo F. Strefezzi, pela ajuda nos experimentos e disponibilização de seus equipamentos e laboratórios.

Aos meus amigos de pós-graduação, PCR, Arícia e Roberta, que me ajudaram a somar força para desenvolver as pesquisas que englobaram no meu mestrado, além de ajuda nos experimentos e nos eventos.

Aos meus amigos de casa Felipe Eguti, Fernando Cansado, Marquinho e Largo, que pude compartilhar boas experiências, e era com quem eu poderia contar na cidade de Pirassununga.

Aos meus amigos do GoPec (Grupo de Ciências Ômicas na Pecuária), por todas as análises, manejos, discussões, reuniões, coletas, churrascos, risadas e sem vocês tudo isso não seria impossível, sem a ajuda dos meus amigos IÉLÉ, Favorável, Chico Bento, Tampa, Toiço, Geovana, Cíntia, Saideira, Mineira, Xéfa, Raissa e Cerca.



A USP FZEA, ao programa de Zootecnia e a todos os professores, pesquisadores e funcionários que dele fazem parte e me concederam a oportunidade de estudar e pesquisar nesta excelente universidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) .

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por todo o suporte financeiro para a execução desses trabalhos (processo 2017/12105-2) e pela bolsa (processo 2020/15192-6).

Resumo

A maior produção de bovinos no Brasil está situada no bioma do Cerrado, tendo na maioria animais da raça Nelore, e devido as variações climáticas e baixo desempenho das pastagens em algumas épocas do ano fica evidente a subnutrição das matrizes. Por consequência a prole pode ser afetada em sua produtividade no decorrer da vida. O insulto ou estímulo nutricional pré-natal é denominado programação fetal. Sendo assim, essa dissertação teve como objetivo a identificação de possíveis alterações causadas no epitélio ruminal, cecal e microbioma ruminal de bovinos de corte, submetidos aos efeitos da programação fetal (PF). Para isto, durante a gestação, 126 vacas da raça Nelore foram divididas em três planos nutricionais sendo que (PC, PP e NP, respectivamente): $\frac{1}{3}$ das matrizes receberam suplementação proteico-energética por toda gestação, outro $\frac{1}{3}$ das matrizes somente no terço final e $\frac{1}{3}$ não receberam esse estímulo nutricional, apenas suplementação mineral 0,03% de peso vivo. Desde o nascimento até o abate, todos animais receberam os mesmos tratamentos. Na fase de engorda, as fezes foram coletadas para análises subsequentes. Durante o abate, partes do epitélio ruminal e cecal foram coletadas, juntamente com o conteúdo ruminal de 15 animais, 5 de cada tratamento. O microbioma dos 15 animais foram analisados por meio de metagenômica 16S de amostras de fezes e de rúmen. As lesões de rúmen e de ceco foram avaliadas após a evisceração, onde fragmentos de 1 cm² foram coletados do saco cranial do rúmen e do centro do epitélio cecal para avaliação histológica. A quantidade de papilas ruminas foi maior para o tratamento PP, quando comparado com os demais. A rumenite e o escore de ceco não apresentaram efeito significativo ($P>0,05$). O ceco de animais em tratamentos PC, apresentou menor número de células de cálice em comparação com os tratamentos de NP ($P<0,01$), bem como menor profundidade cripta ($P<0,01$). O presente estudo salientou

melhora na morfometria cecal de animais programados em contraste com a de não-programados. Os resultados demonstraram diferença entre os locais de coleta, em volume de microrganismos e diversidade. Contudo, não houve diferença significativa entre o microbioma dos animais avaliados nesse experimento. Em resumo, esta dissertação traz grandes contribuições para o campo da programação fetal, com estudos pioneiros, contribuindo para a descoberta de mecanismos associados à nutrição materna e os impactos sobre suas progênies.

Palavras-Chave: Suplementação pré-natal, gestação, nelore, nutrição, genoma.

Abstract

The largest cattle production in Brazil is located in the Cerrado biome, with mostly Nelore animals, and due to climatic variations and low pasture performance at some times of the year, malnutrition of dams is evident. Consequently, offspring can be affected in their productivity throughout life. The insult or nutritional stimulus in prenatal pregnancy is called fetal programming. Thus, this dissertation aimed to identify possible alterations caused in the ruminal, cecal epithelium and ruminal content of beef cattle, subjugated to the effects of fetal programming (PF). For this, during pregnancy, 126 Nelore cows were divided into three nutritional plans, and (CP, PP and NP, respectively): 1/3 of the matrices received protein-energy supplementation throughout pregnancy, another 1/3 of the matrices only in the final third and 1/3 did not receive this nutritional stimulus, only mineral supplementation 0.03% of live weight. From birth to slaughter, all animals received the same treatments. In the fattening phase, feces were collected for subsequent analysis. During slaughter, parts of the ruminal and cecal epithelium were collected, together with the ruminal content of 15 animals, 5 of each treatment. Rumen and cecum lesions were evaluated after evisceration, where fragments of 1 cm² were collected from the cranial sac of the rumen and from the center of the cecal epithelium for histological evaluation. The amount of ruminal papillae was higher for pp treatment, when compared to the other Rumenite and cecum score did not present significant effect ($P>0.05$). The cecum of animals in CP treatments presented a lower number of calyx cells compared to the treatments of NP ($P<0.01$), as well as lower crypt depth ($P<0.01$). The present study highlighted an improvement in cecal morphometry of programmed animals in contrast to that of non-programmed animals. The microbiomes of the 15 animals were analyzed by metagenomics 16S of feces and rumen samples. The results showed a

difference between the collection sites, in volume of microorganisms and diversity. However, there was no significant difference between the microbiome of the animals evaluated in this experiment. In summary, this dissertation brings great contributions to the field of fetal programming, with pioneering studies, contributing to the discovery of mechanisms associated with maternal nutrition and the impacts on its progenies.

Keywords: Prenatal supplementation, pregnancy, Nellore, nutrition, genome.



LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Escore de rumenite de Nelore nos diferentes tratamentos de programação fetal.

Figura 2. Avaliação do ceco de Nelore em diferentes tratamentos de programação fetal.

Capítulo 2

Figura 1. Histograma de leitura (A & C) e ASV (B & D) para rúmen (A & B) e fezes (C & D) por amostra.

Figura 2. Gráfico circular de abundância no local de coleta da amostra, A no rúmen e B nas fezes.

Figura 3. Diversidade Alpha de Shannon no rúmen (A) e fezes (B)

Figura 4. Diversidade beta de Bray-curtis' de rúmen (A) e fezes (B).



LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Composição e Conteúdo Nutricional das Dietas do Confinamento.

Tabela 2. Rúmen e morfometria cecal de nelore em diferentes tratamentos de programação fetal.

Capítulo 2

Tabela 1. ASVs mais abundantes no sequenciamento 16S do rúmen.

Tabela 2. ASVs mais abundantes no sequenciamento 16S de fezes.

Tabela 3. Tendência de abundância diferencial de rúmen.

Tabela 4. Tendência de abundância diferencial em fezes.



LISTA DE ABREVIACOES

AGCC – cido Graxo de Cadeia Curta

ASV – encontrar sequências biolgicas únicas

Cm² – Centímetro Quadrado

DNA – cido Desoxirribonucleico

DNase – Deoxyribonuclease

IATF – Inseminaco Artificial em Tempo Fixo

MUC² - Enzima Mucina

NP – No Programado

NRC – Exigência de Nutrientes em Bovinos de Corte

PC – Programaco Completa

PCR – Proteína C-Reativa

PF – Programaco Fetal

PIB – Produto Interno Bruto

PP – Parcialmente Programado

Rdna rDNA – DNA Ribossmico

RNA – cido Ribonucleico



RNase – Ribonuclease

rRNArna – RNA Ribossômico

SAS – Sistema de Análise Estatística

TEC – Toneladas Equivalentes de Carça

TGI – Trato Gastrointestinal

UV – Ultra Viole



Sumário

1.	Introdução e justificativa	20
1.1	Referencias	23
2.	Capítulo 1: Influência da programação fetal no epitélio ruminal e cecal de bovinos de corte.....	26
2.1	Introdução.....	27
2.2	Objetivo e Hipótese.....	29
2.2.1	Hipótese.....	29
2.2.2	Objetivo Geral	29
2.2.3	Objetivos Específicos	29
2.3	Material e Métodos	30
2.3.1	Local do experimento.....	30
2.3.2	Origem dos Animais.....	30
2.4	Matrizes	30
2.5	Bois	31
2.6	Planejamento Alimentar.....	31
2.7	Incidência de Ruminites e Morfometria das Papilas Ruminais	33
2.8	Histologia das Papilas Ruminais.....	34
2.9	Morfometria do Ceco	34
2.10	Análise Estatística para Histologia e Morfometria Ruminal e Cecal	35



2.11	Resultados e Discussão.....	35
2.11.1	Histologia e Morfometria Ruminal e Cecal.....	35
2.12	Conclusão	41
2.13	Referências Bibliográficas.....	41
3.	Capítulo 2: Investigação da metagenômica 16S do rúmen e fezes associada a programação fetal em bovinos de corte	46
3.1	Introdução	47
3.2	Objetivos.....	49
3.2.1	Objetivo Geral	49
3.2.2	Objetivos Específicos.....	49
3.3	Material e Métodos.....	49
3.3.1	Local do experimento.....	49
3.3.2	Manejo Materno de Programação Fetal	49
3.4	Manejo dos Animais	50
3.5	Coleta de Fezes	51
3.6	Sequenciamento das Comunidades Bacterianas Ruminais.....	52
3.7	Análise de Dados e Estatística	53
3.8	Resultados.....	53
3.9	Discussão	59
3.10	Conclusão	61



3.11	Referências	62
3.12	Conclusão Geral	66

1. Introdução e justificativa

O projeto permitiu descobertas no desempenho do epitélio cecal e ruminal e no microbioma ruminal de bovinos de corte confinados que foram submetidos a programação fetal. É de grande importância avaliar o microbioma ruminal, pois o sinergismo entre o animal e os micro-organismos gera energia e nutrientes para o animal (Frey et al., 2010), já o desenvolvimento do epitélio ruminal é reflexo do sinergismo e do funcionamento dos micro-organismo presentes no rúmen.

O PIB do Brasil em 2020 teve uma queda de 4,1%, porém a pecuária teve um aumento de 8,4% para 10% (Abiec, 2021) o que gera um grande impacto na economia nacional, nesse sentido, é importante ressaltar o crescimento do setor tanto para atender o mercado interno quanto para exportação. Contudo, com a competição mundial e o alto consumo de proteína de origem animal, tornou-se necessário intensificar o sistema de produção de gado de corte, e dados já mostram essa intensificação por meio da utilização do confinamento, uma vez que em 2010 três milhões de cabeças foram confinadas e em 2020 este número subiu para sete milhões de cabeças, demonstrando assim um crescimento razoável na utilização desta ferramenta (Abiec, 2021). No entanto, apenas 15,62% dos bovinos são abatidos provindos do confinamento (Abiec, 2021). No sistema de confinamento são fornecidas dietas que possuem um alto valor energético, fazendo com que o animal consiga atingir melhores desempenhos, acabamento de carcaça e é abatido mais jovem (RESTLE e VAZ, 2003).

Quando se trata de produção de bovinos de corte no Brasil, de acordo com a demanda por carne é necessário a intensificação de todo o ciclo produtivo, a qual deve ser feita desde o início no período de gestação das fêmeas e nas três fases, de cria, recria e engorda, uma vez que é necessário reduzir a idade ao abate dos machos (Reis et al.,

2009). A reprodução e a suplementação da matriz têm grande importância para o ciclo de vida do animal e para a pecuária, visto que no período de gestação é onde ocorre a miogênese para a produção de fibra muscular (Kóllias & McDermott, 2008). Após o nascimento ocorre a hipertrofia celular nas células musculares, ou seja, o acontece apenas desenvolvimento muscular e não a criação de novas fibras musculares. Sendo assim, para abater o animal jovem e com bom ganho de peso é de extrema importante a miogênese no período de gestação.

No período de gestação, a matriz deve apresentar um bom estado nutricional para atender as exigências do feto e possibilitar o desenvolvimento da miogênese e adipogênese, para a produção de fibras musculares e tecido adiposo (Du et. al., 2015). Uma vez que a fêmea gestante passa por um déficit nutricional, a capacidade da produção de músculo da progênie será comprometida (Du et. al., 2015). Assim, estratégias como a programação fetal (PF), vem sendo desenvolvidas com o objetivo de atender as exigências nutricionais da matriz e do feto. Essas estratégias visam atingir maiores índices zootécnicos na propriedade através da suplementação no período de gestação.

Segundo Barker e colaboradores (1993), Godfrey e colaboradores (2000) e Barker e colaboradores (2000), a programação fetal é o estímulo na nutrição materna que gera impacto no desenvolvimento da cria e a todo período de sua vida. Segundo estudo, a suplementação proteica da matriz pode levar ao aumento de ganho de peso em garrotes quando comparados com animais que não foram oriundos de programação fetal (Greenwood et al., 2007).

Além da suplementação da matriz para a intensificação da produção, é necessário intensificar a suplementação pós-natal. Owens e colaboradores (1998), afirmam que os animais que sofrem uma alteração de uma dieta com baixa energia para uma dieta mais

adensada, é necessário que passam por um protocolo de adaptação para evitar distúrbios metabólicos. É importante avaliar os microrganismos presentes no rúmen para medir o desempenho na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que serão convertidos em energia para o desenvolvimento do animal.

Para maior entender o aproveitamento dos nutrientes oferecidos na dieta, é importante saber como é o funcionamento e sinergismo dos microrganismos responsáveis pela produção de AGCC no rúmen, assim, há estudos de microbioma ruminal com o intuito de avaliar os microrganismos e classificá-los em conjuntos de fungos, vírus e bactérias (HUNGATE, 1966). O sinergismo ruminal ocorrer devido a interação de todos os microrganismos presentes no rúmen, sendo essa interação responsável pela produção de AGCC e proteína microbiana (Kamra, 2005)

O genótipo e o fenótipo influenciam em diversas características dos microrganismos, afetando assim o animal. Dentro deste contexto, as conhecidas tecnologias ômicas, voltadas para genética molecular, vem sendo utilizada com o objetivo de desvendar o funcionamento e ação dos microrganismos, através do sequenciamento de DNA e RNA dos microrganismos. Segundo Fonseca e colaboradores (2018), através da identificação de genes envolvidos no processo biológico ruminal, foi possível reconhecer processos biológicos como metabolismo e proliferação celular. Através do estudo de mapeamento genético, é possível realização de seleção genética com o objetivo de viabilizar a produção de bovinos de corte (Fonseca et al., 2018).

Além dos microrganismos presentes no rúmen, para que ocorra um bom desempenho do animal, é necessário que os AGCC que são produzidos no rúmen possam ser absorvidos e aproveitados de maneira eficiente para o desenvolvimento do animal. A produção de AGCC deve ser compatível com a capacidade de absorção do animal, o

contrário, quando ha uma alta produção de AGCC e sua baixa absorção, pode ocorrer acidificação e queda no pH, diminuindo assim, o consumo, que pode levar a um quadro de acidose ruminal (DIRKSEN, 1989; OWENS et al., 1998). Dietas com alto teor de concentrado devem possuir grande atenção dos nutricionistas, pois elas induzem alterações fisiológicas no rúmen, uma vez que o tipo de alimento altera a população microbiana, taxa de passagem, motilidade, pH ruminal e a velocidade de absorção dos nutrientes (Santos 2011).

Sendo assim, para que o animal atinge excelentes índices zootécnicos é importante que todos AGCC produzido no rúmen e até mesmo no ceco possam ser absorvidos pela parede do epitélio cecal e ruminal, ao relacionar a programação fetal com microbioma e epitélio há uma grande oportunidade de novos estudos para avaliar o quanto matrizes suplementadas na gestação afetam a progênie no quesito de aproveitamento dos nutrientes, estudos esses, que auxiliaram no entendimento do sistema e também contribuíram para os produtores como tomada de decisão

1.1 Referencias

ABIEC. Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/>>. Acesso em: 4 fev. 2022.

BARKER, D. J. et al. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. **British Medical Journal**, v. 307, n. 6918, p. 1524-1527. 1993.

BARKER, D. J. et al. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. **BMJ**, v. 307, n. 6918, p. 1524–1527, 11 dez. 1993.

BARKER, D.J.; ERIKSSON, J.G. ; FORSEN, T. ; OSMOND, C. Origens fetais da doença adulta: Força dos efeitos e base biológica. **Int. J. Epidemiol.** 31:1235-1239, 2002.

DIRKSEN, G. Rumen function and disorders related to production disease. In: International Conference of Diseases in Farm Animals, Ithaca. Proceedings... Ithaca: **Cornell University**, p. 350, 1989.

DU, Min et al. Fetal programming in meat production. **Meat science**, v. 109, p. 40-47, 2015.

FONSECA, Pablo Augusto de Souza et al. Combining multi-OMICs information to identify key-regulator genes for pleiotropic effect on fertility and production traits in beef cattle. **PLoS one**, v. 13, n. 10, p. e0205295. 2018.

FREY, J. C. et al. Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1982-1993, 2010.

GREENWOOD, P. L.; CAFE, L. M. Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: long-term consequences for beef production. **Animal**, v. 1, n. 9, p. 1283-1296. 2007.

HUNGATE, R.E. The Rumen and its Microbes. **Academic Press, New York**, p. 533-535, 1966.

IBGE. Censo agropecuário 2017. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 108, 2018.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 124-135, 2005.

KOLLIAS, H. D.; McDERMOTT J. C. Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 104, p.579–587. 2008.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J. et al. Acidosis in cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v.76, p. 275-286, 1998.

RESTLE, J.; VAZ, F.N. Eficiência e qualidade na produção de carne bovina. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia. 2003.

Reis, R. A., Ruggieri, A. C., Casagrande, D. R. & Páscoa, A. G. Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38:147- 159. 2009.

SANTOS, J. E. P. Distúrbios metabólicos. In: Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. de. *Nutrição de Ruminantes*. 2. ed. Jaboticabal: **Funep**, Cap. 15. p.483- 494. 2011.

ZHU, M.-J. et al. Effect of Maternal Nutrient Restriction in Sheep on the Development of Fetal Skeletal Muscle¹. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1968–1973, 1 dez. 2004.

2. Capítulo 1: Influência da programação fetal no epitélio ruminal e cecal de bovinos de corte

Resumo:

Este trabalho teve como objetivo avaliar o epitélio ruminal e ceco de bovinos submetidos a programação fetal. Para tanto, cento e vinte e seis vacas Nelore gestantes foram divididas em três tratamentos, a saber: NP – Não Programação, PP – Programação Parcial e CP – Programação Completa. Todos os tratamentos receberam suplementação mineral (0,03% do peso vivo), mas apenas os tratamentos PP e CP receberam suplementação protéico-energética equivalente a 0,3% do peso corporal por dia durante a gestação. O grupo PP foi submetido a essa suplementação protéico-energética no terço final da gestação, enquanto o CP foi durante toda a gestação. Após o nascimento, os animais receberam os mesmos tratamentos até o abate. No experimento do presente estudo, utilizou-se material biológico de 63 progênies de machos com idade em torno de 21 meses, sendo 21 de cada tratamento. Durante o abate, foram coletadas amostras do epitélio ruminal e ceco e realizado o índice de lesão para posterior análise. A avaliação das lesões do rúmen e do ceco foi realizada após a evisceração dos bovinos e um fragmento de 1 cm² de cada rúmen foi coletado do saco craniano e do centro do epitélio do ceco para avaliação histológica. Os dados morfométricos de rumenite, rúmen e ceco e as medidas histológicas foram realizados pelo procedimento misto (PROC MIXED) e as comparações de médias entre os tratamentos foram realizadas pelo teste de Tuckey a 5% de significância. Nem a rumenite nem o escore do ceco apresentaram diferenças

significativas entre os tratamentos ($P>0,05$). O ceco dos animais do tratamento CP apresentou menor número de células calciformes, em comparação ao tratamento NP ($P<0,01$), bem como menor profundidade de cripta ($P<0,01$). O número de papilas ruminais foi maior no tratamento PP, quando comparado ao NP, mas igual ao CP ($P=0,01$). Além disso, as papilas ruminais e a espessura da camada queratinizada não apresentaram efeito ($P>0,05$). O presente estudo mostrou uma melhora na morfometria ruminal e cecal de bovinos de corte com estímulo nutricional pré-natal.

Palavras-chave: Histologia, nutrição pré-natal, confinamento, fermentação ruminal, bovino de corte.

2.1 Introdução

Atualmente, o Brasil possui cerca de 188 milhões de cabeças de gado em todo o seu território, dos quais 41,5 milhões de cabeças são abatidas anualmente, atingindo a terceira posição no mundo em termos de abate (ABIEC, 2021). Como é necessário aumentar a produção de carne para avançar no mercado interno e nas exportações, uma vez que há alta demanda, é necessário intensificar o sistema produtivo, seja na terminação com o uso do confinamento, na recriação e na cria com a suplementação e até mesmo no período de gestação com suplementação para evitar o déficit nutricional das matrizes, evitando baixo desenvolvimento fetal (DUARTE JÚNIOR et al., 2016).

O mercado interno e os consumidores do mundo ao longo dos anos estão exigindo um maior volume de carne e maior qualidade, com isso, pesquisadores e pecuaristas buscam formas de melhorar a produção com sustentabilidade. É necessário para reduzir a idade no abate de machos no sistema produtivo (REIS et al., 2009), intensificação que começa na cris e vai até a terminação. O período de gestação é de grande importância

porque é durante esse período que ocorre a miogênese para produzir fibra muscular (KÓLLIAS; MCDERMOTT, 2008). Após o nascimento, a hipertrofia celular ocorre em células musculares, e não há mais criação de células musculares, apenas seu desenvolvimento. Portanto, para abater animais jovens com bom ganho de peso, a miogênese no período gestacional é extremamente importante para produzir mais carne.

Diante disso, estratégias nutricionais em vacas prenhez têm sido desenvolvidas para atender às exigências da matriz e do feto. Entre essas estratégias está a programação fetal, que visa alcançar melhor desempenho na prole através do estímulo nutricional das matrizes, o que gera impacto. Durante o desenvolvimento da prole e ao longo de sua vida, a nutrição pré-natal afeta o ambiente uterino, que está diretamente relacionado ao desenvolvimento do feto, o que pode levar a mudanças fenotípicas que terão impacto ao longo da vida (BARKER et al., 1993; GODFREY et al., 2000; BARKER et al., 2000).

As restrições nos terços inicial e médio da gravidez podem comprometer a formação de fibras musculares, e as restrições nos terços finais comprometem a hipertrofia das fibras musculares e a formação de adipócitos (Du et al., 2010). A nutrição da matriz além de influenciar na formação de músculo e tecido adiposo também influencia no desenvolvimento da vilosidade do trato gastrointestinal, um estudo onde comparou progênes de vacas suplementadas com animais em restrição a vilosidade do trato gastrointestinal de animais filhos de matrizes suplementadas apresentou um melhor desenvolvimento e maior aptidão de absorção de nutrientes (Gionbelli et al., 2017).

O desenvolvimento do trato gastrointestinal é de suma importância para o animal, uma vez que a longas vilosidades presentes no intestinal se relacionam com maior capacidade de absorção de nutrientes (Poole et al., 2003). Além disso, progênes de

matrizes que foram suplementadas apresentaram maior peso do trato gastrointestinal, apontando uma maior capacidade de aproveitar os nutrientes (Gionbelli et al., 2017).

Estudos que ligam a programação fetal ao desempenho do gado de corte foram iniciados relativamente recentemente, portanto não há estudos disponíveis que avaliem o desenvolvimento do epitélio cecal e ruminal de animais submetidos à programação fetal. Nesses estudos, tanto a desnutrição quanto o excesso de nutrição durante a gravidez impactam o desempenho de crescimento do gado. Por isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência dos estímulos nutricionais das matrizes no desenvolvimento de rúmen e ceco da prole.

2.2 Objetivo e Hipótese

2.2.1 Hipótese

A hipótese do seguinte estudo foi se a suplementação durante a gestação afeta positivamente no desenvolvimento e desempenho do epitélio cecal e ruminal.

2.2.2 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a nutrição das vacas podem influenciar o epitélio ruminal e cecal de novilhos, filhos dessas matrizes submetidas a programação fetal, após o período de terminação.

2.2.3 Objetivos Específicos

- a. Avaliar histologia e morfologia do epitélio ruminal.
- b. Avaliar a histologia cecal.
- c. Relacionar as diferenças no epitélio ruminal e cecal com a nutrição pré-natal e associar as possíveis diferenças com desempenho dos animais.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no confinamento de bovinos de corte do Departamento de Zootecnia (ZAZ) da Faculdade de Ciência animal e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus Fernando Costa, na cidade de Pirassununga-SP, Brasil. Seguindo as diretrizes estabelecidas de acordo com os princípios éticos da experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciência Animal e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP, sob o protocolo número CEUA 1843241117.

2.3.2 Origem dos Animais

Todos os animais (vacas e touros), utilizados no presente estudo, eram da prefeitura municipal do Campus Fernando Costa, FZEA.

2.4 Matrizes

Anteriormente, as matrizes foram inseminadas artificialmente em tempo (IATF) com sêmen de quatro touros com valor genético conhecido e tiveram seu diagnóstico de prenhez confirmado em fevereiro de 2018 na estação de monta realizada no campus. Depois, as vacas foram selecionadas por idade, peso corporal e escore de condição corporal, e então divididas em três grupos, com 42 animais por grupo. Todos os animais foram alocados em um pasto de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, com acesso a cochos de ração e água. A diferença entre os grupos foram os tratamentos, onde: (NP) Não-Programado (as vacas receberam apenas uma suplementação mineral de 0,03% da PV); (PP) Parcialmente Programado (suplementação mineral mais suplementação proteico-energético de 0,3% de PV); e (PC) Programação Completa (suplementação mineral mais

suplementação proteico-energético de 0,3% de PV). A diferença entre PP e PC foi que as vacas em PP receberam a suplementação adicional apenas durante o último terço da gestação e o grupo PC recebeu a suplementação proteico energético desde a confirmação da prenhez (30 dias) até o nascimento. Detalhes sobre os tratamentos foram retirados do trabalho escrito por Schalch Jr (2022). Após o parto, o fornecimento de suplementos proteicos-energéticos foi interrompido, e todos os animais foram agrupados independentemente do plano nutricional. Os animais foram vacinados (tétano, vírus da diarreia viral bovina, *Clostridium* spp.) e submetidos a protocolos sanitários, também receberam a mesma suplementação durante a estação seca, de acordo com a rotina do campus. A prole foi desmamada aos sete meses de idade. Após o desmama, os animais foram separados em machos e fêmeas, independentemente do tratamento, durante toda a fase de recria, que durou 11 meses (maio de 2019 a abril de 2020). Mais detalhes sobre os touros na fase de criação podem ser encontrados em Polizel et al. (2021).

2.5 Bois

Foram selecionados 63 bois, 21 por tratamento de programação (NP, PP e PC) e alimentados com a mesma dieta. Ao final da fase de acabamento, os animais foram abatidos com peso corporal médio de $610 \pm$ kg.

2.6 Planejamento Alimentar

A fase de terminação durou 112 dias, onde os primeiros 14 dias foram para adaptar os animais às dietas e no restante do período os animais foram alimentados com dieta com alta inclusão de proteína e alta inclusão de energia consecutivamente. A inclusão de concentrado de cada dieta foi de 50%, 62% e 73%, respectivamente. Durante todo o período, os animais foram alimentados duas vezes por dia, em 7:00 (60% da ração

total) e 11:00 (40% da ração total), na forma de ração mista total (RMT). As dietas foram formuladas de acordo com o NRC (2016) e as proporções de ingredientes e composição química das dietas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 2: COMPOSIÇÃO E CONTEÚDO NUTRICIONAL DAS DIETAS DO CONFINAMENTO

Dietas	Inicial	Intermediária	Terminação
Inclusão do Concentrado (%)	50	62	73
Ingredientes (% de MS)			
Silagem de milho	50.00	38.75	27.50
Milho moído fino	34.90	50.88	67.05
Farelo de soja	12.60	7.50	2.20
Ureia	0.50	0.87	1.25
Flexbeef ¹	0.66	-	1.00
Flexbeef ^{MD2}	0.34	1.00	-
Flexbeef ^{MAX3}	1.00	1.00	1.00
Monensina	102.0	300.0	0.00
Virginiamicina, mg	250,0	250,0	250,0
Composição química			
MS ⁴ (%)	48.10	53.60	50.60
PB ⁴ (%MS)	15.00	14.00	13.00
PDR ⁴ (%MS)	10.31	10.18	10.00
FDN ⁴ (%MS)	36.50	31.10	25.80

FDNfe ⁴ (%MS)	26.20	20.80	15.50
Ca ⁴ (%MS)	0.66	0.61	0.55
P ⁴ (%MS)	0.38	0.37	0.35
K ⁴ (%MS)	1.00	0.81	0.61
S ⁴ (%MS)	0.20	0.17	0.13
EE ⁴ (%MS)	3.18	3.43	3.68
NDT ⁵ (%MS)	71.00	73.6	76.2

¹ Flexbeef, quantidade por kg de produto: 280g de cálcio, 15g de fósforo, 45g de enxofre, 75g de sódio, 22,5mg de cobalto, 750mg de cobre, 150mg de flúor, 25,5mg de iodo, 155g de magnésio, 1.005mg de manganês, 7,5 mg de selênio, 1.995mg de zinco e 142,5 UI de Vitamina A; ² Flexbeef MD, quantidade por kg de produto: mesma composição de Flexbeef, diferindo apenas pela adição de 3.000 mg de monensina de sódio; ² Flexbeef MAX: mesma composição de Flexbeef, diferindo apenas pela adição de 2.500mg de Virginiamicina; ⁴ Quantidade através de análise química; ⁵ Valor estimado pelo NRC (2016).

2.7 Incidência de Ruminites e Morfometria das Papilas Ruminais

Após o abate e evisceração dos animais, os compartimentos do rúmen foram separados, limpos com água corrente e classificados conforme a incidência de lesões (ruminites), seguindo metodologia descrita por Bigham e McManus (1975), com base em uma escala de 0 (sem lesões) a 10 (lesões ulcerativas por todo o rúmen). A classificação das papilas ruminais foram realizadas por uma pessoa treinada para este fim.

A análise de morfometria foi realizada de acordo com metodologia proposta por Daniel e colaboradores (2006) e Resende Junior e colaboradores (2006), em que uma amostra de 1 cm² foi coletada do saco cranial do rúmen e imediatamente colocada em recipiente contendo álcool 70% e armazenada até a realização da mensuração. A variável de morfometria analisada foi o número médio de papilas. O número médio de papilas em todo fragmento foi mensurado por um avaliador treinado.

2.8 Histologia das Papilas Ruminais

Para realização das análises histológicas foi seguida a metodologia adaptada de Odongo e colaboradores (2006). As amostras foram coletadas do saco ventral do epitélio ruminal e colocadas em fixador paraformaldeído tamponado 10%. Após 48 horas, os fragmentos foram removidos do fixador, em uma série crescente de álcoois, sendo eles, álcool a 70%, 95% e 100%, por 1 hora cada imersão, no processo de desidratação a amostra foi imersa por duas vezes em Xilol, logo após da desidratação ocorreu a imersão em parafina para o preparo do bloco, com o bloco pronto as amostras foram cortadas em uma secção de 3 μ m e logo após coloridas com uma série de hematoxilina e eosina.

Depois de preparada as lâminas, estas foram analisadas pelo “Analisador de Imagens Leica Qwin”, do microscópio eletrônico de luz Leica. As mensurações histológicas realizadas foram: espessuras das papilas, assim como a espessura de queratina do epitélio das papilas ruminais. As mensurações foram determinadas em quatro papilas por animal usando análise de imagem de microscópio de luz Leica auxiliado por computador.

2.9 Morfometria do Ceco

A avaliação das lesões ceco foi realizada após evisceração de bovinos. Todos os cecos foram lavados e pontuados. O epitélio cecal foi classificado de acordo com a presença de inflamação da parede do ceco, avaliando as lesões utilizando uma escala de 0 (sem lesões anotadas) a 10 (lesões graves), conforme adaptado de Bigham e McManus (1975). Todas as cecos foram pontuados visualmente por um indivíduo treinado.

Além disso, foi coletado um fragmento de 1 cm² do centro do epitélio ceco para avaliação histológica e preservado em solução de paraformaldeído 4% tamponada até

futuras análises histológicas (Devant et al., 2016). Para a análise histológica do epitélio cecal, as amostras de tecido foram desidratadas e incorporadas na parafina, seccionadas a 8 μm , coradas com hematoxilina e eosina. Medições histológicas como profundidade de cripta e células de cálice, foram determinadas em todas as criptas captadas pelo microscópio de cada animal, usando um Analisador de Imagem Leica Qwin dentro de um microscópio de luz eletrônica Leica.

2.10 Análise Estatística para Histologia e Morfometria Ruminal e Cecal

Os dados foram analisados por meio do Sistema de Análise Estatística (SAS 9). (Institute Inc., 2011). Antes da análise, foram avaliadas em relação à presença de informações discretas (outliers) e à normalidade dos resíduos pelo teste shapiro-wilk. Quando as instalações de normalidade não foram atendidas; então, os dados foram transformados. Os dados de rumenite, rúmen, morfometria cecal e medidas histológicas foram realizados utilizando-se o procedimento misto (PROC MIXED) e as comparações entre os tratamentos foram realizadas utilizando-se o teste Tuckey com 5% de significância.

2.11 Resultados e Discussão

2.11.1 Histologia e Morfometria Ruminal e Cecal

O ceco de animais no tratamento PC apresentou menor número de células de cálice, em comparação com os tratamentos de NP ($P < 0,01$), bem como menor profundidade cripta ($P < 0,01$). Por outro lado, o ceco de animais em tratamento PP apresentou profundidade de cripta igual em comparação com o tratamento de NP e menor número de células de cálice quando comparados ao tratamento NP. O número de papilas no rúmen foi maior para o tratamento PP, em comparação ao NP, porém, igual a PC

(P=0,01). Além disso, a espessura da papila e queratina não apresentou efeito significativo (P=0,34; P=0,63, respectivamente). Os resultados são mostrados na tabela abaixo.

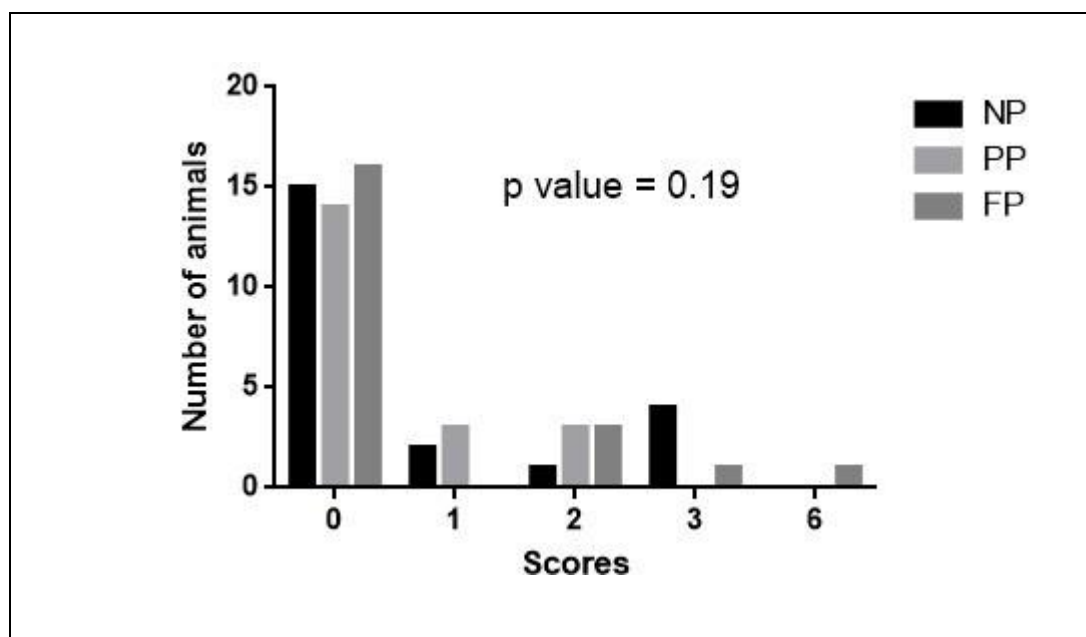
Tabela 2. Rúmen e morfometria cecal de nelore em diferentes tratamentos de programação fetal.

Variáveis	-	Tratamentos			Média	EPM	Valor P
		NP	PP	PC			
<i>Medidas de rúmen</i>							
<i>Variáveis macroscópicas</i>							
Número de papilas, n		101.3b	122.9a	111.2	78.47	13.246	0.01
<i>Variáveis microscópicas</i>							
Espessura da papila, μ		164.6	178.7	176.8	173.4	40.181	0.34
EQ, μ		12.55	12.75	12.19	12.49	2.144	0.63
<i>Medidas de ceco</i>							
Profundidade da cripta, μ		8.86a	10.40 ^a	6.47b	8.57	2.637	<0.01
Células de caliciformes, n		33.77a	19.70b	11.91c	21.79	9.078	<0.01

EPM: erro padrão da média; EQ: espessura de queratina; abc: letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste tuckey em 5% do nível de significância.

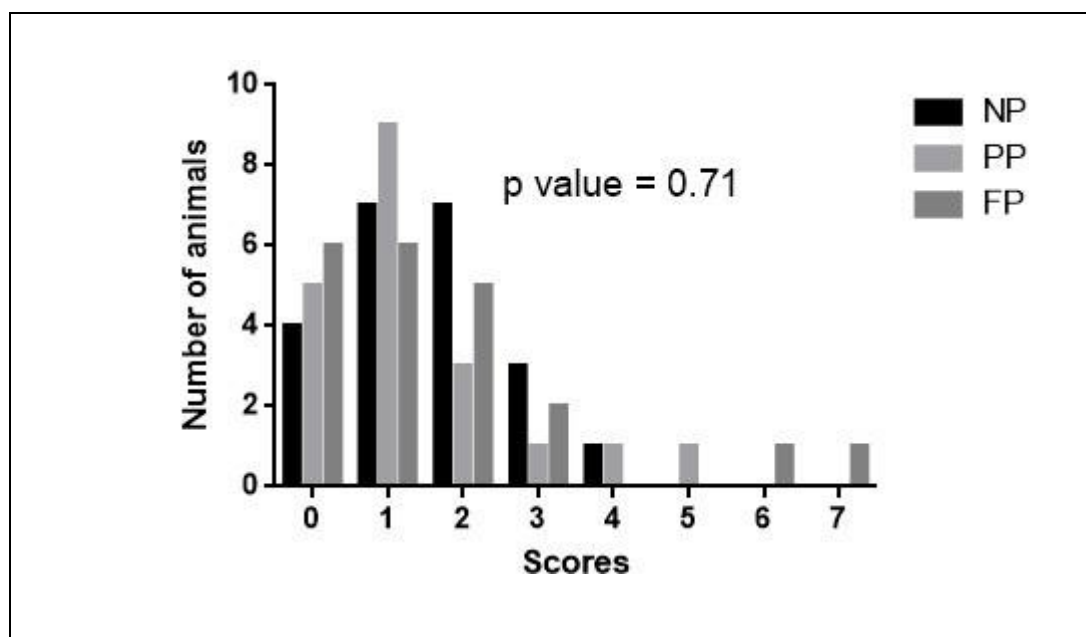
Embora 2 animais do tratamento PC apresentem um escore de ceco acima de 6,0, nem rumenite e nem escore de ceco apresentam efeito significativo (P=0,19; P=0,71, respectivamente). Ambos os resultados são apresentados nas figuras 1 e 2.

Figura 1. Escore de rumenite de nelore nos diferentes tratamentos de programação fetal.



Fonte: Autoria própria.

Figura 2. Avaliação do ceco de nelore em diferentes tratamentos de programação fetal.



Fonte: Autoria própria.

O presente estudo é inovador, e os dados encontrados na pesquisa geralmente auxiliam no desenvolvimento de mais trabalhos na área. Até o momento, não há estudo que avaliou o epitélio ruminal e cecal de animais a partir da programação fetal. De acordo

com pesquisas, a desnutrição materna pode influenciar a taxa de mortalidade neonatal, afetam a composição corporal, o desequilíbrio hormonal e até mesmo o desenvolvimento de órgãos (Long et al., 2009, Wu et al., 2006, Du et al., 2010, Mullinuks et al., 2013), mas não há pesquisas como a do presente estudo que avaliou a influência da suplementação da vaca durante a gestação no desenvolvimento e funcionamento do epitélio do rúmen e do ceco.

As células de cálice estão relacionadas ao principal produto secreto, o muco, mas as descobertas sobre a importância dessas células na imunologia do trato intestinal são novas. De acordo com Bichenough et al. (2015), as células de cálice formam a principal linha de defesa na mucosa intestinal, baseada principalmente na secreção da mucina (MUC²). Um grande exemplo de como as células de cálice estão sob regulação direta pelo sistema imunológico é a hiperplasia e a hipersecreção do muco associadas a infecções por helminto parasitárias (MARILLIER et al., 2008; OESER et al., 2014). No presente estudo, os animais do tratamento de NP apresentam o maior número de células de cálice e, em contraste, os animais de PP e PC apresentaram menor número de células de cálice. Além disso, observamos também um aumento da profundidade da cripta nos tratamentos de NP e PP, esse efeito normalmente coincide com o aumento da secreção mucosa (KOTUNIA et al., 2004), e pode explicar as alturas do número de células de cálice no tratamento de NP, mas não no tratamento de PP. Assim, podemos especular que os achados do presente estudo podem estar relacionados ao estado nutricional das matrizes durante a gestação, ou seja, à programação fetal.

O efeito da programação fetal está atualmente associado ao desenvolvimento muscular esquelético em animais ruminantes. No entanto, o início dos estudos de programação fetal foi originalmente desenvolvido a partir de dados epidemiológicos

humanos que ligam baixo peso ao nascer e má nutrição materna a uma incidência crescente de doença adulta (BARKER et al., 2002). Devido a isso e aos resultados demonstrados no presente estudo, podemos relacionar que o programa fetal em bovinos não está apenas associado ao desenvolvimento muscular, mas também com a imunologia do trato intestinal, e, segundo este estudo, animais de matrizes não-programadas são mais suscetíveis ao processo inflamatório e à demanda por mais produção de muco.

O desenvolvimento do trato gastrointestinal é importante para a prole desde o nascimento, onde o colostro é ingerido, uma vez que se tem um epitélio estomacal bem desenvolvido e intestinal permite uma maior absorção de nutrientes. Observou-se um estudo com cordeiros submetidos à programação fetal que os animais que as matrizes sofreram restrição alimentar apresentaram menor ingestão de imunoglobulina (IgG), enquanto os cordeiros de ovelhas suplementares apresentaram maior absorção de IgG, indicando que animais que tiveram boa nutrição no período de gestação têm maior capacidade de tirar proveito de moléculas grandes assim após o parto (Hammer et al., 2007). O presente estudo não avaliou os animais imediatamente após o parto, mas como se tem um ajuste e desenvolveu o trato intestinal, é possível utilizar mais os nutrientes.

A partir dos compartimentos do trato gastrointestinal, no presente estudo foram avaliados o rúmen e o ceco, neste caso o rúmen apresentou diferença significativa para quantidade de papilas e o ceco apresentou tanto em profundidade de cripta quanto em quantidade de células caliciformes. Em estudo (Duarte et al., 2013b; Long et al., 2010), avaliou o desenvolvimento de todos os compartimentos do trato gastrointestinal do bezerro submetido à programação fetal, foi possível notar um maior comprimento no intestino delgado dos animais que tiveram a suplementação das vacas durante a gestação, afirmando que animais que tiveram as matrizes suplementadas tem reflexo no tamanho

da área absorptiva no intestino, permitindo uma maior ingestão de nutrientes. Conforme apresentado no presente estudo, as vacas suplementadas no terço final da gestação podem oferecer um melhor desenvolvimento no epitélio cecal da prole, possibilitando maior utilização de nutrientes no intestino.

A restrição alimentar pode ter um grande efeito no desenvolvimento da fisiologia visceral da morfos, em estudo Cavalcanti et al. (2014) afirma que o animal ao passar por um processo de restrição alimentar pode ter a área de absorção do trato gastrointestinal afetado. In o presente estudo os animais não sofreram restrição alimentar e não foi possível observar diferenças significativas na espessura da papila, o que pode ocorrer ao fato de que a restrição nutricional foi aplicada às vacas, conseqüentemente uma possível restrição nutricional na fase de desenvolvimento da prole.

De Andrade et al. (2017) avaliaram a influência das ovelhas sem suplementação e suplementação no terço final de gestação, a fim de encontrar diferenças no desenvolvimento de papilas ruminais, onde encontraram maior incidência para o desenvolvimento de papila ruminal em cordeiros filhos de ovelhas que foram suplementadas no terço final da gestação como no presente estudo apresentado na tabela 2, onde os animais do tratamento pp apresentaram maior número de papilas quando comparados com outros tratamentos.

No presente estudo, a morfometria microscópica de rúmen não apresentou diferenças entre os tratamentos, mas um maior número de papilas rúmen estava presente no tratamento de PP, em comparação com o PN e não diferente do PC. Vários estudos demonstraram a influência da dieta na epitelial do rúmen, e de acordo com Dirksen et al. (1985), uma papila de rúmen grande aumenta a absorção de ácidos de gordura de cadeia curta (AGCC). Além disso, quanto mais desenvolvido for o epitélio ruminal, mais rápido

a absorção de AGCC se torna (ESTEVAM et al., 2020). No entanto, o presente estudo não teve como objetivo avaliar a produção do AGCC, portanto, não podemos supor que os animais provenientes de PP tiveram maior produção ou absorção de AGCC. Além disso, a ausência de diferenças significativas nas medidas microscópicas pode indicar que a dieta tem maior impacto no desenvolvimento epitelial do rúmen, uma vez que os animais foram alimentados com a mesma dieta, do que o estado nutricional das matrizes durante a gestação.

2.12 Conclusão

O presente estudo mostrou melhora na morfometria ceco de animais a partir da programação fetal, em contraste com os animais de não-programados. Esse achado é uma grande oportunidade para avançar nos estudos sobre nutrição pré-natal, uma vez que houve melhora anatômica nos órgãos contidos no presente estudo.

2.13 Referências Bibliográficas

- ABIEC. Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil. [s.l: s.n.]. Available in: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/>. Accessed: 4 Feb. 2022
- BARKER, D. J. et al., 1993. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *British Medical Journal*, v. 307, n. 6918, p. 1524-1527. <https://doi.org/10.1136/bmj.307.6918.1524>
- BARKER, D. J.; ERIKSSON, J. G.; FORSEN, T.; OSMOND, C., 2002. Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis. *Int. J. Epidemiol.* 31:1235–1239. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1518>
- BIRCHENOUGH, G., JOHANSSON, M., GUSTAFSSON, J.; BERSTROM, J.H; HANSSON, G.C., 2015. New developments in goblet cell mucus secretion and

function. *Mucosal Immunology*, v. 8, p. 712–719.

<https://doi.org/10.1038/mi.2015.32>.

CAVALCANTI, K.F.L.; BORGES, I.; SILVA, V.L.; SILVA, F.V.; SÁ, H.C.M.; MACIEL, I.C.F.; PAULA, F.A.P.; COSTA, E.H.O. 2014. Morphology of pre-stomach and ruminal papillae of growing Santa Inês female lambs under two nutritional schemes. *Research Brazilian Veterinary*, v.34, n.4, p.374-380, apr. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400013>

DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C.; CRUZ, F. J., 2006. Participação do rúmiculo e omaso na superfície absorptiva total do proventrículo de bovinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v. 43, p. 688-694. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26579>

DE ANDRADE, NOMAIACI. 2017. Nutrition of ewes in pregnancy and repercussion in the production of lambs: Fetal programming. p. 69-69 Available: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-206227>

DEVANT, M. et al., 2016. Behavior and inflammation of the rumen and cecum in Holstein bulls fed high-concentrate diets with different concentrate presentation forms with or without straw supplementation. *Journal of Animal Science*, v. 94, n. 9, p. 3902-3917. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0594>.

DIRKSEN, G. U.; LIEBICH, H. G.; MAYER, E. Adaptive changes of the ruminal mucous and their functional and clinical significance. *Bov. Pract*, v. 20, p. 116–120. 1985.

DU, M. et al., 2010. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *Journal of animal science*, v. 88, n. 13 Suppl. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2311>.

- Duarte MS, Paulino PVR, Das AK, Wei S, Serão NVL, Fu X, Harris SM, Dodson MV, Du M. 2013b. Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 91:2938-2946. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5892>
- DUARTE JÚNIOR, M. et al. Suplementação de fêmeas bovinas em pastejo: aspectos nutricionais e reprodutivos. *PubVet*, v. 9, n. 7, p. 321–336, 2016. ISSN: 1982-1263
- ESTEVAM, D.D.; PEREIRA, I.C.; RIGUEIRO, A.L.N.; PERDIGÃO, A.; DA COSTA, C.F.; RIZZIERI, R.A.; PEREIRA, M.C.S.; MARTINS, C.L.; MILLEN, D.D.; ARRIGONI, M.D.B. 2020. Feedlot performance and rumen morphometrics of Nelore cattle adapted to high-concentrate diets over periods of 6, 9, 14 and 21 days. *Animal*, v. 14, p. 2298-2307. <https://doi.org/10.1017/S1751731120001147>.
- GIONBELLI, T. R. S. et al. Intestinal development of bovine foetuses during gestation is affected by foetal sex and maternal nutrition. 2017. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 101, n. 3, p. 493-501. <https://doi.org/10.1111/jpn.12572>.
- Glore, S. R., and D. K. Layman. 1983. Cellular growth of skeletal muscle in weanling rats during dietary restrictions. *Growth* 47:403–410. PMID: 6199262.
- Hammer, C. J., K. A. Vonnahme, J. B. Taylor, D. A. Redmer, J. S. Luther, T. L. Neville, J. J. Reed, J. S. Caton, and L. P. Reynolds. 2007. Effects of maternal nutrition and selenium supplementation on absorption of IgG and survival of lambs. *J. Anim. Sci.* 85(Suppl. 1):391. (Abstr.)

- KOLLIAS, H. D.; McDERMOTT J. C. 2008. Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v. 104, p.579–587. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01091.2007>
- KOTUNIA, A.; WOLIŃSKI, J.; LAUBITZ, D.; JURKOWSKA, M.; ROMÉ, V.; GUILLOTEAU, P.; ZABIELSKI, R. 2006. Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets feed by artificial sow. *Journal of physiology and pharmacology*, v. 55, p. 59-6.
- Long MN, Prado-Cooper MJ, Krehbiel CR, DeSilva U, Wettemann RP. 2010. Effects of nutrient restriction of bovine dams during early gestation on postnatal growth, carcass and organ characteristics, and gene expression in adipose tissue and muscle. *J. Anim. Sci.* 88:3251-3261. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2512>.
- LONG, N. M. et al. 2009. Effects of early gestational undernutrition on fetal growth, organ development, and placentomal composition in the bovine. *Journal of Animal Science*, v. 87, n. 6, p. 1950–1959. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1672>
- MARILLIER, R.G. Michels, C., Smith, E.M.; FICK, L.C.E.; LEETO, M.; DEWALS, B.; HORSNELL, W. G.C.; BROMBACHER. 2008. F. IL-4/IL-13 independent goblet cell hyperplasia in experimental helminth infections. *BMC Immunol.* 9, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-9-11>
- MULLINIKS, J. T. et al. 2013. Supplementation strategy during late gestation alters steer progeny health in the feedlot without affecting cow performance. *Animal Feed Science and Technology*, v. 185, n. 3–4, p. 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.07.006>

Nissen, P. M., V. O. Danielson, P. F. Jorgensen, and N. Oksbjerg. 2003. Increased maternal nutrition of sows has no beneficial effects on muscle fiber number or postnatal growth and has no impact on the meat quality of the offspring. *J. Anim. Sci.* 81:3018–3027. <https://doi.org/10.2527/2003.81123018x>

ODONGO, N. E.; ALZAHAL, O.; LINDINGER, M. I.; DUFFIELD, T. F.; VALDES, E. V.; TERRELL, S. P.; MCBRIDE, B. W. 2006. Effects of mild stress and grain challenge on acid-base balance and rumen tissue histology in lambs. *Journal of Animal Science.* 84:447-455. <https://doi.org/10.2527/2006.842447x>

OESER, K.; SCHWARTZ, C.; VOEHRINGER, D. 2014. Conditional IL-4/IL-13-deficient mice reveal a critical role of innate immune cells for protective immunity against gastrointestinal helminths. *Mucosal Immunol.* <https://doi.org/10.1038/mi.2014.101>.

POOLE, Catherine A. et al. Ontogenesis of peptide transport and morphological changes in the ovine gastrointestinal tract. 2003. *Small Ruminant Research*, v. 50, n. 1-2, p. 163-176. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00103-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00103-2).

Polizel, G.H.G.; Strefezzi, R.F.; Cracco, R.C.; Fernandes, A.C.; Zuca, C.B.; Castellar, H.H.; Baldin, G.C.; Santana, M.H.A. Effects of Different Maternal Nutrition Approaches on Weight Gain and on Adipose and Muscle Tissue Development of Young Bulls in the Rearing Phase. *Trop. Anim. Health Prod.* 2021, 53, 536. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02982-y>

- REIS, R. A., RUGGIERI, A. C., CASAGRANDE, D. R.; PÁSCOA, A. G. 2009. Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38:147-159. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001300016>
- RESENDE JÚNIOR, J. C.; ALONSO, S. L.; PEREIRA M. N.; MAGALLANES, M. G. R., M.; DUBOC, G.; OLIVEIRA, E. C.; MELO, L. Q.. Effect of the feeding pattern on rumen wall morphology of cows and sheep. *Brazilian Journal of Veterinary. Res. and Animal Science*, v. 43, p. 526–536, 2006. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26469>
- Schalch Junior, F.J.; Polizel, G.H.G.; Cançado, F.A.C.Q.; Fernandes, A.C.; Mortari, I.; Pires, P.R.L.; Fukumasu, H.; Santana, M.H.A.; Saran Netto, A. 2022 Prenatal Supplementation in Beef Cattle and Its Effects on Plasma Metabolome of Dams and Calves. *Metabolites*, 12, 347. <https://doi.org/10.3390/metabo12040347>.
- WU, G. et al. 2006. Board-invited review: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *Journal of Animal Science*, v. 84, n. 9, p. 2316–2337. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-156>.

3. Capítulo 2: Investigação da metagenômica 16S do rúmen e fezes associada a programação fetal em bovinos de corte

Resumo:

Este trabalho buscou investigar a influência da programação fetal no microbioma de 15 bovinos Nelore terminados em confinamento com aproximadamente 22 meses de idade por meio de metagenômica 16S de amostras de fezes e do rúmen. As progenitoras desses animais foram submetidas a três tratamentos: NP – Não programado, PP – Parcialmente Programado e PC – Programação Completa. Todos os tratamentos receberam suplementação mineral (0,03% de peso vivo), mas apenas os tratamentos de PP e PC receberam suplementação proteico energético equivalente a 0,3% do peso vivo por dia durante a gestação. O grupo PP foi submetido a este protocolo nutricional no terço final da gestação, enquanto o PC submetido a suplementação durante todo o período de gestação. Após o nascimento, os animais recebem os mesmos tratamentos até o abate. O conteúdo ruminal foi coletado logo após o abate e evisceração do rúmen, já as fezes dos animais foram coletadas após sessenta dias de confinamento. Os resultados demonstraram diferença entre os dois locais de coleta de amostra, em volume de microrganismos e diversidade. Porém, não houve nenhuma diferença significativa entre os tratamentos no microbioma dos animais avaliados nesse experimento.

Palavras-Chave: Nutrigenômica, microbioma, sequenciamento, microorganismo, ASV.

3.1 Introdução

Em 2020, o Produto Interno Bruto (PIB) da pecuária (R\$ 747,05 bilhões) correspondeu a 10% do PIB nacional (ABIEC, 2021). Além disso, em 2020 o saldo da balança do agronegócio (US\$ 82 bilhões) foi responsável por manter positivo o saldo da balança comercial brasileira em mais de US\$ 50 bilhões (ABIEC, 2021). Contudo, apesar de que o Brasil produziu 10,18 milhões de toneladas equivalentes em carcaça (TEC) com mais de 188 milhões de animais, os EUA com cerca da metade dos animais produziram 12,34 TEC no ano de 2020 (ABIEC, 2021). Sendo assim, é necessário que se busque

intensificar a produção para atingir bons índices de produtividade como eficiência alimentar e qualidade de carcaça.

A programação fetal pode ser compreendida como o estímulo na nutrição materna através de suplementação que gera impacto no desenvolvimento da cria em todo período de sua vida (MOREIRA et al., 2019). Segundo Zhu et al. (2004) a produção das fibras musculares ocorre apenas durante a gestação e no decorrer da vida elas se desenvolvem. Ademais, estudos demonstraram que a falta desse ambiente ideal na gestação pode comprometer a produção de carne e gordura no produto final (DU et al., 2015), animais com estímulo nutricional pré-natal podem atingir ganho de peso que animais sem tal estímulo (GREENWOOD; CAFE, 2007), e as fêmeas filhas de matrizes suplementadas também apresentaram maturidade sexual mais cedo que fêmeas não suplementadas (FUNSTON; LARSON; VONNAHME, 2010; MARTIN et al., 2007).

Também existem indícios que os primeiros microrganismos se instalam no trato gastrointestinal (TGI) durante a gestação (GUZMAN et al., 2015; JIAO et al., 2015), levando a questionar a correlação de um melhor ambiente uterino com os microrganismos que se instalam. Sabemos que para os bovinos os microrganismos do TGI são de fundamental importância para a alimentação, pois são eles que transformam a fibra vegetal em ácidos graxos voláteis, produzem vitaminas e proteínas microbianas (CLEMMONS et al., 2021). Sendo correlacionados também a uma maior eficiência alimentar (CLEMMONS et al. 2019), estes também diretamente impactam na produtividade do sistema. Portanto, o objetivo desse trabalho é investigar se a nutrição pré-natal afeta o microbioma do rúmen e das fezes de animais após o período de terminação dos animais.

3.2 Objetivos

3.2.1 *Objetivo Geral*

O trabalho tem como objetivo geral, avaliar a influência da programação fetal no microbioma ruminal e fecal de novilhos, filhos dessas matrizes.

3.2.2 *Objetivos Específicos*

- a. Quantificar e qualificar população microbiana presente no rúmen por meio de sequenciamento do DNA.
- b. Avaliar microorganismos presente nas fezes.
- c. Relacionar as diferenças no microbioma ruminal e fecal com a nutrição pré-natal e associar as possíveis diferenças com desempenho dos animais.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Local do experimento

O projeto foi realizado no setor de confinamento de bovino de corte da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizada em Pirassununga-SP. Todos os protocolos envolvendo estes animais foram aprovados pelo Comitê de Ética ao Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP – Protocolo CEUA nº 1843241117).

3.3.2 Manejo Materno de Programação Fetal

As progenitoras foram inseminadas artificialmente em tempo fixo (IATF) com sêmen de 4 reprodutores com valores genéticos conhecidos. As vacas foram divididas

com os seguintes critérios: idade, peso e score corporal, formando três grupos com 42 animais da raça Nelore. Todas foram mantidas em piquetes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com bebedouro e cocho para a suplementação. Os grupos foram NP – Não programado, PP – Programação parcial e PC – Programação completa. Todos os animais receberam sal mineral (0.03% peso corporal), o grupo CP recebeu suplementação proteico energética a 0.3% peso corporal durante toda a gestação. O grupo PP apenas no terço final de gestação, e o grupo NP não recebeu.

3.4 Manejo dos Animais

Após o parto, o fornecimento do suplemento proteico-energético foi cessado, e os animais agrupados independente do plano nutricional. Todos os animais foram submetidos aos mesmos protocolos de vacinação e sanitário, receberam a mesma alimentação e mesma suplementação na época de seca, de acordo com a rotina já implementada na produção de bovinos de corte na FZEA/USP. A progênie foi desmamada aos sete meses de idade. Após a desmama, os animais foram separados em machos e fêmeas, independentemente do tratamento, por toda a fase de recria, que teve duração de 11 meses. Para a realização do estudo foram utilizados 15 novilhos, sendo 5 provenientes de cada tratamento (NP, PP e PC). Na fase de terminação esses animais foram confinados com peso inicial médio de 430 quilos durante o período de 119 dias e foram abatidos com peso médio final de 610 quilos, os animais foram mantidos em baias coletivas, a alimentação foi realizada 2 vezes ao dia na forma de ração total misturada com vagão misturador.

3.5 Coleta de Fezes

As fezes dos animais foram coletadas durante o período de confinamento, realizando uma coleta durante todo o período. As amostras fecais foram coletadas e armazenadas em crio tubo livre de DNase e RNase, no momento da coleta as amostras foram armazenadas em nitrogênio para posteriormente serem armazenadas em -80°C, onde permaneceram até serem analisadas.

A extração do DNA foi realizada com o kit comercial Macherey Nagel NucleoSpin Tissue®, 200µl de fezes foram adicionados a 1ml Tris – EDTA (TE), e centrifugado a 4000g durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento formado na centrifugação ressuspenso em 200 µl do tampão T1 mais 25 µl de proteinase K, e mantidos por 12 horas a 56°C. Após a incubação, foi adicionado 200 µl do tampão B3, agitado em vórtex, e incubado por 70°C durante 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 210 µl de EtOH (100%).

O ácido nucléico extraído foi submetido à técnica de Nested – PCR, utilizando primers específicos para gênero *Cryptosporidium* (XIAO et al. 2000). Foram utilizados os seguintes primers: Primeira reação: 5' - TTCTAGAGCTAATACATGCG- 3'; 5' – CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA – 3'. Segunda reação: 5' – GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG- 3'; 5' – AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A – 3'. Após a amplificação da segunda reação, obtém-se um fragmento de 825pb do DNA, a fim de descobrir quais os microrganismos presentes no meio a ser analisado. As reações foram executadas em triplicata, para cada amostra, para cada reação foram utilizados 12,5 µL de Mix 2,5mM, 0,5 µL de cada um dos primers (20nM), 0,25 µL de Platinum® Taq DNA Polimerase (1,2U/µL), 9,25 µl de água ultrapura e 2 µL de DNA.

As condições de ciclagem foram as mesmas em ambas as reações, 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma etapa de extensão final 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com Syber SAFE®, e as bandas registradas através de câmera fotográfica acoplada à fonte de luz UV.

3.6 Sequenciamento das Comunidades Bacterianas Ruminais

O conteúdo ruminal de todos os animais (n = 63) foi coletado no momento do abate, e armazenado em -80°C, porém apenas amostras de 15 animais foram analisadas, sendo 5 de cada tratamento (PC, PP, NP). O total de DNA foi extraído por ruptura mecânica e protocolo de extração fenólica, e então todas as amostras foram ressuspensas em buffer de eluição de DNA, e conseqüentemente quantificadas pelo Qubit Fluorometer (Invitrogen, San Diego, EUA) e armazenadas a -80°C. Todas as amostras foram diluídas a 10ng de DNA por µl para garantir no mínimo 50ng por reação de PCR.

O procedimento da PCR foi realizado por meio da utilização de *primers* universais que flanqueiam a região variável 4 (V4) do gene bacteriano 16S RNAr de acordo com Dill-McFarland et al. (2017). As amostras que apresentaram bandas brilhantes em torno de 380 bp foram coletadas do gel para posteriormente passar pelo processo de extração e sequenciamento por meio do MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). As seqüências obtidas do Illumina MiSeq foram processadas utilizando-se o software Mothur v.1.40.0 (www.mothur.org/wiki), as quais foram alinhadas contra a base de dados referência chamada de SILVA 16S rDNA segundo Dill-McFarland et al. (2017). Foram calculadas a diversidade alpha (diversidade da comunidade bacteriana para cada animal) por meio da estimativa Chao, que mede a riqueza de espécies bacterianas da amostra, e Shannon, que calcula o índice de diversidade microbiana. Da mesma forma, a diversidade beta foi

calculada, medindo as diferenças entre a composição das comunidades bacterianas entre animais, por meio dos testes de Bray-Curtis e Jaccard. Além disso, abundâncias relativas de comunidades bacterianas de interesse e daquelas que se mostraram em maior número também foram determinadas (Weimer et al., 2017).

3.7 Análise de Dados e Estatística

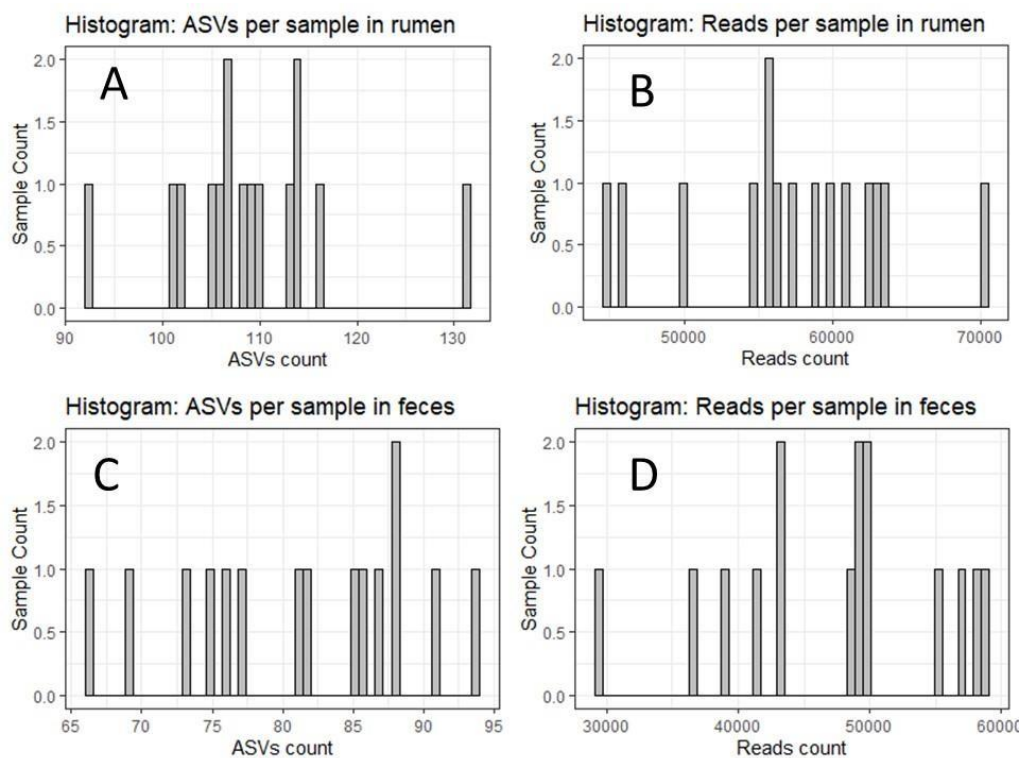
Todas as análises bioinformáticas foram feitas através do software Rstudio (R TEAM, 2021; RSTUDIO TEAM, 2021) pela plataforma Bioconductor (HUBER et al., 2015; GENTLEMAN et al., 2004). Os dados brutos de sequenciamento foram carregados no pacote DADA2 (CALLAHAN et al., 2016), onde foi feito o controle de qualidade, poda e atribuição de taxonomia através do banco de dados SILVA (GLÖCKNER et al., 2017). A tabela de ASV, taxonomia, dados dos animais, sequências e árvore filogenética foram convertidas a um objeto phyloseq-class do pacote Phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013) o qual foi utilizado para realizar as filtrações dos outliers, eliminando os filões que representaram menos que 0,01% da abundância total. As taxas que não estão em pelo menos 5% das amostras, foram então aglomeradas em nível de gênero e família, e todas aquelas que não apresentam informação de família foram retiradas da análise. Então o phyloseq-class foi convertido a um DGEList pelo pacote edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) para se calcular o diferencial de abundância das amostras através do Limma Voom (LAW et al., 2014). Os gráficos foram feitos pelo pacote ggplot2 (WICKHAM, 2009).

3.8 Resultados

Os resultados do sequenciamento 16S do rúmen, das fezes e o controle de qualidade através do DADA2 podem ser observados na Figura 1. Onde nota-se que tanto

o volume como a diversidade das amostras de rúmen foram superiores às amostras de fezes. Tendo o rúmen de 90 a 130 ASVs diferentes em 45000 a 70000 reads nas 15 amostras. Já as fezes com 65 a 95 ASVs em 30000 a 60000 reads nas 15 amostras.

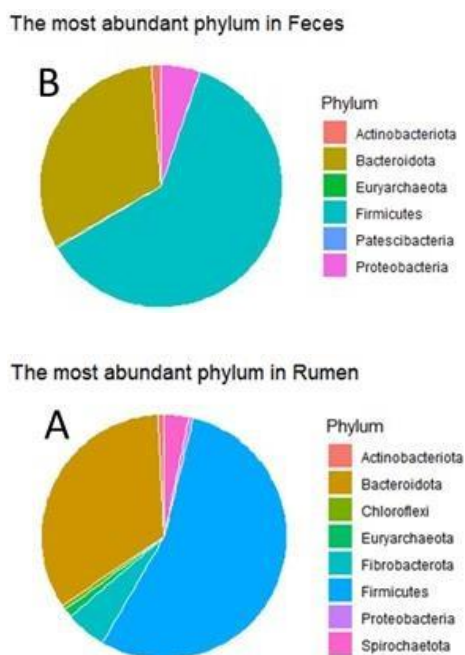
Figura 1. Histograma de leitura (A & C) e ASV (B & D) para rúmen (A & B) e fezes (C & D) por amostra.



Na Figura 2 é possível observar os filós de bactérias nos dois ambientes distintos que representaram pelo menos 1% da abundância total, resultando em 8 e 6 filós no rúmen e fezes, respectivamente. Em ambos os sítios firmicutes e bacteroidota foram os filós predominantes. Também tiveram em comum a actinobacteriota, Euryarcheota e proteobacteria. No rúmen, por ter uma maior diversidade de ASVs, conforme a figura 1,

nota-se que estas também possuem uma maior abundância. Em ambos os sítios o filo bacteroidota representa cerca de 1/3 dos mais abundantes.

Figura 2. Gráfico circular de abundância no local de coleta da amostra, A no rúmen e B nas fezes.



Os táxons que tiveram maior abundância nas amostras estão disponíveis nas tabelas 1 e 2. Nas tabelas, é possível notar que o gênero e a classe mais incisivos no TGI (trato gastrointestinal) dos animais são o *Prevotella* e *Clostridia*, respectivamente. No rúmen nota-se outros táxons presentes de distintas famílias, exemplo prático da maior

diversidade dessa região. Já nas fezes, observa-se nitidamente a abundância superior da família *Lachnospiraceae*.

Tabela 1. ASVs mais abundantes no sequenciamento 16S do rúmen

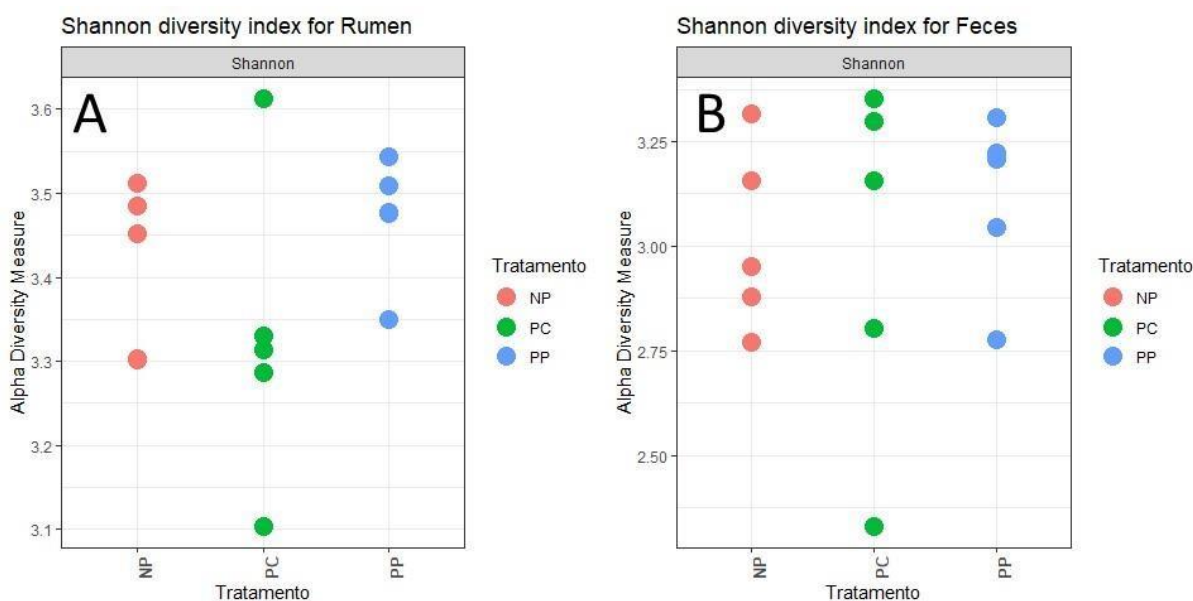
AVS	Prevalence	<u>Total Abundance</u>	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
ASV1440	15	119904	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
ASV3278	15	69851	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Christensenellales	Christensenellaceae	Christensenellaceae_R-7_group
ASV3055	15	58166	Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Acidaminococcales	Acidaminococcaceae	Succiniclasticum
ASV617	15	49365	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae_RC9_gut_group
ASV1787	15	45785	Bacteria	Fibrobacterota	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	Fibrobacter
ASV784	15	40905	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	F082	NA
ASV4449	15	36740	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	NA
ASV3440	15	34880	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	NK4A214_group
ASV4653	15	34174	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_NK3A20_group
ASV3908	15	31554	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus

Tabela 2. ASVs mais abundantes no sequenciamento 16S de fezes

AVS	Prevalence	<u>Total Abundance</u>	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
ASV1490	15	127598	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
ASV4556	15	61220	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	NA
ASV4965	15	41327	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Blautia
ASV3693	15	39565	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium_sensu_stricto_1
ASV2022	15	39074	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	Turicibacter
ASV2773	15	34951	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Peptostreptococcaceae	Romboutsia
ASV1455	15	31118	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	NA
ASV2661	15	30781	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Succinivibrionaceae	Succinivibrio
ASV4496	15	26519	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Agathobacter
ASV3846	15	25090	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Faecalibacterium

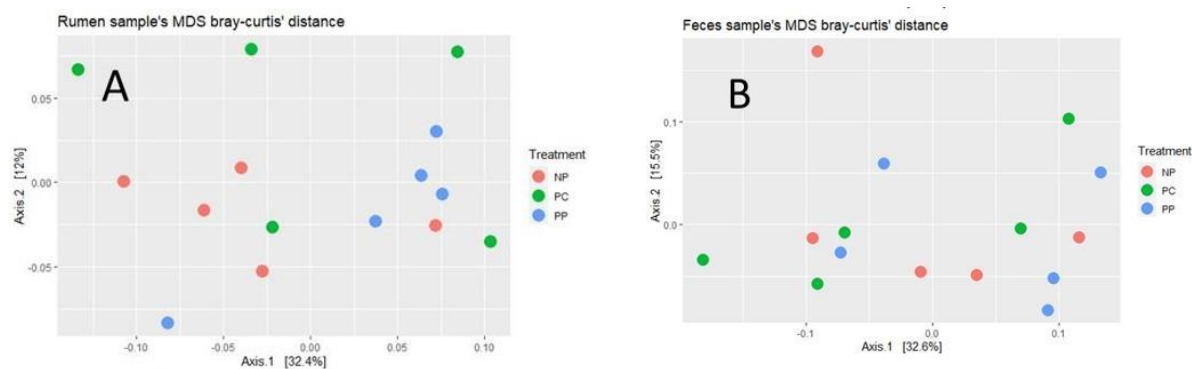
Na figura 3, é possível observar a alfa diversidade de Shannon separada pelos 3 tratamentos, onde apesar de um animal desviar dos demais com níveis mais baixos, não há diferenças significativas para o tratamento. A alfa diversidade serve para medir o tamanho da diversidade dentro daquela amostra. Outras métricas de alfa diversidade foram testadas e nenhuma apresentou-se significativa para esses dados.

Figura 3. Diversidade Alpha de Shannon no rúmen (A) e fezes (B)



A beta diversidade é a diferença que existe de uma amostra à outra através do cálculo de dissimilaridade de Bray-Curtis. Na figura 4 observa-se essas betas diversidades do rúmen (A) e das fezes (B). É possível notar que não houve agrupamento significativo e nem dissimilaridade significativa desses dados, os quais podem ser observados pelos eixos que apresentam 32,4% e 12% para o rúmen e 32,6% e 15,5% para as fezes.

Figura 4. Diversidade beta de Bray-curtis' de rúmen (A) e fezes (B).



Um dos principais objetivos desse trabalho foi investigar a abundância diferencial de microrganismos nos diferentes tratamentos. A Tabela 3 mostra a tendência de abundância diferencial no rúmen, enquanto na Tabela 4 nota-se o resultado nas fezes. Não houve nenhum valor P ajustado significativo para os tratamentos em nenhum dos sítios de coleta dos microrganismos. Foram dispostos nas tabelas somente os microrganismos com P valor ≤ 0.1 , que foram 5 famílias diferentes no rúmen e 2 famílias diferentes nas fezes. Os microrganismos que mais se aproximaram de ter alguma tendência diferencial entre os grupos foi a família *Bacteroidales BS11* com P valor ajustado = 0.13 e o P valor < 0.01 , sendo mais abundante em animais não tratados.

Tabela 3. Tendência de abundância diferencial de rúmen

AVS	Taxa	logFC	AveExpr	P.Value	adj.P.Val	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
ASV695	ASV695	51608000	9536058	0.0032615	0.1304584	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidales_BS11_gut_group	NA
ASV3637	ASV3637	0.7767834	15000784	0.0285711	0.5406086	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridia_or	Hungateiclostridiaceae	NA
ASV3908	ASV3908	0.7347828	15555953	0.0405456	0.5406086	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	NA
ASV4260	ASV4260	14191540	9756612	0.0673547	0.6008402	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Defluviitaleaceae	NA
ASV3651	ASV3651	32445290	6726768	0.0751050	0.6008402	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Monoglobales	Monoglobaceae	NA

Tabela 4. Tendência de abundância diferencial em fezes

AVS	Taxa	logFC	AveExpr	P.Value	adj.P.Val	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
-----	------	-------	---------	---------	-----------	---------	--------	-------	-------	--------	-------

ASV4556	ASV4556	0.4813119	18017552	0.0522220	0.9885435	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	NA
ASV2058	ASV2058	-30934575	7047688	0.0860555	0.9885435	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	NA

3.9 Discussão

O objetivo desse trabalho foi investigar se há influência da programação fetal no microbioma de indivíduos no final da vida, analisando através de metagenômica 16S com primer V3. Observou-se que o efeito do tratamento não influenciou o microbioma ruminal e fecal ao final da vida dos animais. Trabalhos demonstraram que o microbioma do líquido amniótico e da placenta (GUZMAN et al., 2015) são idênticos e que estes se assemelham mais ao microbioma da boca que do trato vaginal (AAGAARD et al., 2014; CHOI; SONG, 2017). Outros estudos demonstraram que antes do desenvolvimento completo do rúmen, nos primeiros dias de vida, há presença de microrganismos fibrolíticos da câmara fermentativa (JIAO et al., 2015). A hipótese é que durante a gestação os animais ingerem esses microrganismos do líquido amniótico, e os mesmos consigam sobreviver até a maturação do rúmen através do consumo exclusivo de leite do animal (GUZMAN et al., 2016). Portanto, a diferença entre os tratamentos de programação fetal devem ser mais aparentes no início da vida dos animais.

Os resultados desse trabalho mostraram uma prevalência nítida de dois filos de bactéria *Firmicutes* e *Bacteroidota*, concordando com outros trabalhos que avaliaram o trato digestivo de ruminantes (BRULC et al., 2009; EDWARDS et al., 2004; THOMAS et al., 2017; WALLACE et al., 2015), aves (YAN et al., 2017) e suínos (LAMENDELLA et al., 2011; LOOFT et al., 2014; YANG et al., 2017). A diferença entre os resultados do rúmen e das fezes também já foi demonstrado por outros trabalhos, onde as variações do microambiente do TGI favorecem o desenvolvimento de certos microrganismos (LOPES

et al., 2019; TURNBAUGH; GORDON, 2009). Porém, não é somente localização que altera o microbioma, a alimentação também é decisiva na seleção de quais microrganismos serão os mais predominantes (CHEN et al., 2011; PETRI et al., 2012, 2013a, 2013b). Além disso, já foi demonstrado que em animais saudáveis o gênero mais prevalente de microrganismo no TGI é o *Prevotella* (PETRI et al., 2013b), concordando com nossos resultados, sendo a família mais presente nas fezes a *Lachnospiraceae*, concordando com outros trabalhos em gado Nelore (LOPES et al., 2019), que os encontraram em maior abundância em todo TGI. Essa família possui habilidades de degradar fibras e proteínas e está correlacionada a maior eficiência alimentar (LOPES et al., 2019).

A análise de alfa e beta diversidade serve para avaliar qual a riqueza de microrganismo das amostras e qual a dissimilaridade entre elas, respectivamente. A alfa diversidade de Shannon calcula a riqueza pelo número de organismos encontrados e número de espécies encontradas. Na figura 3 podemos observar que um animal do tratamento PC teve menor riqueza ecológica que demais, o que pode ser resultado de possível acidose subclínica ou uso de antibióticos próximo às coletas de amostras, já os demais animais não apresentaram diferença significativa pelo tratamento. Na figura 4 o MDS calculado pela dissimilaridade de Bray-curtis das amostras, onde nenhuma das coordenadas principais (eixos) explicou mais que 33% da variação dos dados, apesar de iniciar a demonstrar alguns agrupamentos. Portanto, todas as amostras apresentaram similaridade entre si, o que corrobora com os demais resultados desse trabalho. A abundância diferencial entre os tratamentos foi calculada através da estratégia Lima Voom do EdgeR, é consolidada para expressão diferencial de transcritos (LAW et al., 2014; ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) e adaptada para análise de dados

metagenômicos (CALLE, 2019; MCMURDIE; HOLMES, 2014; WEISS et al., 2017). Ela normaliza dos dados conforme o modelo estatístico empregado, nesse caso com fator tratamento de três níveis, e apresenta qual informação está diferencialmente expressa em cada nível de tratamento. Não houve nenhum P valor ajustado significativo, conforme exposto nas tabelas 3 e 4, o que pode ser consequência de um pequeno número de animais no estudo. Porém, a família *Bacteroidales BS11* apresentou um P valor menor que 0.01 e o menor p-valor ajustado próximo a tendência nas amostras do rúmen. A maior abundância em animais NP pode ter correlação maior, porém um número maior de animais deve ser investigado para qualquer conclusão. Essa família de microrganismo foi descrita como correlacionado a uma dieta rica em hemicelulose, lignina e pobre em proteína em Alces-do-Alasca (SOLDEN et al., 2016). Caso sejam de fato correlacionados essas famílias com animais NP, pode-se relacionar à condição da fermentação ruminal de volumoso apenas por parte da mãe durante a seca de 2019.

3.10 Conclusão

Apesar de que a programação fetal é uma ferramenta para melhorar os índices de produtividade de animais, não houve diferença significativa nos microrganismos do rúmen e das fezes no final da vida dos animais programados. Conforme os resultados demonstrados na seção anterior, notou-se também que o rúmen possui maior diversidade e abundância de microrganismos que as fezes. Sendo principalmente compostas pelos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Não houve diferença significativa na riqueza das amostras associada ao tratamento e nem clusterização na dissimilaridade. Também não houve abundância diferencial significativa neste trabalho. Essa ausência de efeito do tratamento se deve ao fato de ele ter sido aplicado na matriz dos indivíduos durante a gestação e o resultado avaliado no fim da vida desses animais. Desse modo, apesar de que

estudos com populações maiores possam melhorar esses resultados, devido à distância de quando se aplicou o tratamento e o momento da coleta não é possível afirmar no presente trabalho que a programação fetal tem influência sobre a microbiota do TGI de bovinos da raça Nelore adultos.

3.11 Referências

AAGAARD, K. et al. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 237, 21 maio 2014.

ABIEC. Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/>>. Acesso em: 4 fev. 2022.

BARKER, D. J. et al. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. **BMJ**, v. 307, n. 6918, p. 1524–1527, 11 dez. 1993.

BRULC, J. M. et al. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1948–1953, 10 fev. 2009.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, jul. 2016.

CALLE, M. L. Statistical Analysis of Metagenomics Data. **Genomics & Informatics**, v. 17, n. 1, p. e6, 31 mar. 2019.

CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement_1, p. 4516–4522, 15 mar. 2011.

CHEN, Y. et al. Changes in Bacterial Diversity Associated with Epithelial Tissue in the Beef Cow Rumen during the Transition to a High-Grain Diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5770–5781, 15 ago. 2011.

CHOI, Y.-S.; SONG, I. G. Fetal and preterm infant microbiomes: a new perspective of necrotizing enterocolitis. *Korean Journal of Pediatrics*, v. 60, n. 10, p. 307, 2017.

CLEMMONS, B. A. et al. Rumen Bacteria and Serum Metabolites Predictive of Feed Efficiency Phenotypes in Beef Cattle. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 19265, dez. 2019.

CLEMMONS, B. A. et al. Ruminal Protozoal Populations of Angus Steers Differing in Feed Efficiency. *Animals*, v. 11, n. 6, p. 1561, 27 maio 2021

DU, M. et al. Fetal programming in meat production. **Meat Science**, v. 109, p. 40–47, nov. 2015.

E. EDWARDS, J. et al. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 3, p. 263–281, out. 2004.

FUNSTON, R. N.; LARSON, D. M.; VONNAHME, K. A. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: Implications for beef cattle production1. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. suppl_13, p. E205–E215, 1 abr. 2010.

GENTLEMAN, R. C. et al. [No title found]. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GLÖCKNER, F. O. et al. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology*, v. 261, p. 169–176, nov. 2017.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. Fetal nutrition and adult disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 1344S-1352S, 1 maio 2000.

GREENWOOD, P. L.; CAFE, L. M. Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: long-term consequences for beef production. **Animal**, v. 1, n. 9, p. 1283-1296. 2007.

GUZMAN, C. E. et al. Presence of Selected Methanogens, Fibrolytic Bacteria, and Proteobacteria in the Gastrointestinal Tract of Neonatal Dairy Calves from Birth to 72 Hours. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133048, 17 jul. 2015.

GUZMAN, C. E. et al. Uptake of milk with and without solid feed during the monogastric phase: Effect on fibrolytic and methanogenic microorganisms in the

gastrointestinal tract of calves: response of microbial communities in calves. **Animal Science Journal**, v. 87, n. 3, p. 378–388, mar. 2016.

HUBER, W. et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. **Nature Methods**, v. 12, n. 2, p. 115–121, fev. 2015.

JIAO, J. et al. Rumen development process in goats as affected by supplemental feeding v . grazing: age-related anatomic development, functional achievement and microbial colonisation. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 6, p. 888–900, 28 mar. 2015.

LAMENDELLA, R. et al. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 103, dez. 2011.

LAW, C. W. et al. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. **Genome Biology**, v. 15, n. 2, p. R29, 2014.

LOOFT, T. et al. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *The ISME Journal*, v. 8, n. 8, p. 1566–1576, ago. 2014.

LOPES, D. R. G. et al. The Bacterial and Fungal Microbiota of Nelore Steers Is Dynamic Across the Gastrointestinal Tract and Its Fecal-Associated Microbiota Is Correlated to Feed Efficiency. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1263, 25 jun. 2019.

MARTIN, J. L. et al. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves¹. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 3, p. 841–847, 1 mar. 2007.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.

MOREIRA, Elizângela Mírian et al. Programação fetal e efeito da suplementação pré-parto sobre o desempenho produtivo e reprodutivo da progênie: **Revisão. Pubvet**, v. 13, p. 152, 2019.

PETRI, R. M. et al. Changes in the Rumen Epimural Bacterial Diversity of Beef Cattle as Affected by Diet and Induced Ruminal Acidosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3744–3755, 15 jun. 2013a.

PETRI, R. M. et al. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage: Characterization of rumen bacterial diversity in feedlot cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 6, p. 1152–1162, jun. 2012.

PETRI, R. M. et al. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. e83424, 31 dez. 2013b.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. [s.l.]: R Foundation for Statistical Computing, 2021.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. Boston, MA: **RStudio**, PBC, 2021.

SOLDEN, L. M. et al. New roles in hemicellulosic sugar fermentation for the uncultivated Bacteroidetes family BS11. *The ISME Journal*, v. 11, n. 3, p. 691–703, mar. 2017.

THOMAS, M. et al. Metagenomic characterization of the effect of feed additives on the gut microbiome and antibiotic resistome of feedlot cattle. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12257, dez. 2017.

TURNBAUGH, P. J.; GORDON, J. I. The core gut microbiome, energy balance and obesity: The core gut microbiome, energy balance and obesity. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 17, p. 4153–4158, 1 set. 2009.

WALLACE, R. J. et al. Archaeal abundance in post-mortem ruminal digesta may help predict methane emissions from beef cattle. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 5892, maio 2015.

Weimer, P. J.; Cox, M. S.; Paula T. V.; Lin, M.; Hall, M. B.; Suen, G. Transient changes in milk production efficiency and bacterial community composition resulting from near-total exchange of ruminal contents between high- and low-efficiency Holstein cows. **Journal of Dairy Science**.100:7165–7182, 2017.

WEISS, S. et al. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 27, dez. 2017.

WICKHAM, H. ggplot2. New York, NY: **Springer New York**, 2009.

XIAO, Y. et al. Coexistence of nitrifiers, denitrifiers and Anammox bacteria in a sequencing batch biofilm reactor as revealed by PCR-DGGE. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 2, p. 496-505, 2009.

YAN, W. et al. Gut metagenomic analysis reveals prominent roles of Lactobacillus and cecal microbiota in chicken feed efficiency. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 45308, maio 2017.

YANG, H. et al. Unraveling the Fecal Microbiota and Metagenomic Functional Capacity Associated with Feed Efficiency in Pigs. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1555, 15 ago. 2017.

ZHU, M.-J. et al. Effect of Maternal Nutrient Restriction in Sheep on the Development of Fetal Skeletal Muscle1. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1968–1973, 1 dez. 2004.

3.12 Conclusão Geral

Os resultados do presente estudo terão suma importância para auxiliar nas pesquisas futuras com o objetivo de avaliar epitélio ruminal e cecal e microbioma. Como apresentado nos resultados os dados do primeiro estudo apresentaram resultados para animais do tratamento PP no quesito desenvolvimento do epitélio cecal porém ao fazer uma comparação com microbioma não foi possível observar diferença significativa, com isso, o presente estudo deixa claro a importância do tema e que há a necessidade de desenvolver mais estudos nessa área e o presente trabalho irá contribuir com outros trabalhos que virão na área de programação fetal, microbioma ruminal histologia de rúmen e ceco.