

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VITAMINAS DO COMPLEXO B E HIDRÓXIMINERAIS
COBRE E ZINCO PARA BOVINOS NELORE CONFINADOS
ALIMENTADOS COM DIETA DE BAIXO OU ALTO AMIDO**

Maria Carolina Gonçalves de Arruda

Mestre em Zootecnia

2024

**T
E
S
E**

/

**A
R
R
U
D
A**

**M.
C.
G.**

**2
0
2
4**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VITAMINAS DO COMPLEXO B E HIDRÓXIMINERAIS
COBRE E ZINCO PARA BOVINOS NELORE CONFINADOS
ALIMENTADOS COM DIETA DE BAIXO OU ALTO AMIDO**

**Discente: Me. Maria Carolina Gonçalves de Arruda
Orientador: Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto
Coorientador: Dr. Rodrigo de Nazaré Santos Torres**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Zootecnia

A779v	<p>Arruda, Maria Carolina Gonçalves</p> <p>Vitaminas do complexo B e hidróximinerais cobre e zinco para bovinos Nelore confinados alimentados com dieta de baixo ou alto amido / Maria Carolina Gonçalves Arruda. -- Jaboticabal, 2024</p> <p>110 p. : tabs., fotos</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Otávio Rodrigues Machado Neto</p> <p>Coorientador: Rodrigo de Nazaré Santos Torres</p> <p>1. Zootecnia. 2. Ruminante. 3. Bovinos de corte. 4. Complexo de vitamina B. 5. Minerais na nutrição animal. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

REGISTRO DE IMPACTO

Esperamos que este trabalho seja utilizado com ponto de partida e/ou auxílio para a continuidade de estudos futuros sobre vitaminas do complexo B e hidróximinerais para bovinos de corte, uma vez que os resultados aqui apresentados mostraram melhora em alguns aspectos de interesse na nutrição que podem levar à melhora na eficiência de produção de carne bovina.

We hope that this work will be used as a starting point and/or aid for the continuation of studies on B vitamins and hydroxyminerals for beef cattle in the future, since the results presented here showed improvements in some aspects of interest in nutrition that can lead to improvements in beef production efficiency.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: VITAMINAS DO COMPLEXO B E HIDRÓXIMINERAIS COBRE E ZINCO PARA BOVINOS NELORE CONFINADOS ALIMENTADOS COM DIETA DE BAIXO OU ALTO AMIDO

AUTORA: MARIA CAROLINA GONÇALVES DE ARRUDA
ORIENTADOR: OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO
COORIENTADOR: RODRIGO DE NAZARÉ SANTOS TORRES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Zootecnia, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente



OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO
Data: 02/02/2024 08:00:46-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Profa.Dra. PRISCILLA DUTRA TEIXEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal de Lavras (ULFA) - Lavras/MG

Documento assinado digitalmente



PRISCILLA DUTRA TEIXEIRA
Data: 26/09/2023 13:05:13-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Prof. Dr. MATHEUS DENIZ (Participação Virtual)
Departamento Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente



MATHEUS DENIZ
Data: 03/06/2024 08:42:18-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Pesquisador Dr. GERMÁN DARIÓ RAMÍREZ ZAMUDIO (Participação Virtual)
Universidade de São Paulo - FZEA USP / Pirassununga/SP

Documento assinado digitalmente



GERMÁN DARIÓ RAMÍREZ ZAMUDIO
Data: 01/11/2023 11:02:56-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Prof. Dr. LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente



LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO
Data: 08/11/2023 11:04:53-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Jaboticabal, 01 de fevereiro de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA CAROLINA GONÇALVES DE ARRUDA, nascida em 16 de maio de 1994. Graduada em zootecnia pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) em 2017 sob orientação do Prof. Leandro das Dores Ferreira da Silva, realizou o estágio curricular na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Jaboticabal, onde deu início ao curso de mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Zootecnia em março de 2018, na área de nutrição de ruminantes, e foi bolsista CAPES durante esse período sob orientação da Prof^a Jane Maria Bertocco Ezequiel, finalizando o mestrado em fevereiro de 2020. Em março de 2020 iniciou no doutorado pelo mesmo programa, sob orientação do Prof. Otávio Rodrigues Machado Neto, onde foi bolsista CAPES por 3 anos e deu continuidade aos estudos com nutrição e ruminantes.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, que me permitiu seguir mesmo quando achei que não conseguiria. Jamais teria chegado até aqui sem Ele.

Aos meus pais, que me criaram com muita dedicação, me ensinaram virtudes, me apoiaram e celebraram cada conquista até aqui.

Ao meu orientador, professor Otávio, pela oportunidade de ingressar em um curso conceituado, pelos puxões de orelha, por trabalhar e aprender com ele e sua equipe.

Ao meu coorientador, Rodrigo, pela amizade, paciência e disponibilidade em ajudar sempre.

À Josiane, pela oportunidade de tocar este projeto, confiança e todo apoio.

À empresa Trouw Nutrition, pela oportunidade e apoio para desenvolver esse trabalho.

Aos colegas de trabalho que viraram grandes amigos ao longo desses anos todos. Mateus Rossi, Matheus Parra, Jean, Lucas, Luiz Antônio, Richard, Isabela, Flabiele, Hozane, Rafaela e Iasmin. Obrigada pela amizade, pelas brincadeiras, companheirismo, paciência e por todo esforço para me auxiliar e tornar esse projeto possível.

A todos os outros colegas de trabalho, que trabalharam arduamente para que esse projeto fosse desenvolvido. Vocês foram indispensáveis para a realização desse trabalho. Sem vocês isso não seria possível.

Aos componentes da banca, que aceitaram fazer parte do meu processo de obtenção do título de doutorado e na melhoria desse projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa, pois sem esse apoio não seria possível chegar aqui.

À UNESP pela estrutura e oportunidade oferecida.

A todas as diversas pessoas que me auxiliaram de alguma forma (e foram muitas), meu muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	8
1 Introdução	8
2 Revisão de Literatura	10
3 Objetivo	19
4 Referências Bibliográficas	19
CAPÍTULO 2 – Efeitos da inclusão de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e hidróximinerais Zn e Cu para bovinos Nelore confinados recebendo dietas de diferentes teores de amido sobre o desempenho, parâmetros de carcaça, qualidade da carne e histologia da parede ruminal	25
Resumo	25
Introdução	26
Material e métodos	27
<i>Animais e dietas</i>	27
<i>Abate e características de carcaça</i>	30
<i>Qualidade da carne</i>	32
<i>Análise estatística</i>	33
Resultados	34
Discussão	40
<i>Consumo, desempenho e parâmetros de carcaça</i>	40
<i>Morfologia e histomorfometria do epitélio ruminal e histopatologia do ceco</i>	42
<i>Qualidade da carne</i>	43
Conclusão	44
Referências Bibliográficas	44
CAPÍTULO 3 – Efeitos da inclusão de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e hidroximinerais Zn e Cu em dietas com diferentes níveis de amido sobre o transcriptoma do fígado de bovinos Nelore confinados	52
Resumo	52
Introdução	53
Material e métodos	54
<i>Animais e dietas</i>	54
<i>Coleta e histopatologia do tecido hepático</i>	57
<i>Transcriptoma do tecido hepático</i>	57
<i>Análise estatística</i>	60

Resultados	61
<i>Desempenho e histopatologia do fígado</i>	61
<i>Expressão gênica</i>	62
<i>Efeito do nível de amido na dieta (Baixo vs Alto)</i>	62
<i>Efeito da adição de vitaminas do complexo B e hidroximinerais Cu e Zn</i>	62
<i>Interação entre nível de amido (Baixo vs Alto) e a inclusão do complexo vitamina B e hidroximinerais Cu e Zn</i>	63
Discussão	73
Conclusão	80
Referências Bibliográficas	80
APÊNDICES	89

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e hidróximinerais cobre e zinco para bovinos Nelore confinados, alimentados com dieta de baixo ou alto amido" **Protocolo CEUA 0059/2022**, a ser conduzido por Maria Carolina Gonçalves de Arruda, responsável/orientador Otávio Rodrigues Machado Neto, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	03/06/2022 a 19/08/2022
Nome Comum / Espécie / Linhagem	BOVINA / BOS INDICUS / Zebuino
Raça	Nelore
Nº de animais machos	144
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	350
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	1 ano(s) e 6 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Marília-SP

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 11/05/2022

JULIANY GOMES QUITZAN

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

VITAMINAS DO COMPLEXO B E HIDRÓXIMINERAIS COBRE E ZINCO PARA BOVINOS NELORE CONFINADOS ALIMENTADOS COM DIETA DE BAIXO OU ALTO AMIDO

RESUMO – O estresse oxidativo pode ser causado pelo consumo de dietas com alta concentração de amido. Logo, reduzir a sobrecarga hepática do sistema antioxidante pode ser benéfico nessas situações, e uma alternativa é o fornecimento de vitaminas e minerais que atuam como cofatores e coenzimas, promovendo suporte ao sistema antioxidante. Objetivou-se avaliar o efeito da adição de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e hidróximinerais Cu e Zn (VitB+HTM[Cu+Zn]) em dietas de confinamento com alto e baixo amido sobre o desempenho, características de carcaça e qualidade da carne, parâmetros histomorfológicos e patológicos do rúmen, ceco e fígado, bem como a expressão gênica hepática de bovinos Nelore. Durante a fase inicial de confinamento, que durou 55 dias, 120 Nelores machos inteiros foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos, que consistiam na adição ou não de VitB+HTM(Cu+Zn) em dieta de alto amido [53,99% da matéria seca (MS); HS]. Posteriormente, a partir do dia 56 até o dia 108 de confinamento, metade dos animais de cada grupo passaram a receber uma dieta de baixo amido (23,33% da MS; LS), com adição ou não de VitB+HTM(Cu+Zn), formando quatro tratamentos distintos: HS, LS, HSVI [com VitB+HTM[Cu+Zn]] e LSVI (com VitB+HTM[Cu+Zn]). Animais que receberam dieta de alto amido apresentaram maior peso corporal final ($P = 0,004$), ganho de peso de 56 a 108 dias ($P < 0,001$), ganho de peso de 1 a 108 dias ($P = 0,001$), ganho de peso médio diário de 1 a 108 dias e 56 a 108 dias ($P = 0,001$ e $P < 0,001$, respectivamente), menor rendimento de carcaça quente ($P = 0,011$), menor perda de água por gotejamento, por evaporação e perda total da carne ($P = 0,023$, $P = 0,010$ e $P = 0,042$, respectivamente), menor área de superfície de papila ($P = 0,001$), maior espessura do epitélio queratinizado ($P = 0,051$) e menor incidência de fígados com macrófagos espumosos ($P > 0,001$). A adição de VitB+HTM(Cu+Zn) promoveu maior largura de papila ($P = 0,051$) e número médio de papilas ruminais ($P = 0,027$). A adição de VitB+HTM(Cu+Zn) reduziu o percentual de fígados com infiltrado inflamatório de nível moderado ($P = 0,046$). Quando avaliado o efeito do nível de amido na dieta sobre a expressão gênica, os animais dos tratamentos de baixo amido apresentaram maior expressão de genes e enriquecimento de vias metabólicas relacionados a proteção hepática (CYP1A2, GSTA4, GSTA1, HP, GSTA1 e GPX3) e metabolismo de ácidos graxos (HADHA, ACSL1, ACSL5, HADHB, EHHADH, CYP4A1 e ACADL). Em contraste, a alimentação com alto amido regulou positivamente genes relacionados a processos imunes (MMP9 e MMP12) no tecido hepático. Os efeitos da inclusão de VitB+HTM(Cu+Zn) na dieta sobre o transcriptoma hepático mostrou regulação positiva de genes relacionados a vias de proteção hepática (BoLa-DRB3, CYP2E1, CYP1A2, STAT3, PARK7, GADD45A, IFI6, SAA2 e SAA4) e produção de energia (G6PC, CPD1, PC, NDUFA13, DLST, NDUFB10, NDUFS5, NDUFB7, NDUFB3 e NDUFS3). Para interação entre nível de amido e adição de VitB+HTM(Cu+Zn), no grupo HS foram identificados genes relacionados a secreção e sinalização de insulina (ADCYAP1R1 e SOCS1, respectivamente), sinalização de AMPK (CCNA2) e via TNF (MMP9), enquanto no grupo HSVI foram identificados genes e vias relacionados a processos imunes e proteção hepática (CLDN11, MMP9, MMP12, MT1E, MT1A, CCNA2 e IL1A). Para o grupo LS foram enriquecidas vias de secreção pancreática (TRPC1 e ADCY2), sinalização de glucagon (FBP2 e ADCY2) e AMPK (CCNA2 e FBP2). A adição de VitB+HTM(Cu+Zn) não melhora o

desempenho em confinamento, as características de carcaça e qualidade da carne. Entretanto, quando as vitaminas e minerais são incluídos na dieta de alto amido, reduz a intensidade de coloração da carne. O uso de VitB+HTM(Cu+Zn) não afeta significativamente histomorfológicos e patológicos dos tecido ruminal, cecal e hepático. No entanto, a inclusão de VitB+HTM(Cu+Zn) em dietas altas em amido aumenta a incidência de macrófagos no fígado, enquanto estes diminuem em dietas com baixo teor de amido. A inclusão de VI promove maior expressão de genes ligados à proteção hepática e genes relacionados ao metabolismo energético, que enriquecem vias do metabolismo de piruvato, ciclo do ácido cítrico e cadeia transportadora de elétrons.

Palavras-chave: Alto grão, estresse oxidativo, RNAseq, terminação

EFFECTS OF INCLUSION OF COMPLEX B VITAMINS AND COPPER AND ZINC HYDROXYMINERALS FOR FEEDLOT NELORE BULLS FED WITH HIGH OR LOW STARCH DIETS

ABSTRACT – Oxidative stress can be caused by consuming diets with high concentration of starch. Therefore, reducing hepatic overload of the antioxidant system can be beneficial in these situations and an alternative is the addition of vitamins and minerals that act as cofactors and coenzymes, promoting support for the antioxidant system. The aim of this study was to evaluate the effect of adding B-complex vitamins protected from ruminal degradation and Cu and Zn hydroxy trace minerals (HTM; VitB+HTM[Cu+Zn]) to high and low starch feedlot diets on performance, carcass characteristics, meat quality, histomorphology and histopathology of rumen, histopathology of cecum and liver, as well as gene expression of liver of Nellore cattle. During the initial phase, which lasted 55 days, 120 non-castrated Nellore bulls were randomly distributed into two treatments, which consisted of addition or not of VitB+HTM(Cu+Zn) to a high starch diet [HS; 53,99% of dry matter (DM)]. Subsequently, from day 56 to day 108 of feedlot, half of the animals in each group began to receive a low starch diet (LS; 23,33% of DM), with or without the addition of VitB+HTM(Cu+Zn), resulting in four treatments: HS, HSVI (with VitB+HTM[Cu+Zn]), LS and LSVI (with VitB+HTM[Cu+Zn]). Animals that received high-starch diet had higher final body weight ($P = 0.004$), weight gain from 56 to 108 days ($P < 0.001$), weight gain from 1 to 108 days ($P = 0.001$), average daily gain from 1 to 108 days and 56 to 108 days ($P = 0.001$ and < 0.001 , respectively), lower hot carcass yield ($P = 0.001$), lower drip loss of meat, loss by evaporation and total water loss ($P = 0.023$, 0.010 and 0.042 , respectively), lower papillae surface area ($P = 0.001$), and higher thickness of keratinized epithelium ($P = 0.001$). VitB+HTM(Cu+Zn) addition promoted greater papillae width ($P = 0.051$), and there was interaction between starch \times VitB+HTM(Cu+Zn) for meat color variables a^* ($P = 0.018$), b^* ($P = 0.051$), chroma ($P = 0.019$) and mean number of ruminal papillae ($P = 0.027$). VitB+HTM(Cu+Zn) addition reduced the moderate-level inflammatory infiltrates ($P = 0.046$). When evaluating the effect of starch level on gene expression, animals in the LS treatment showed greater expression of genes and enrichment of metabolic pathways related to liver protection (CYP1A2, GSTA4, GSTA1, HP, GSTA1 and GPX3) and metabolism of fatty acids (HADHA, ACSL1, ACSL5, HADHB, EHHADH, CYP4A1 and ACADL), while high starch treatments showed greater expression of genes related to immune process (MMP9 and MMP12). When evaluating the liver transcriptome of animal that received VitB+HTM(Cu+Zn) supplementation, greater expression of genes and metabolic pathways related to liver protection was observed (BoLa-DRB3, CYP2E1, CYP1A2, STAT3, PARK7, GADD45A, IFI6, SAA2 and SAA4) and energy production (G6PC, CPD1, PC, CDUF13 DLST, NDUFB10, NDUFS5, NDUFB7, NDUFB3 and NDUFS3). For the interaction between starch level and VitB+HTM(Cu+Zn) supplementation, genes related to insulin secretion (ADCYAP1R1 and SOCS1, respectively), AMPK signaling (CCNA2) and TNF signaling pathway (MMP9) were identified in HS group, while in HSVI group, genes and pathways related to immune process and liver protection were identified (CLDN11, MMP9, MMP12, MT1E, MT1A, CCNA2 and IL1A). For the LS treatment, pancreatic secretion (TRPC1 and ADCY2), glucagon signaling (FBP2 and ADCY2), and AMPK (CCNA2 and FBP2) pathways were enriched. VitB+HTM(Cu+Zn) addition does not improve feedlot performance, carcass

characteristics and meat quality. However, when vitamins and minerals are added to a high-starch diet, it reduces the color intensity of meat. The use of VitB+HTM(Cu+Zn) does not significantly affect the histomorphological and pathological aspects of rumen, cecal and liver tissue. However, the inclusion of VitB+HTM(Cu+Zn) in high-starch diets increases the incidence of macrophages in the liver, while these decrease in low starch diets. The inclusion of VitB+HTM(Cu+Zn) promotes greater expression of genes linked to liver protection and genes related to energy metabolism, which enrich pathways of pyruvate metabolism, the citric acid cycle, and the electron transport chain.

Keywords: Finishing, high grain, oxidative stress, RNAseq

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 Introdução

O fornecimento de dietas com altos níveis de carboidratos solúveis é uma prática comum em confinamentos, que pode gerar estresse oxidativo, que é associado ao aumento de danos ao epitelial ruminal, maior prevalência de distúrbios metabólicos, o que leva a redução no desempenho animal e piora da qualidade da carne (Sgorlon et al., 2008; Guo et al., 2013; Avila et al., 2022).

Para reduzir o estresse oxidativo, é necessário que o sistema antioxidante atue de forma eficiente. Para isso, compostos como as vitaminas do complexo B e alguns minerais atuam como cofatores enzimáticos, auxiliando a atividade hepática na redução de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e os danos causados por elas.

As vitaminas do complexo B são essenciais à vida, pois atuam no metabolismo de energia, lipídios e proteínas. Contudo, as conclusões dos estudos iniciais com ruminantes foram de que a produção de vitaminas pela microbiota ruminal eram suficientes para atender as demandas dos animais, fazendo com que os sistemas de recomendação de exigências nutricionais adotassem valores de recomendação para apenas algumas vitaminas (NRC dairy cattle, 2001; CSIRO, 2007; BR-Corte, 2016).

Entretanto, com acréscimo significativo na produção de leite e seus componentes, o que levou ao aumento das exigências nutricionais, ficou clara a necessidade de reavaliar a suplementação das vitaminas do complexo B para vacas de leite. Desde então, trabalhos com vacas leiteiras mostraram que a utilização de vitaminas do complexo B têm efeito positivo sobre a produção de leite (Morrison et al., 2018; Evans e Mair, 2013; Scadura et al., 2008). Contudo, bovinos de corte também mostraram incremento produtivo nos últimos anos, além de mudanças na composição das dietas, em especial para animais confinados, o que traz o questionamento da importância da suplementação das vitaminas B para esses animais.

Já é bem estabelecido na literatura que os microrganismos ruminais produzem e utilizam vitaminas do complexo B, e que a produção e utilização desses compostos são influenciadas pela dieta (Santischi et al., 2005; Schwab et al., 2006). Portanto, a vantagem do fornecimento de vitaminas protegidas da degradação ruminal é passar

pelo rúmen sem serem degradadas e garantir que quantidades mínimas cheguem ao intestino promovendo maior disponibilidade aos animais e, conseqüentemente, podendo melhorar parâmetros de produção, assim como foi observado em estudos com vacas leiteiras (Evans e Mair, 2013; Morrison et al., 2018).

Tão importante quanto as vitaminas do complexo B são os minerais, pois participam de enzimas do metabolismo de nutrientes e na resposta imune. (McDowell, 2005). O fornecimento de minerais na forma de hidróxido apresenta vantagens em relação às formas sulfatadas e quelatadas (minerais ligados a compostos orgânicos), por apresentarem baixa solubilidade no rúmen e maior disponibilidade para absorção no intestino (Caramalac et al., 2017; Shaeffer, Lloyd e Spears, 2017).

Tanto o cobre (Cu) quanto o zinco (Zn) podem melhorar a capacidade antioxidante de bovinos, pois são necessários para o bom funcionamento de algumas enzimas, como a enzima cobre-zinco superóxido dismutase, que participa ativamente do mecanismo de defesa antioxidante contra radicais livres (Ellah et al., 2009; Mattioli et al., 2020; Ayemele et al., 2021).

Essa combinação de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal com hidróximinerais Cu e Zn se mostrou benéfica no estudo de Lopes et al. (2021), que observaram que bovinos que receberam as vitaminas e hidróximinerais Cu e Zn apresentam maior expressão de proteínas associadas ao metabolismo energético (cadeia de transporte de elétrons [e.g., UQCRC2 and COX4I1]) e vias ligadas a resposta a danos oxidativos (e.g., “Heat shock proteins [HSPA1A, HSP90AB1]), que indicam maior eficiência metabólica e maior proteção hepática a danos oxidativos em relação a bovinos que não receberam vitaminas B e hidróximinerais Cu e Zn na dieta. Nesse contexto, é esperado que a adição de vitaminas do complexo B e hidroximinerais como o Cu e o Zn de baixa disponibilidade ruminal apresentem melhora no estado oxidativo do animal que irá repercutir melhor desempenho e efeito positivo sobre a qualidade da carne em animais em confinamento.

2 Revisão de Literatura

2.1 Problemas causados por dietas com alta concentração de amido em bovinos de corte

A ocorrência de problemas metabólicos causados pela ingestão de dietas com altas concentrações de carboidratos de rápida fermentação (especialmente o amido) é mais comum em animais confinados, onde a produção excessiva de ácidos graxos de cadeia curta leva a queda do pH a níveis prejudiciais, ocasionando problemas como a acidose ruminal, abscessos hepáticos e timpanismo (Galyean e Rivera, 2002), levando a redução do ganho de peso e consumo dos animais.

Outro problema causado pelo fornecimento de dietas com alta concentração de amido é o efeito negativo sobre o consumo de matéria seca em relação ao peso vivo durante o período de terminação, o que interfere diretamente na eficiência alimentar, como observado por Silva et al. (2023), que ao avaliarem diferentes níveis de amido (25%, 35% e 45%) em dieta para bovinos Nelore confinados observaram redução linear do consumo de matéria seca em relação ao peso vivo e redução da eficiência alimentar na fase final do confinamento em resposta ao aumento da concentração de amido.

Esses comportamentos também foram observados por Joy et al. (2007), que avaliaram novilhas recebendo dietas com média de 43% de amido durante 160 dias em confinamento, dividindo esse período em fases de 40 dias cada. Os autores observaram efeito quadrático para ganho de peso médio diário e eficiência alimentar, e tendência linear de redução de consumo de matéria seca.

Sousa et al. (2022) também observaram redução linear da eficiência alimentar, assim como do ganho de peso médio diário em bovinos Nelore confinados recebendo dieta com 38% de amido por período de 108 dias. Os autores também calcularam o índice de resistência à insulina (RQUICKI) e observaram aumento desse índice com o avanço do tempo em confinamento, junto com o aumento do cortisol e haptoglobina séricos que, juntos, indicam relação entre inflamação crônica e resistência insulínica.

Os efeitos de redução do consumo em relação ao peso vivo e eficiência alimentar são observados em maior intensidade na fase final da terminação, e ainda não possui causa estabelecida. Logo, realizar mudanças na dieta como a redução da

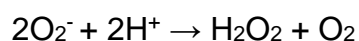
quantidade de amido pode ser uma alternativa para tentar mitigar a queda do consumo de matéria seca em relação ao peso vivo na fase final de confinamento.

Além dos problemas citados acima, o estresse oxidativo também pode ser causado pelo fornecimento de dietas com alta concentração de carboidratos solúveis, que pode ocasionar prejuízos à barreira epitelial ruminal, maior prevalência de doenças, menor desempenho produtivo e piora em atributos de qualidade da carne, como a cor e o tempo de prateleira (Sgorlon et al., 2008; Guo et al., 2013; Avila et al., 2022).

Estresse oxidativo é o resultado do desbalanço entre oxidantes e antioxidantes, onde a atividade oxidante excede a capacidade neutralizante dos antioxidantes (Celi, 2011). É mais comum em tecidos e órgãos de alta atividade metabólica e demanda energética como o músculo esquelético e cardíaco, células do sangue e fígado onde, em excesso, essa oxidação produz espécies reativas ao oxigênio (ROS) e outros radicais livres que podem induzir a morte celular por apoptose ou necrose, levando a doenças e perda de função do tecido ou órgão (Puppel et al., 2014).

Para manter a homeostase, o corpo conta com um sistema de defesa antioxidante, que inclui componentes exógenos e endógenos, que agem na proteção contra os danos desses radicais livres aos tecidos (Ponnampalam et al., 2022). Dentre os antioxidantes exógenos estão vitaminas, minerais, carotenoides, entre outros compostos adquiridos via alimentação e, dentre os antioxidantes endógenos, estão componentes enzimáticos e proteínas ligadas a metais (Ponnampalam et al., 2022).

A molécula superóxido (O_2^-), uma das principais ROS, é altamente reativa e a maior responsável por danos oxidativos nas células, contudo, pode ser convertida em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), outra ROS, muito menos prejudicial (Brand et al., 2004). Para reduzir os danos oxidativos causados pela O_2^- , a enzima superóxido-dismutase catalisa a seguinte reação:



e o H_2O_2 gerado, é então catalisado pela glutathiona-peroxidase, formando H_2O . (Nelson e Cox, 2018).

Na carne, o estresse oxidativo promove a peroxidação lipídica, causando prejuízos a qualidade nutricional, promovendo descoloração, rancidez, prejudicando a capacidade de retenção de água e o armazenamento dessa carne (Chauhan et al.,

2020). Os efeitos oxidativos na carne de animais terminados com dietas de maior potencial oxidativo (alto concentrado) em comparação a animais terminados em pasto pode ser observada em estudo onde, após 7 dias de maturação, a carne de cordeiros terminados em pasto teve 13% de aumento da concentração de carbonil, um produto da oxidação proteica, enquanto cordeiros terminados em confinamento tiveram 31,4% de aumento da concentração de carbonil no músculo *Longissimus dorsi* (Santé-Lhoutellier et al., 2008).

Em caprinos, o fornecimento de dietas com alta concentração de grãos promoveu redução da capacidade antioxidante, que foi relacionado principalmente a alteração do metabolismo de aminoácidos (Zhang et al., 2019). Os animais que receberam dietas de alto amido apresentaram queda no desempenho produtivo que, segundo os autores, pode ser relacionada às menores concentrações hepática e sérica de lisina e valina (Zhang et al., 2019).

Em vacas leiteiras que receberam dietas de alto concentrado, induzindo acidose subclínica, a expressão de genes pró-inflamatórios aumentou enquanto a expressão de genes antioxidantes reduziu no tecido epitelial mamário e fígado (Ayemele et al., 2021).

Em ovinos, dietas com mais de 70% de concentrado promoveram maior peso corporal final, peso de carcaça e gordura subcutânea, sem causar prejuízos. Contudo, valores séricos de albumina, uma proteína de fase aguda utilizada como indicador de estresse oxidativo, foi maior para esses animais. Os autores também citaram a possibilidade de o aumento da albumina sérica ser devido ao maior acúmulo de gordura nesses animais, pois a albumina é um carreador de ácidos graxos no fluido extracelular (Arjmand et al., 2022).

Devido a influência do teor de carboidrato da dieta sobre o estresse oxidativo, aumentar a capacidade antioxidante de animais confinados através da adição de nutrientes como as vitaminas do complexo B e hidróximinerais Cu e Zn pode ser uma alternativa para maximizar a viabilidade desse sistema de produção, uma vez que pode aumentar o desempenho produtivo, melhorar a qualidade da carne e reduzir a incidência de doenças, levando a redução de custos e aumento da margem de lucro do pecuarista.

2.2 Vitaminas do complexo B

Vitaminas são definidas como um grupo de compostos orgânicos necessários em pequenas quantidades para o bom funcionamento do organismo; quando há deficiência no organismo podem causar doenças; e devem ser adquiridas via alimentação ou sintetizadas por microrganismos no aparelho digestivo para serem absorvidas pelo hospedeiro (WEISS e FERREIRA, 2006).

O estudo desses compostos na nutrição de ruminantes começou há cerca de 100 anos, com o primeiro estudo realizado em 1928, onde Bechtel e colaboradores observaram que as bactérias ruminais sintetizavam vitaminas do complexo B (MCDOWELL, 1989). Os primeiros artigos sobre vitaminas do complexo B na nutrição de animais ruminantes disponíveis na internet estão datados por volta de 1950 (Teeri et al., 1955; Clifford; Goodrich e Tillman, 1967; Cole, McLaren e Hutcherson, 1982). Desde então, trabalhos incluindo combinações dessas vitaminas para animais de corte não mostraram resultados promissores, porém, nos últimos anos, o interesse pelas vitaminas do complexo B voltou a aparecer.

Devido resultados de estudos mais antigos com o fornecimento de vitaminas do complexo B para bovinos, sistemas de exigências como o NASEM (2016) e o CSIRO (2007), assim como o sistema brasileiro BR-Corte (2016), não estabeleceram valores de recomendações dessas vitaminas para bovinos de corte, salvo casos em que bezerros não são aleitados de forma natural, podendo necessitar de suplementação. Contudo, a alegação de que o rúmen produz todas as vitaminas do complexo B necessárias para boa saúde e desenvolvimento do animal pode não ser adequada aos dias atuais, onde houve significativos incrementos no desempenho produtivo dos animais e conseqüentemente nas exigências nutricionais.

O complexo B é composto por 9 vitaminas: tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7), colina (B8), ácido fólico (B9) e cobalamina (B12), sendo as últimas 5 utilizadas neste estudo.

O ácido pantotênico (B5) é precursora da coenzima A (CoA). No citosol, a CoA é utilizada na biossíntese de ácidos graxos, e na matriz mitocondrial é muito utilizada na degradação oxidativa do piruvato, dos ácidos graxos e alguns aminoácidos (NELSON e COX, 2018), gerando energia ao animal. A produção de B5 é influenciada pela dieta, em que maiores teores de carboidratos solúveis produzem mais B5, porém,

há degradação de B5 em larga escala pelos microrganismos ruminais, interferindo no fluxo dessa vitamina para o intestino, local de maior absorção das vitaminas (RAGALLER et al., 2011; VOLKER et al., 2011).

A piridoxina (B6) é componente da coenzima piridoxal-fosfato, que participa do metabolismo de aminoácidos. A piridoxal-fosfato está presente na primeira etapa de catabolismo dos aminoácidos no fígado como carreador de grupos amino (NELSON e COX, 2018). Em estudo avaliando a alta e baixa inclusão de vitamina B6 em dietas para ratos, Mayengbam et al. (2020) observaram que dietas com baixa inclusão de B6 promoveram a redução da gordura corporal, massa magra, minerais nos ossos e triglicerídeos circulantes no sangue quando. Com isso, o trabalho demonstrou que as bactérias do intestino não produziram quantidades suficientes de vitamina B6 para sustentar o metabolismo da microbiota intestinal e levou a deficiências em muitas enzimas dependentes da piridoxal-fosfato, além de promover o crescimento seletivo de algumas bactérias e reduzir a biossíntese de arginina, sendo necessária suplementação de B6 via alimentação.

A biotina (B7) atua no metabolismo de lipídios, aminoácidos e carboidratos como coenzima de cinco enzimas, sendo duas delas especialmente importantes para a gliconeogênese em ruminantes (GIRARD, 2017). A biotina participa comumente de reações de carboxilação como carreador de CO₂ como, por exemplo, na primeira reação da gliconeogênese, em que o piruvato é convertido a oxalacetato pela enzima piruvato-carboxilase, enzima esta que necessita de uma molécula de biotina ligada à cada uma de suas quatro subunidades (NELSON e COX, 2018). A biotina também participa de outras enzimas, como a propionil-CoA-carboxilase, acetil-CoA-carboxilase e metilcrotonil-CoA-carboxilase (Zimmerly e Weiss, 2001).

Em meta-análise realizada por Chen et al. (2011), os autores concluíram a partir de 9 estudos que a biotina aumentou o consumo de matéria seca, produção de leite, gordura e proteína totais, sem alterar a porcentagem de gordura e proteína no leite de vacas Holandesas. A concentração de biotina disponível no rúmen parece sofrer influência significativa da alimentação. Segundo Santschi et al. (2005), a biotina disponível no fluído ruminal reduz quando o fornecimento de alimentos concentrados é aumentado.

O ácido fólico (B9) auxilia como cofator na biossíntese de lipídios, proteínas, derivados de ácidos nucleicos, hormônios e neurotransmissores como carreador de

unidades de carbono (MCDOWELL, 2000). Li et al. (2016) avaliaram três níveis de inclusão de ácido fólico protegido da degradação ruminal para vacas Holandesas entre o período de três semanas antes do parto até 15 semanas pós-parto. Houve aumento linear do consumo de matéria seca e energia, aumento da produção de leite e proteína no leite, melhora no balanço energético negativo e performance reprodutiva.

A cianocobalamina (B12) tem importante função na síntese de purinas e pirimidinas, transferência de grupos metil, formação de proteínas a partir de aminoácidos e no metabolismo de carboidratos e gordura. Ela está presente em coenzimas como a 5'-desoxiadenosilcobalamina (coenzima B12) e a metilcobalamina (MCDOWELL, 2000). Devido à alta relação de cianocobalamina com o ácido fólico e o cobalto, não foram encontrados estudos avaliando o uso isolado da vitamina B12 para ruminantes.

Apesar do maior interesse sobre as vitaminas do complexo B para ruminantes nos últimos anos, poucos estudos com o uso dessas vitaminas protegidas da degradação ruminal para bovinos de corte estão disponíveis. Já é bem estabelecido na literatura que os microorganismos ruminais produzem e utilizam vitaminas do complexo B, e que a produção e utilização são influenciadas pelo perfil da dieta (Santischi et al., 2005; Schwab et al., 2006). Portanto, a vantagem do fornecimento dessas vitaminas protegidas da degradação ruminal é pular a etapa de degradação ruminal e garantir que quantidades próximas às fornecidas cheguem ao intestino para serem absorvidas.

Para vacas de leite, Robinson (2019) desenvolveu um modelo para determinação da exigência de vitaminas do complexo B, porém a conclusão foi de que as vitaminas do complexo B adquiridas via dieta e produzidas no rúmen eram suficientes para atingir a exigências de manutenção e lactação, não havendo necessidade de suplementação. Apesar disso, o autor afirma haver estudos limitados para algumas vitaminas, o que pode afetar negativamente a precisão dos resultados.

Contudo, Scadura et al. (2008) avaliaram o fornecimento de biotina, ácido fólico, ácido pantotênico e piridoxina protegidas da degradação ruminal para vacas Holandesas em início de lactação, e obtiveram aumento na quantidade de gordura, proteína e energia do leite. Os autores atribuíram esses resultados à provável maior eficiência metabólica de energia e metabolismo de proteínas (Figura 1).

Corroborando com o estudo acima, Evans e Mair (2013), utilizando um *blend* comercial de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal concluíram que vacas Holandesas em lactação responderam ao fornecimento das vitaminas do complexo B com aumento da produção de leite e seus componentes, indicando que vacas leiteiras podem precisar de suplementação dessas vitaminas.

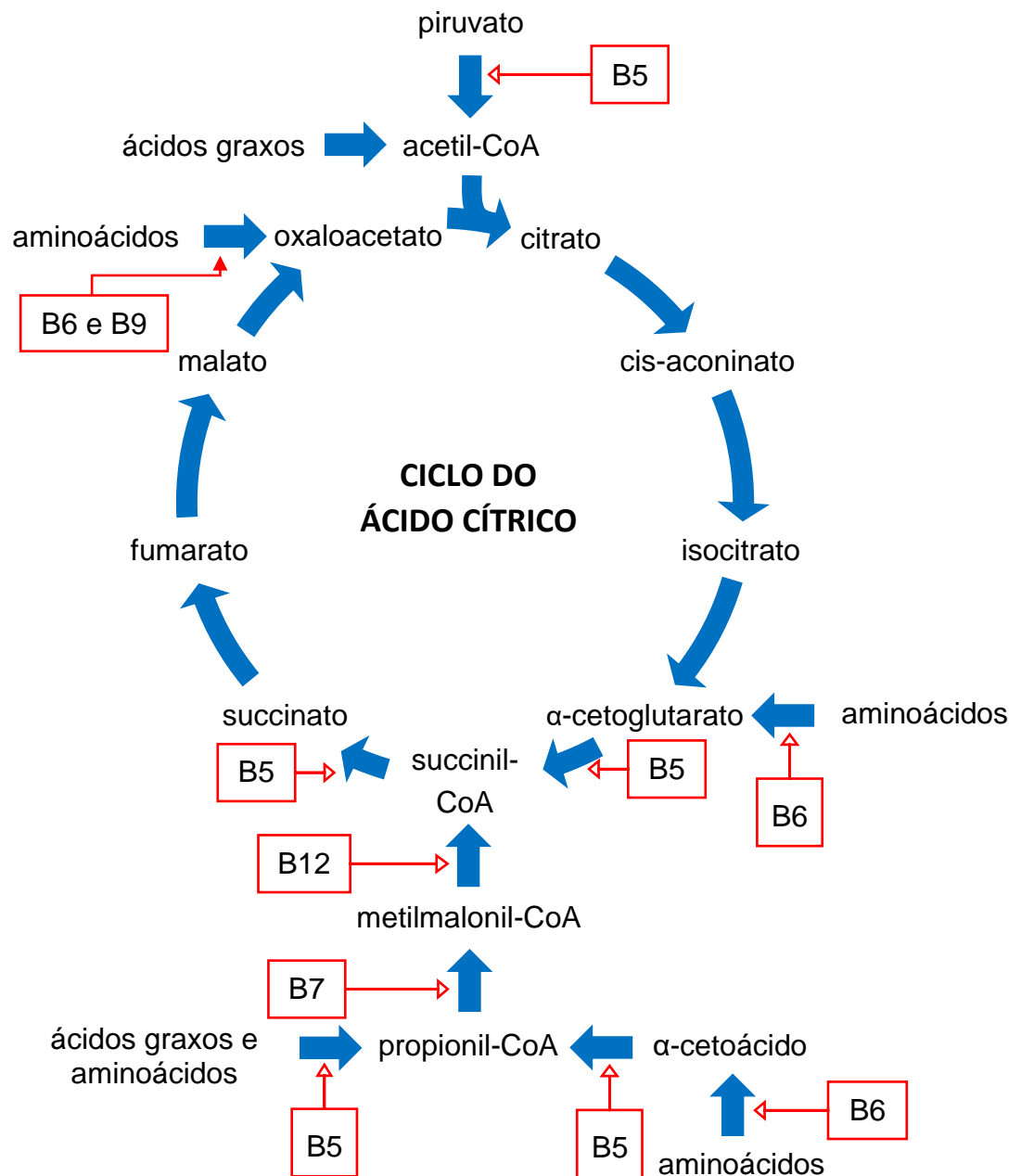


Figura 1. Demonstração simplificada da participação das vitaminas B5, B6, B7, B9 e B12 na oxidação de ácidos graxos e aminoácidos, e no ciclo do ácido cítrico. As setas de cor azul indicam uma reação ou conjunto de reações catalisadas por enzimas. Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2018.

Em caprinos, Asadi et al. (2024) aplicaram duas doses de vitaminas do complexo B a cinco e três semanas antes do parto, e uma semana após o parto avaliaram as cabras e suas progênes. Os autores observaram melhora no status antioxidante e aumento das enzimas glutathiona peroxidase, catalase e superóxido dismutase no plasma das cabras, assim como o aumento das enzimas glutathiona peroxidase e superóxido dismutase no plasma da progênie, que são responsáveis pela neutralização de ERO.

Através das melhorias observadas nos estudos com vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal, é possível que bovinos de corte, principalmente confinados, possam necessitar de suplementação dessas vitaminas para obterem melhores desempenhos, porém estudos nessas condições são escassos. Portanto, este estudo é de grande contribuição e pode abrir uma grande porta para que mais estudos sobre as vitaminas B para bovinos de corte sejam promovidos.

2.3 Hidróximinerais cobre e zinco

Os minerais são essenciais para a manutenção da vida do animal e possuem basicamente quatro funções no organismo: estrutural, fisiológica, catalítica e regulatória (MCDOWELL, 2003). Os hidróximinerais são minerais ligados covalentemente a grupos hidróxi e clorido, são relativamente insolúveis em pH neutro e solúveis em condições ácidas, como do abomaso (Spears, 2003; Reddy et al., 2021).

O cobre é um mineral traço essencial, e participa de várias enzimas como a lisil oxidase, citocromo oxidase, superóxido dismutase, ceruloplasmina e tirosinase, além de atuar na proteção contra danos oxidativos (López-Alonso e Miranda, 2020; NASEM, 2016). O zinco auxilia na degradação de peptídeos no intestino, pois está presente nas carboxipeptidases A e B, é componente de diversas metaloenzimas como Cu-Zn superóxido dismutase, fosfatase alcalina e RNA polimerase, participando do metabolismo de ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos, além de ser importante no desenvolvimento do sistema imune (NELSON e COX, 2018; NASEM, 2016).

O zinco também auxilia na lipogênese e transporte de glicose através da sinalização da insulina (Tang e Shay, 2001), o que pode auxiliar para maior deposição de gordura na carcaça e carne.

Devido à baixa quantidade adicionada nas rações e potenciais interações com componentes da dieta, a escolha de uma boa fonte desses minerais é importante, e os hidróximinerais se encaixam como uma possível solução para esta problemática. Trabalhos têm demonstrado vantagens na utilização dos hidróximinerais em relação a outras fontes comumente utilizadas na nutrição animal (Spears et al., 2004; Caramalac et al., 2017; Shaeffer et al., 2017; Cidrini et al., 2020).

Ao avaliarem o fornecimento de sulfato de cobre e hidroxocloreto de cobre para bovinos com alta inclusão de molibdênio e enxofre, dois minerais que interferem na disponibilidade do cobre, Spears et al. (2004) observaram que a concentração de cobre no fígado dos animais suplementados com hidroxocloreto de cobre foi maior, indicando maior disponibilidade dessa forma de suplementação. Enquanto, Shaeffer, Lloyd e Spears (2017) avaliando o zinco na forma de hidróximineral e sulfato para bovinos, encontraram melhor absorção e retenção de zinco aparentes para o tratamento com hidróximineral, sem alterar o consumo de zinco. Os autores atribuíram esses resultados a menor solubilidade do zinco na forma de hidróxido em água.

Ao avaliarem a inclusão de cobre, zinco e manganês nas formas sulfato, orgânico ou hidróxi para bezerros, Caramalac et al. (2017) observaram nos dois anos pós desmama que o ganho de peso foi maior para bezerros que receberam hidróximinerais em comparação com as outras fontes. Isso ocorreu devido ao menor consumo voluntário de suplementos na forma orgânica e de sulfato, que os autores acreditaram ocorrer devido à maior solubilidade dessas formas na boca dos animais, provavelmente causando gosto metálico.

Quando Cidrini et al. (2020), avaliaram a suplementação de HTM Cu e Zn para bovinos Nelore em pasto, em fase de crescimento e em transição do período seco para período das águas, observaram maior ganho de peso médio diário e maior peso corporal final nos animais suplementados com HTM Cu e Zn comparado às fontes inorgânicas desses minerais.

Ao avaliar níveis de suplementação de hidróximinerais Cu (baixa e alta) e Zn (baixa, média e alta), Santos et al. (2021) observaram que a maior suplementação de Cu promoveu maior valor de a^* e maior perda por gotejamento na carne de frangos de corte. E quando associados a alta suplementação de HTM Cu e Zn, também observaram maior perda por gotejamento quando comparado à suplementação

desses mesmos minerais na forma sulfatada. Os autores não observaram diferenças para outros parâmetros de qualidade da carne avaliados.

Estudos sobre diferentes fontes dos minerais Cu e Zn na nutrição de bovinos Nelore em confinamento e seus efeitos sobre o desempenho e a qualidade da carne ainda são escassos (Vellini et al., 2020; Cidrini et al., 2020), e estudos sobre a associação de hidróximinerais com vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal é ainda menor.

Diante do exposto, a utilização de estratégias como a redução do teor de amido e a utilização de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e hidróximinerais cobre e zinco podem ser alternativas para reduzir a queda do consumo de matéria seca em relação ao peso vivo que é observada ao longo do período de confinamento, assim como reduzir o estresse oxidativo citado anteriormente. Caso as estratégias testadas se mostrem benéficas, poderão ser utilizadas em larga escala, impactando positivamente a produção de carne bovina, além abrir portas para novos questionamentos e contribuir para estudos futuros.

3 Objetivo

Objetivou-se avaliar a adição das vitaminas B5, B6, B7, B9 e B12 protegidas da degradação ruminal e dos hidróximinerais cobre e zinco em dietas contendo diferentes teores de amido para bovinos Nelore confinados sobre o desempenho, qualidade da carne, morfologia e histomorfologia do epitélio ruminal, histopatologia do fígado e ceco, e como essas estratégias afetam a expressão de genes no fígado.

4 Referências Bibliográficas

ARJMAND M, KIANI A, AZIZI A, FADAYIFAR A, AZARFAR A, PONNAMPALAM EN (2022) Effects of dietary concentrate level and feeding length on nutrient digestibility, rumen hydrolytic enzymes activity, intermediary metabolites, and feeding behavior in growing fat-tailed lambs: Iranian feedlot system. **Small Ruminant Research** 217:1-12.

ASADI M, FARD HM, ARAEE KA, HATAMI M (2024) Studying the impacts of maternal B complex vitamin injection on performance, metabolic diseases, hematological parameters, and antioxidant status in pregnant Saanen goats and their newborn kids during transition period. **Science of the Total Environment** 907:1-6.

AVILA VD, CARVALHO VM, BONIN E, MOREIRA LS, MOTTIN C, RAMOS AVG, MENIQUETI AB, BALDOQUI DC, COMAR JF, PRADO IN (2022) Mix of natural extracts to improve the oxidative state and liver activity in bulls finished feedlot. **Livestock Science** 259:1-8.

AYEMELE AG, TILAHUM M, LINGLING S, ELSAADAWY SA, GUO Z, ZHAO G, XU J, BU D (2021) Oxidative stress in dairy cows: insights into the mechanistic mode of actions and mitigating strategies. **Antioxidants** 10:1-21.

BRAND MD, AFFOURTIT C, ESTEVES TC, GREEN K, LAMBERT AJ, MIWA S, PAKAY JL, PARKER N (2004) Serial review: the powerhouse takes control of the cell: the role of mitochondria in signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine** 37:755-767.

CARAMALAC LS, NETTO AS, MARTINS PMGA, MORIEL P, RANCHES J, FERNANDES HJ, ARTHINGTON JD (2017) Effects of hydroxychloride sources of copper, zinc and manganese on measures of supplement intake, mineral status, and pre- and postweaning performance of beefs calves. **Journal of Animal Science** 95:1739-1750.

CELI P (2011) Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. **Immunopharmacology and Immunotoxicology** 33:233-240.

CHAUHAN SS, DUNSHEA FR, PLOZZA TE, HOPKINS DL, PONNAMPALAM EN (2020) The impact of antioxidant supplementation and heat stress on carcass characteristics, muscle nutritional profile and functionality of lamb meat. **Animals** 10:1-11.

CHEN B, WANG YM, LIU JX (2011) Effect of biotin on milk performance of dairy cattle: a meta-analysis. **Journal of Dairy Cattle** 94:3537-3546.

CIDRINI IA, LAGE JF, FERREIRA I, OLIVEIRA K, PRADOS LF, SIQUEIRA GR, RESENDE FD (2020) PSXII-17 Trace minerals source influences the performance of Nellore cattle in the growing phase during the transition between dry to rainy season in Brazil. **Journal of Animal Science** 98:445-446.

CSIRO (Eds.) (2007) **Nutrient requirements of domesticated ruminants**. Collingwood: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 270p.

ELLAH MRA, OKADA K, GORYO M, OISHI A, YUSUDA J (2009) Superoxide dismutase activity as a measure of hepatic oxidative stress in cattle following ethionine administration. **The Veterinary Journal** 182:336-341.

EVANS E, MAIR DT (2013) Effects of rumen protected B vitamin blend upon milk production and component yield in lactating dairy cows. **Open Journal of Animal Science** 3:76-82.

GALYEAN ML, RIVERA JD (2002) Nutritionally related disorders affecting feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science** 83:13-20.

GIRARD CL (2017) New approaches, development, and improvement of methodologies for the assessment of B-vitamin requirements in dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia** 46:614-620.

GUO Y, XU X, ZOU Y, YANG Z, LI S, CAO Z (2013) Changes in feed intake, nutrient digestion, plasma metabolites, and oxidative stress parameters in dairy cows with subacute ruminal acidosis and its regulation with pelleted beet pulp. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 4:1-10.

JOY F, MCKINNON JJ, HENDRICK S, GÓRKA P, PENNER GB (2017) Effect of dietary energy substrate and days on feed on apparent total tract digestibility, ruminal short-chain fatty acid absorption, acetate and glucose clearance, and insulin responsiveness in finishing feedlot cattle. **Journal of Animal Science** 95:5606-5616.

LOPES MM, BRITO TR, LAGE JF, COSTA TC, FONTES MMS, SERÃO NVL, MENDES TAO, REIS RA, VERONEZE R, SILVA FF, DUARTE MS (2021) Proteomic analysis of liver from finishing beef cattle supplemented with rumen-protected B-vitamin blend and hydroxy trace minerals. **Animals** 11:1934-1945.

LÓPEZ-ALONSO M, MIRANDA M (2020) Copper supplementation, a challenge in cattle. **Animals** 10:1-21.

MATTIOLI GA, ROSA DE, TURIC E, PICCO SJ, RAGGIO SJ, MINERVINO AHH, FAZZIO LE (2020) Effects of parental supplementation with minerals and vitamins on oxidative stress and humoral immune response of weaning calves. **Animals** 10:1-9.

MAYENGBAM S, CHLEILAT F, REIMER RA (2020) Dietary vitamin B6 deficiency impairs gut microbiota and host and microbial metabolites in rats. **Biomedicines** 8:1-14.

MCDOWELL LR (2^a Ed.) (2003) **Minerals in Animal and Human Nutrition**. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands. 524p.

MCDOWELL LR (2^a Ed.) (2000) **Vitamins in animal and human nutrition**. Academic Press, Ames, Iowa. 816p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC (8^a Ed.) (2016) **Nutrient Requirements of beef cattle**. Washington. 494p.

NELSON DL, COX MM (7^a Ed.) (2018) **Princípios da bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre, Artmed. 1312p.

PONNAMPALAM EN, KIANI A, SANTHIRAVEL A, HOLMAN BWB, LAURIDSEN C, DUNSHEA FR (2022) The importance of dietary antioxidants on oxidative stress, meat and milk production, and their preservative aspects in farm animals: antioxidant action, animal health, and product quality – invited review. **Animals** 12:1-45.

PUPPEL K, KAPUSTA A, KUCZYNSKA B (2014) The etiology of oxidative stress in the various species of animals, a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 95:2179-2184.

RAGALLER V, LEBZIEN P, SUDEKUM KH, HUTHER L, FLACHOWSKY G (2011) Pantothenic acid in ruminant nutrition: a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 96:6-16.

REDDY BVV, NAYAK S, KHARE A, PAL RP, SHARMA R, CHOURASIYA A, NAMDEO S, THAKUR S (2021) Role of hydroxy trace minerals on health and production of livestock: a review. **Journal of Livestock Science** 12:279-286.

ROBINSON PH (2019) Vitamin B requirements and duodenal deliveries in lactating dairy cows: Organization of a limited literature. **Livestock Science** 226:48-60.

SANTÉ-LHOUTELLIER V, ENGEL E, AUBRY L, GATELLIER P (2008) Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. **Meat Science** 79:777-783.

SANTISCHI DE, BERTHIAUME R, MATTE JJ, MUSTAFA AF, GIRARD CL (2005) Fate of supplementary B-vitamins in the gastrointestinal tract of dairy cows. **Journal of Dairy Science** 88:2043-2054.

SCADURA FC, ROBINSON PH, EVANS E, LORDELO M (2008) Effects of ruminally protected B-vitamin supplemented on milk yield and composition of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology** 144:111-124.

SGORLON S, STRADAIOLI G, GABAI G, STEFANON B (2008) Variation of starch and fat in the diet affects metabolic status and oxidative stress in ewes. **Small Ruminant Research** 74:123-129.

SHAEFFER GL, LLOYD KE, SPEARS JW (2017) Bioavailability of zinc hydroxychloride relative to zinc sulfate in growing cattle fed a corn-cottonseed hull-based diet. **Animal Feed Science and Technology** 232:1-5.

SOUSA OA, CAPELLOZZA BI, FONSECA VGL, COOKE RF (2022) Insulin resistance increases as days on feed advance in feedlot Bos indicus beef cattle offered a high-concentrate finishing diet. **Journal of Animal Science** 100:1-4.

SOUZA TIS, SUZA JM, ACEDO TS, CARVALHO VV, PERDIGÃO A, SILVA LAF, SILVESTRE AM, NIEHUES MB, SCHLEIFER WF, CASALI DM, MARTINS CL, ARRIGONI MDB, MILLEN DD (2023) Feedlot performance, rumen and cecum morphometrics of Nellore cattle fed increasing levels of diet starch containing a blend of essential oils and amylase or monensin. **Frontiers in Veterinary Science** 10:1-13.

SOUZA TS, AUGUSTO KVZ, HAN Y, SARTORI MMP, DENADAI JC, SANTOS CT, SOBRAL NC, ROÇA RO, SARTORI JR (2021) High levels of copper and zinc supplementation in broiler diets on growth performance, carcass traits and apparent ileal mineral absorption. **British Poultry Science** 62:579-588.

SPEARS JW (2003) Trace mineral bioavailability in ruminant. **The Journal of Nutrition** 133:1506-1509.

SPEARS JW, KEGLEY EB, MULLIS LA (2004) Bioavailability of copper from tribasic copper chloride and copper sulfate in growing cattle. **Animal Feed Science and Technology** 116:1-13.

TANG X, SHAY NF (2001) Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. **The Journal of Nutrition** 131:1414-1420.

VALADARES FILHO SC, SILVA LFC, GIONBELLI MP, ROTTA PP, MARCONDES MI, CHIZZOTTI ML, PRADOS LF (3^a Ed.) (2016) **Exigências nutricionais de zebuínos cruzados**: BR-CORTE. 327 p.

VOLKER D, HUTJER L, DAS G, ABEL H (2011) Pantothenic acid supplementation to support rumen microbes? **Archives of Animal Nutrition** 65:163-173.

WEISS WP, FERREIRA G (2006) Water soluble vitamins for dairy cattle. Tri-State Dairy Nutrition Conference.

ZHANG RY, LIU YJ, YIN YY, JIN W, MAO SY, LIU JH (2019) Response of rumen microbiota, and metabolic profiles of rumen fluid, liver and serum of goats to high-grain diets. **Animal** 13:1855-1864.

ZIMMERLY CA, WEISS WP (2001) Effects of supplemental dietary biotin on performance of Holstein cows during early lactation. **Journal of Dairy Science** 84:498-506.

CAPÍTULO 2 – Efeitos da inclusão de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e hidróximinerais Zn e Cu para bovinos Nelore confinados recebendo dietas de diferentes teores de amido sobre o desempenho, parâmetros de carcaça, qualidade da carne e histologia da parede ruminal

Resumo – O estresse oxidativo é um dos possíveis problemas ocasionados por dietas de alto amido, causando prejuízos a produção animal. Uma alternativa a esse problema é o fornecimento de minerais que atuam como cofatores enzimáticos, reduzindo a sobrecarga do sistema antioxidante, e vitaminas que forneçam suporte para o metabolismo energético. Objetivou-se avaliar o efeito da adição de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e hidróximinerais (HTM) Cu e Zn em dietas com alto e baixo nível de amido sobre o desempenho, parâmetros de carcaça, qualidade da carne, histopatologia do ceco e saúde ruminal de bovinos Nelore confinados. Foram utilizados 120 bovinos inteiros, divididos entre 2 tratamentos: alto amido (HS) e alto amido + vit. B protegidas da degradação ruminal e HTM Cu e Zn (HSV1) até 55 dias de confinamento. Após esse período, metade dos animais passou a receber dieta de baixo amido resultando, então, em 4 tratamentos: HS; HSV1; baixo amido (LS) e baixo amido + vit. B protegidas da degradação ruminal e HTM Cu e Zn (LSV1), sendo abatidos após 108 dias em confinamento. Animais que receberam dieta de alto amido apresentaram maior peso corporal final ($P=0,004$), ganho de peso de 56 a 108 dias ($P<0,001$), ganho de peso de 1 a 108 dias ($P=0,001$), GMD de 1 a 108 dias e 56 a 108 dias ($P=0,001$ e $<0,001$, respectivamente), melhor CA e EA ($P=0,001$ para ambos), menor rendimento de carcaça quente ($P=0,011$), menor perda de água da carne por gotejamento, por evaporação e perda total ($P=0,023$, $0,010$ e $0,042$, respectivamente), menor área de superfície de papila ($P=0,001$) e maior espessura do epitélio queratinizado ($P=0,051$). O fornecimento de vitaminas do complexo B e HTM Cu e Zn promoveu maior largura de papila ($P=0,051$). A adição de vitaminas do complexo B + hidróximinerais Cu e Zn não oferece melhoria para o desempenho produtivo, qualidade da carne e saúde ruminal de bovinos Nelore confinados. Dietas com alto teor de amido proporcionaram maior ganho de peso, CA e EA, sem provocar grandes danos quando comparado com dietas de baixo amido.

Palavras-chave: alto grão, confinamento, terminação

Introdução

A terminação de bovinos de corte em confinamento recebendo dietas com altas concentrações de amido é uma prática cada vez mais comum. Contudo, essas altas concentrações de amido geram como consequência o aumento do estresse oxidativo, que por sua vez, está associado ao aumento do dano à barreira epitelial ruminal, maior prevalência de doenças, menor desempenho produtivo e piora da qualidade da carne (Sgorlon et al., 2008; Guo et al., 2013; Avila et al., 2022). O estresse oxidativo é mais comum em órgãos e tecidos de alta atividade metabólica, como o fígado que, quando acometido em excesso, sofre injúrias e perda de função (Puppel et al., 2015). Portanto, reduzir o estresse oxidativo e oferecer suporte para o metabolismo energético pode representar aumento no desempenho de ruminantes em confinamento.

Uma das possibilidades para auxiliar o adequado funcionamento do fígado é a inclusão de vitaminas do complexo B na dieta, pois atuam como coenzimas no metabolismo de energia, lipídios e proteínas. Os microrganismos ruminais produzem e utilizam essas vitaminas, que tem sua produção influenciada pelo perfil da dieta (Santischi et al., 2005; Schwab et al., 2006). Contudo, acreditava-se que a quantidade de vitaminas do complexo B produzidas pela microbiota ruminal poderia atender por completo as exigências dos animais (NRC, 2001).

No entanto, alguns estudos com vacas de leite mostraram que a inclusão de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal promoveu aumento na produção de leite em resposta ao adequado atendimento das necessidades em vitaminas, que é dependente do nível produtivo e, conseqüentemente, das exigências nutricionais que aumentaram ao longo dos anos de seleção para genótipos mais produtivos (Scadura et al., 2008; Evans e Mair, 2013; Morrison et al., 2018;), em resposta a intensificação dos sistemas de produção.

Estudos avaliando o fornecimento de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal para bovinos de corte ainda são escassos. Entretanto, quando Leclerc et al. (2015) avaliaram o fornecimento de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal para bovinos em confinamento durante 21 dias, observaram maior ganho de peso para os animais que receberam as vitaminas em relação aos que não receberam.

Assim como as vitaminas do complexo B, os minerais traço também são importantes pois participam como cofatores de enzimas do metabolismo de nutrientes e na resposta imune do animal (McDowell, 2003). O fornecimento de minerais na forma de hidróxido apresenta vantagens em relação às formas sulfatadas ou quelatadas (minerais ligados a compostos orgânicos), por apresentarem baixa solubilidade no rúmen e maior disponibilidade para absorção intestinal (Caramalac et al., 2017; Shaeffer et al., 2017).

Diante disso, hipotetiza-se que o fornecimento das vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e os hidróximinerais Cu e Zn promovem melhora do desempenho animal associado a efeitos positivos sobre os parâmetros de qualidade da carne por reduzir o estresse oxidativo, independentemente do nível de amido na dieta, e que animais recebendo dietas de alto amido sejam mais beneficiados pelo consumo das vitaminas do complexo B e os hidróximinerais Cu e Zn, por ser uma dieta de maior potencial oxidativo.

Objetivou-se avaliar o fornecimento de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e hidróximinerais Cu e Zn sobre o desempenho produtivo, qualidade da carne, saúde ruminal e histopatologia do ceco de bovinos Nelore confinados recebendo dietas de baixo ou alto amido.

Material e métodos

Estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA; protocolo 0059/2022) e realizado no confinamento da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp campus Botucatu.

Animais e dietas

Neste estudo, foram utilizados 120 machos Nelore inteiros, com idade aproximada de 30 meses e peso médio de 374 ± 28 kg. Os animais foram vermifugados e vacinados contra raiva e clostridioses no início do período experimental. Inicialmente, os 120 animais foram alocados em cinco baias coletivas (n=24) para aclimatação durante nove dias. Durante esse período os animais tiveram livre acesso à água e receberam alimentação na proporção volumoso concentrado de 70:30 à base de feno, milho, soja e mistura mineral. Após período de aclimatação, os animais permaneceram em jejum de alimento sólido por 16h e então foram pesados

e divididos em dois grupos (blocos), em relação ao peso corporal inicial, e alocados em 24 baias cobertas, de piso ripado suspenso, com bebedouro automático e cocho individuais, contendo cinco animais por baia.

O protocolo de adaptação à dieta experimental foi o “step up”, consistindo no uso de três dietas variando a relação volumoso:concentrado, por um período total de 14 dias. As dietas foram compostas por milho, soja, ureia, mistura mineral-vitamínica, bagaço-de-cana e silagem de sorgo. A relação volumoso:concentrado foi de 40:60 (5 dias), 30:70 (4 dias) e 20:80 (5 dias) nas dietas de adaptação, respectivamente, até alcançar a relação de 11:89 para a dieta de terminação (Tabela 1). As dietas foram calculadas para que atingissem o ganho médio diário de aproximadamente 1,5 kg, de acordo com o NASEM (2016).

O período de confinamento foi dividido em duas etapas: a primeira de 1 a 55 dias, e a segunda de 56 a 108 dias. Nos primeiros 55 dias de confinamento todos os animais receberam dieta de alto amido (HS), sendo divididos em dois tratamentos: **HS**: sem adição das vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e minerais Zn e Cu na forma de sulfato; e **HSVI**: com adição do produto comercial de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal (Vivalto®, Trouw Nutrition, Amersfoort, Utrecht, Holanda) e hidróximinerais cobre e zinco (IntelliBond® C e Z, Trouw Nutrition, Amersfoort, Utrecht, Holanda). A partir do 56º dia de confinamento, metade dos animais passaram a receber dieta de baixo amido, sendo então divididos em quatro tratamentos (Figura 1): **HS**: Dieta de alto amido; **LS**: Dieta baixo amido; **HSVI**: Dieta de alto amido + Vivalto + IntelliBond C e Z; e **LSVI**: Dieta de baixo amido + Vivalto + IntelliBond C e Z.

A transição da dieta de alto amido para baixo amido nos tratamentos LS e LSVI ocorreu gradualmente, até que se atingisse 100% do fornecimento da ração de baixo amido, da seguinte forma: **1º dia** (dia 56): fornecimento de 33% da ração de baixo amido + 67% da ração de alto amido; **2º dia** (dia 57): fornecimento de 67% da ração de baixo amido + 33% da ração de alto amido; **3º dia** (dia 58): fornecimento de 100% da ração de baixo amido.

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Item	Dietas de terminação ¹	
	Alto amido	Baixo amido
Ingredientes das dietas experimentais, % da MS		
Bagaço de cana	11,00	11,00
Milho moído	75,46	21,81
Milho desengordurado moído	-	14,90
Polpa cítrica	-	38,52
Farelo de soja	9,52	9,75
Mistura mineral ²	3,12	3,12
Ureia	0,90	0,90
Composição química, % da MS		
Matéria seca	89,24	89,33
Proteína bruta	14,46	14,87
Extrato etéreo	2,06	2,95
Fibra em detergente neutro	19,66	27,31
Fibra em detergente ácido	8,73	16,48
Carboidratos não fibrosos	58,01	17,34
Amido	53,99	23,33
Nutrientes digestíveis totais	72,70	67,84

¹HS = Alto amido; LS = Baixo amido.

²Mistura mineral sem Vivalto® e IntelliBond® = Ca (7.60 g/kg); Cl (2.44 g/kg); K (4.90 g/kg); Mg (4.02 g/kg); Na (3.64 g/kg); P (3.20 g/kg); total S (6.80 g/kg); Co (0.59 mg/kg); total Co (1.11 mg/kg); total Cu (15 mg/kg); total Fe (118.95 mg/kg); total I (0.70 mg/kg); total Mn (43.00 mg/kg); total Se (0.25 mg/kg); total Zn (62.00 mg/kg); biotina (94.74 mcg/kg); ácido fólico (0.19 mg/kg); niacina (22.12 mg/kg); ácido pantotênico (6.08 mg/kg); vit. A (3740 UI); vit. B1 (3.45 mg/kg); vit. B2 (1.34 mg/kg); vit. B6 (4.69 mg/kg); vit. D3 (360 UI); vit. E (54.00 UI); monensina sódica (23.40 mg/kg).

²Mistura mineral com Vivalto® e IntelliBond® = Ca (7.00 g/kg); Cl (2.47 g/kg); K (4.90 g/kg); Mg (3.92 g/kg); Na(3.64 g/kg); P (3.20 g/kg); total S (6.80 g/kg); Co (0.59 mg/kg); total Co (1.11 mg/kg); Cu IntelliBond (10.00 mg/kg); total Cu (24.98 mg/kg); total Fe (119.04 mg/kg); total I (24.00 mg/kg); total Mn (43.00 mg/kg); total Se (0.25 mg/kg); Zn IntelliBond (35.00 mg/kg); total Zn (96.55 mg/kg); biotina (16244.41 mcg/kg); ácido fólico (21.94 mg/kg); niacina (22.19 mg/kg); ácido pantotênico (206.08 mg/kg); vit. A (8445.94 UI); vit. B1 (3.47 mg/kg); vit. B12 (2000.00 mcg/kg); vit. B2 (1.34 mg/kg); vit. B6 (132.21 mg/kg); vit. D3 (1509.20 UI); vit. E (95.34 UI); monensina sódica (23.40 mg/kg).

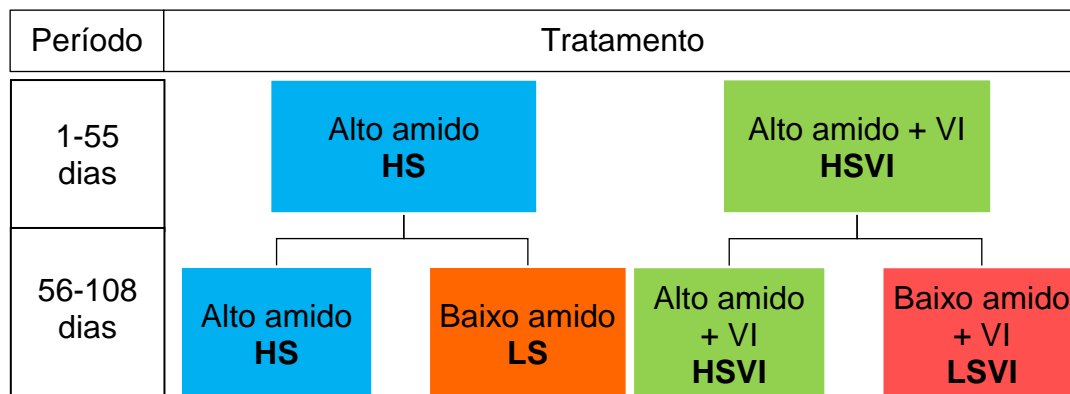


Figura 1. Esquema de distribuição dos tratamentos divididos entre 1 a 55 dias e 56 a 108 dias de terminação. As caixas de cores iguais indicam a mesma ração.

A dieta foi fornecida em dois tratos, 50% às 10h e a outra metade (50%) às 16h. Semanalmente foram coletadas amostra da dieta fornecida e sobras, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -20° C para posterior análise de DM segundo AOAC (1995; método 930.15), matéria mineral (AOAC, 1990; método 942.05), proteína bruta (PB; AOAC, 1998; método 988.05), extrato etéreo (EE; AOAC, 1990; método 930.15), amido (AOAC, 2005; método 996.11) e fibra em detergente neutro (NDF) segundo Van Soest et al. (1994).

Abate e características de carcaça

A área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura no lombo (EGL) e espessura de gordura na garupa (EGG) foram mensurados por ultrassonografia, como descrito por Pinheiro et al. (2011), 6 dias antes do abate. A AOL e EGL foram mensurados entre a 12^a e 13^a costelas, e a EGG na junção dos músculos *gluteus medius* e *bíceps femoris*, entre os ossos íleo e ísquio.

Ao final do período experimental (108 dias), os animais foram pesados por dois dias seguidos, sem jejum de sólidos, antes do primeiro trato, e então a média de peso desses dois dias foi utilizada para obtenção do peso corporal final (PCF), e o GMD foi calculado pela fórmula: $GMD = (PCF - PCI) / \text{período experimental (55 ou 108 dias)}$. A eficiência alimentar (EA) foi calculada como o ganho de peso total / consumo de ração total (aos 55 ou 108 dias). Então os animais foram transportados para um frigorífico comercial (Frigoestrela, Estrela D'Oeste, SP), onde foram insensibilizados por concussão cerebral com pistola de dardo cativo, seguido pela sangria, esfola e evisceração.

As carcaças foram divididas longitudinalmente, pesadas para obtenção de peso de carcaça quente (PCQ) e resfriadas por 24h a 1°C, e calculado o rendimento de carcaça quente ($RCQ = PCQ/PCF*100$).

Processamento, morfologia e histomorfometria do rúmen

Para avaliação da morfologia do epitélio do rúmen, logo após abate, o rúmen foi lavado e então foram retirados fragmentos de aproximadamente 1cm² do saco cranial (Resende Júnior et al., 2006) de todos os animais, e colocadas em frascos com solução de álcool 70% para posterior análise do número médio de papilas, área média de papilas, área total de superfície de absorção por cm² e participação das papilas

ruminais na área total de superfície absorptiva (Resende Júnior et al., 2006; Daniel et al., 2006). Sendo avaliados, manualmente, o número de papilas por cm² de parede ruminal por 3 observadores treinados, e a média de leitura dos 3 gerou o valor final utilizado. Doze papilas de cada fragmento foram seccionadas da base, aleatoriamente, e mensuradas com o auxílio do programa Image J, assim como a base de cada fragmento coletado. Foram calculados número médio de papilas por cm² (NMP), área média das papilas (AMP), área de superfície absorptiva por cm² de parede (ASA) e participação das papilas ruminais na área total de superfície absorptiva (PSA). A ASA foi calculada pela fórmula: $1 + (NMP \times AMP) - (NMP \times 0,002)$, onde 1 representa o fragmento de 1cm² coletado, e o 0,002 a área basal estimada de cada papila. A PSA foi calculada por: $(NMP \times AMP / ASA) \times 100$.

Para avaliação da histomorfometria, amostras de aproximadamente 1cm² do saco ventral do rúmen de todos os animais foram coletadas (Walton et al., 2001) e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 24h. Após esse período, foram colocadas em álcool 70% até processamento das amostras. No laboratório as amostras foram desidratadas em álcool, diafanizadas com xilol e embebidas em Paraplast® (Sigma, Saint Louis, MO). Seções de 5µm foram cortadas em micrótomo rotativo, desparafinizadas, hidratadas e coradas pela técnica hematoxilina-eosina conforme descrito por Luna (1968).

As lâminas foram analisadas em microscópio Leica DMLB 80 conectado a câmera Leica DC300FX com auxílio do software Leica Qwin versão 3 para Windows. Foram escolhidas quatro papilas aleatórias por animal para mensuração de largura, altura e área das papilas, e espessura do epitélio queratinizado (Pereira et al., 2016).

Processamento e análise histopatológica do ceco

Para avaliação microscópica do ceco, amostras de aproximadamente 1cm² do ceco foram coletadas (Walton et al., 2001) de todos os animais e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 24h. Após esse período, foram colocadas em álcool 70% até processamento das amostras. No laboratório as amostras foram desidratadas em álcool, diafanizadas com xilol e embebidas em Paraplast® (Sigma, Saint Louis, MO). Seções de 5µm foram cortadas em micrótomo rotativo, desparafinizadas, hidratadas e coradas pela técnica hematoxilina-eosina conforme descrito por Luna (1968).

As lâminas foram analisadas em microscópio de (Olympus BX-61), nas objetivas de 10x, 20x, 40x e na objetiva de 100x, através do uso de óleo de imersão quando necessário na microscopia do ceco. Foi estabelecido um protocolo de avaliação baseado na composição e intensidade da lesão e/ou infiltrado inflamatório. A intensidade foi dividida em quatro escores, sendo estes 0 (zero) para ausência de lesão e/ou infiltrado inflamatório, 1 (um) para discreta, 2 (dois) para moderada e 3 (três) para lesão e/ou infiltrado inflamatório acentuado. O cálculo para determinação da porcentagem de animais para cada grau de cada lesão foi realizado da seguinte forma: (Número de animais do tratamento com determinada lesão em determinado grau / número total de animais do tratamento)*100

Qualidade da carne

Após a desossa, dois bifés de aproximadamente 2,54 cm de cada animal foram coletados do músculo *Longissimus thoracis* entre a 11^a e 13^a costelas da meia carcaça esquerda, embalados à vácuo em pacotes de polietileno e mantidos em refrigeração entre 2 e 4 °C por 14 dias. Após o período de maturação (14 dias), foram determinados coloração, perda de peso por cocção (PPC) e força de cisalhamento (FC). Um bife foi utilizado para análise de *purge loss*, PPC e FC. A *purge loss* foi considerada como a água retida nos saquinhos onde a carne estava embalada e foi descongelada. O bife foi pesado e cozido em forno elétrico pré-aquecido a 170 °C. Quando a temperatura interna da amostra atingiu 40 °C, foi virada até que atingisse a temperatura final de 71 °C. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos e então pesadas novamente para determinação da PPC, que foi dividida em *evaporation loss* e *drip loss*. A somas de *purge*, *evaporation* e *drip losses* foram consideradas como perda de água total. Após a cocção das amostras, 8 núcleos redondos (1,27 cm de diâmetro) de carne, livre de gordura visível e tecido conjuntivo, foram cortados paralelamente ao longo das fibras musculares (AMSA, 1995), e cada núcleo foi cisalhado perpendicularmente à direção da fibra, utilizando lâmina Warner-Bratzler em equipamento Brookfield CT-3 Texture Analyzer (AMETEK Brookfield, Middleborough, Estados Unidos) e então foram feitas as médias por animal.

A coloração da carne (L^* - luminosidade; a^* - coloração vermelho; b^* - coloração amarelo) foi mensurada a partir do sistema CIELAB utilizando-se um colorímetro KONICA MINOLTA - CR 400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Tokyo, Japan), com iluminante A, ângulo de observação 10°, abertura de 5,0 cm e display Y: 0,01 a 160%

de reflectância. A unidade foi calibrada utilizando-se uma placa para o padrão preto e branco e assim foi determinada a média de três medidas tomadas em diferentes regiões do músculo LT, sempre com ao menos 30 min de exposição da amostra sob refrigeração de 2 a 5 °C - blooming time. O índice colorimétrico C^* (quantidade de cor ou saturação de cor) foi calculado pela equação $[(a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5}$ e o h^* (coloração real) a partir da fórmula $[\tan^{-1}(b^*/a^*)]$ (Cañeque et al., 2004; Hernández Salueña et al., 2019).

A análise de composição centesimal foi conduzida por espectroscopia de infravermelho no equipamento Foodscan™ (FOSS, Hillerod, Denmark) para a determinação de colágeno, gordura intramuscular, proteína, umidade e minerais. As amostras foram descongeladas a 4°C por 24h e a gordura subcutânea dos bifes foi removida com bisturi para a análise. Em seguida, o bife foi moído e homogeneizado em um processador por 5 minutos, com aproximadamente 180g de amostra, de acordo com o método AOAC 2007-04. Foram realizadas seis leituras por amostra e a cada leitura a amostra foi retirada da placa, homogeneizada novamente e recolocada na placa.

Análise estatística

Os dados foram testados para a normalidade através do teste de Shapiro-Wilk, usando o procedimento PROC UNIVARIATE no software estatístico SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). O teste Tukey foi utilizado para testar a diferença entre médias, usando o procedimento PROC MIXED. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados em esquema fatorial 2x2, sendo o nível de amido na dieta (alto e baixo) e a inclusão ou não dos produtos Vivalto + IntelliBond foram considerados como efeitos fixos, e o bloco e as baias foram considerados como efeitos aleatórios. Para a variável consumo de matéria seca e histopatologia do ceco (porcentagem calculada como número de animais com alterações histopatológicas correspondentes em relação ao número total de animais do grupo) a baia foi utilizada como unidade experimental (6 repetições por tratamento), e para as variáveis de desempenho, morfologia e histomorfologia do epitélio ruminal, parâmetros de carne e carcaça, o animal foi utilizado como unidade experimental. A significância foi definida como $p \leq 0,05$.

Resultados

A adição de vitaminas do complexo B e HTM Cu e Zn em dietas de alto amido não apresentou efeito ($P > 0,05$) para consumo de MS (DMI), peso corporal, ganho de peso total e ganho de peso médio diário (GMD) e EA durante os primeiros 55 dias de confinamento (Tabela 2).

Tabela 2. Consumo de MS e desempenho de bovinos Nelore alimentados com dietas de alto amido recebendo ou não Vivalto + IntelliBond C e Z entre 1 e 55 dias, e 1 e 108 dias de confinamento.

Item	Tratamentos ¹		SEM	p-valor
	HS	HSVI		
Peso corporal inicial, kg	373,86	374,27	4,361	0,948
CMS adaptação, kg/d ^a	8,28	8,55	0,125	0,132
CMS 1-55 dias, kg/d ^a	9,30	9,53	0,193	0,511
Peso corporal aos 55 dias, kg	460,88	462,75	5,099	0,797
Ganho de peso 1-55 dias, kg	86,90	89,52	2,439	0,456
GMD 1-55 dias, kg	1,58	1,63	0,050	0,455
EA 1-55 dias, kg/kg	0,158	0,163	0,004	0,519

¹HS = Alto amido; HSVI = Alto amido + Vivalto + IntelliBond. EPM = Erro padrão da média (n = 60/tratamento). ^a(n = 12/tratamento). ^b(n = 30/tratamento). CMS = consumo de matéria seca. GMD = ganho de peso médio diário. CA = conversão alimentar. EA = eficiência alimentar.

Quando avaliados no período de 56 a 108 dias de confinamento (Tabela 3), não houve efeito ($P > 0,05$) da inclusão de vitaminas do complexo B e HTM Cu e Zn, bem como da interação nível de amido e inclusão de vitaminas e minerais na dieta sobre as variáveis de desempenho e carcaça. Contudo, dietas de alto amido promoveram maior peso corporal final ($P = 0,004$), ganho de peso total ($P < 0,001$), ganho médio diário ($P < 0,001$) e melhor EA ($P = 0,001$), enquanto dietas de baixo amido fornecidas na segunda metade do confinamento apresentaram aumento no rendimento de carcaça ($P = 0,011$). Dietas de alto amido também proporcionaram maiores valores de ganho de peso total ($P = 0,001$) e ganho médio diário ($P = 0,001$) no período de 1 a 108 dias.

A área média das papilas (Tabela 4; $P = 0,001$) e o número de papilas por cm² ($P = 0,001$) sofreram influência do teor de amido, apresentando maiores valores para dietas de baixo amido. O teor de amido também influenciou a espessura do epitélio

queratinizado ($P = 0,051$), que mostrou maiores valores para os tratamentos de alto amido.

A inclusão de vitaminas do complexo B + HTM promoveu aumento na largura das papilas ($P = 0,051$), e a interação amido \times vitaminas do complexo B + HTM influenciou o número de papilas por cm^2 de parede ruminal ($P = 0,027$), com maior valor para o tratamento HS.

O teor de amido da dieta influenciou a perda de água por gotejamento e evaporação ($P = 0,023$ e $0,010$, respectivamente; Tabela 5), e perda total de água ($P = 0,042$), promovendo maior perda por gotejamento e total nos tratamentos com alto teor de amido. A perda de água por evaporação foi maior para os tratamentos de baixo amido fornecidos na segunda metade do confinamento. A interação amido \times vitaminas do complexo B + HTM teve influência sobre os valores de a^* (intensidade de vermelho; $P = 0,018$) e b^* (intensidade de amarelo; $P = 0,051$), sendo maior para o tratamento HS, seguido por LSVI, HSVI e LS, respectivamente, para ambas as variáveis. Para chroma ($P = 0,019$), foram observados maiores valores para HS, seguido por LSVI, LS e HSVI.

Para *purgue loss*, perda por cocção, força de cisalhamento, pH, L^* , hue, teor de umidade, proteína, gordura intramuscular, matéria mineral e concentração de colágeno da carne (Tabela 5) não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 3. Consumo de MS, desempenho e parâmetros de carcaça de bovinos alimentados com dietas de baixo ou alto amido, recebendo ou não Vivalto + IntelliBond C e Z

Item ^b	Tratamentos ¹				EPM	P - valor		
	HS	LS	HSVI	LSVI		Amido	Aditivo	Amido x aditivo
CMS 56-108 dias, kg/d*	8,98	8,97	8,75	8,79	0,255	0,451	0,664	0,616
CMS 1-108 dias, kd/d*	10,02	9,70	10,56	9,65	0,225	0,057	0,088	0,544
Peso corporal final, kg	525,05	510,02	536,01	516,00	6,099	0,004	0,166	0,682
Ganho de peso 56-108 dias, kg	66,21	47,21	70,44	52,00	3,011	<0,001	0,135	0,927
Ganho de peso 1-108 dias, kg	150,70	135,43	161,83	142,41	5,296	0,001	0,135	0,695
GMD 56-108 dias, kg	1,25	0,89	1,33	0,98	0,056	<0,001	0,135	0,926
GMD 1-108 dias, kg	1,395	1,253	1,498	1,318	0,049	0,001	0,090	0,700
EA 1-108 dias, kg/kg*	0,149	0,139	0,155	0,142	0,004	0,010	0,261	0,744
Peso de carcaça quente, kg	306,52	300,05	311,17	304,32	3,868	0,865	0,249	0,959
Rendimento de carcaça, %	58,38	58,87	58,04	58,95	0,273	0,011	0,633	0,442
Área de olho de lombo, cm ²	72,04	73,28	72,27	71,38	1,421	0,903	0,556	0,454
EGL, mm ⁽³⁾	4,15	4,19	4,07	4,26	0,161	0,503	0,971	0,634
EGG, mm ⁽⁴⁾	9,31	8,84	9,77	9,34	0,305	0,139	0,120	0,944

¹HS = Alto amido; LS = Baixo amido; HSVI = Alto amido + Vivalto + IntelliBond; LSVI = Baixo amido + Vivalto + IntelliBond. ²EGL = Espessura de gordura subcutânea (entre 12^a e 13^a costelas); ³EGG = espessura de gordura subcutânea na altura da garupa. EPM = Erro padrão da média (n = 30/tratamento). *(n = 6/tratamento). ^b(n = 30/tratamento).

Tabela 4. Morfometria e histomorfometria do epitélio ruminal de bovinos alimentados com dietas de alto ou baixo amido, recebendo ou não Vivalto + IntelliBond C e Z

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P - valor			
	HS	LS	HSVI	LSVI		Amido	Aditivo	Amido x aditivo	
<i>Variáveis morfológicas</i>									
Número de papilas por cm ² , n	68,47a	46,27b	56,74ab	52,38b	3,674	0,001	0,613	0,027	
Área de papila, cm ²	0,394	0,498	0,418	0,513	0,286	0,001	0,698	0,620	
ASA, cm ² /cm ² de parede ruminal	27,61	22,86	23,83	26,81	1,916	0,535	0,912	0,141	
Área de papila, % da ASA	96,23	95,53	95,14	95,97	0,322	0,339	0,999	0,132	
<i>Variáveis histomorfométricas</i>									
Largura de papila, cm	0,327	0,331	0,332	0,373	0,016	0,223	0,051	0,276	
Altura de papila, cm	1,987	2,003	1,621	1,933	0,112	0,081	0,213	0,448	
Espessura do epitélio queratinizado, cm	0,015	0,014	0,014	0,014	0,001	0,051	0,636	0,444	
Área de superfície de papila, cm ²	0,646	0,664	0,523	0,663	0,033	0,215	0,085	0,218	

¹HS = Alto amido; LS = Baixo amido; HSVI = Alto amido + Vivalto + IntelliBond; LSVI = Baixo amido + Vivalto + IntelliBond. ASA = Área de superfície absorviva. EPM = erro padrão da média (n = 30/tratamento).

Tabela 5. Parâmetros de qualidade da carne de bovinos alimentados com dietas de alto ou baixo amido, recebendo ou não Vivalto + IntelliBond C e Z

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P - valor		
	HS	LS	HSV1	LSV1		Amido	Aditivo	Amido x aditivo
pH	5,57	5,57	5,56	5,55	0,012	0,805	0,179	0,654
Luminosidade, L*	38,50	38,84	39,05	39,02	0,532	0,769	0,491	0,726
Intensidade de vermelho, a*	24,13a	22,54b	22,73b	23,40ab	0,473	0,316	0,499	0,018
Intensidade de amarelo, b*	11,52a	10,56b	10,90b	11,03ab	0,281	0,137	0,871	0,051
Chroma	26,79a	25,01b	24,80b	25,87ab	0,527	0,397	0,539	0,019
Hue	25,44	25,63	25,07	25,40	0,284	0,487	0,445	0,731
Perda de água por gotejamento, %	8,79	7,63	8,26	7,38	0,435	0,023	0,351	0,672
Perda de água por evaporação, %	18,50	20,54	18,25	19,96	0,726	0,010	0,467	0,631
<i>Purge loss</i> , %	4,48	5,51	5,55	5,40	0,472	0,728	0,128	0,439
Perda de água por cocção, %	27,30	28,17	26,50	27,35	0,591	0,145	0,172	0,985
Perda de água total, %	31,77	31,62	33,26	32,80	0,646	0,042	0,639	0,822
Força de cisalhamento, kgf	5,69	5,44	5,33	5,35	0,205	0,593	0,303	0,525
<i>Chemical composition, g/100g</i>								
Umidade	71,77	71,63	71,60	71,82	0,187	0,827	0,957	0,317
Gordura intramuscular	2,62	2,84	3,28	2,72	0,238	0,748	0,276	0,105
Proteína	23,24	23,31	22,98	23,14	0,125	0,076	0,318	0,729
Colágeno	1,36	1,30	1,39	1,27	0,056	0,184	0,938	0,519
Cinzas	2,31	2,53	2,53	2,32	0,119	0,802	0,847	0,104

¹HS = Alto amido; LS = Baixo amido; HSV1 = Alto amido + Vivalto + IntelliBond; LSV1 = Baixo amido + Vivalto + IntelliBond. EPM = erro padrão da média (n = 30/tratamento).

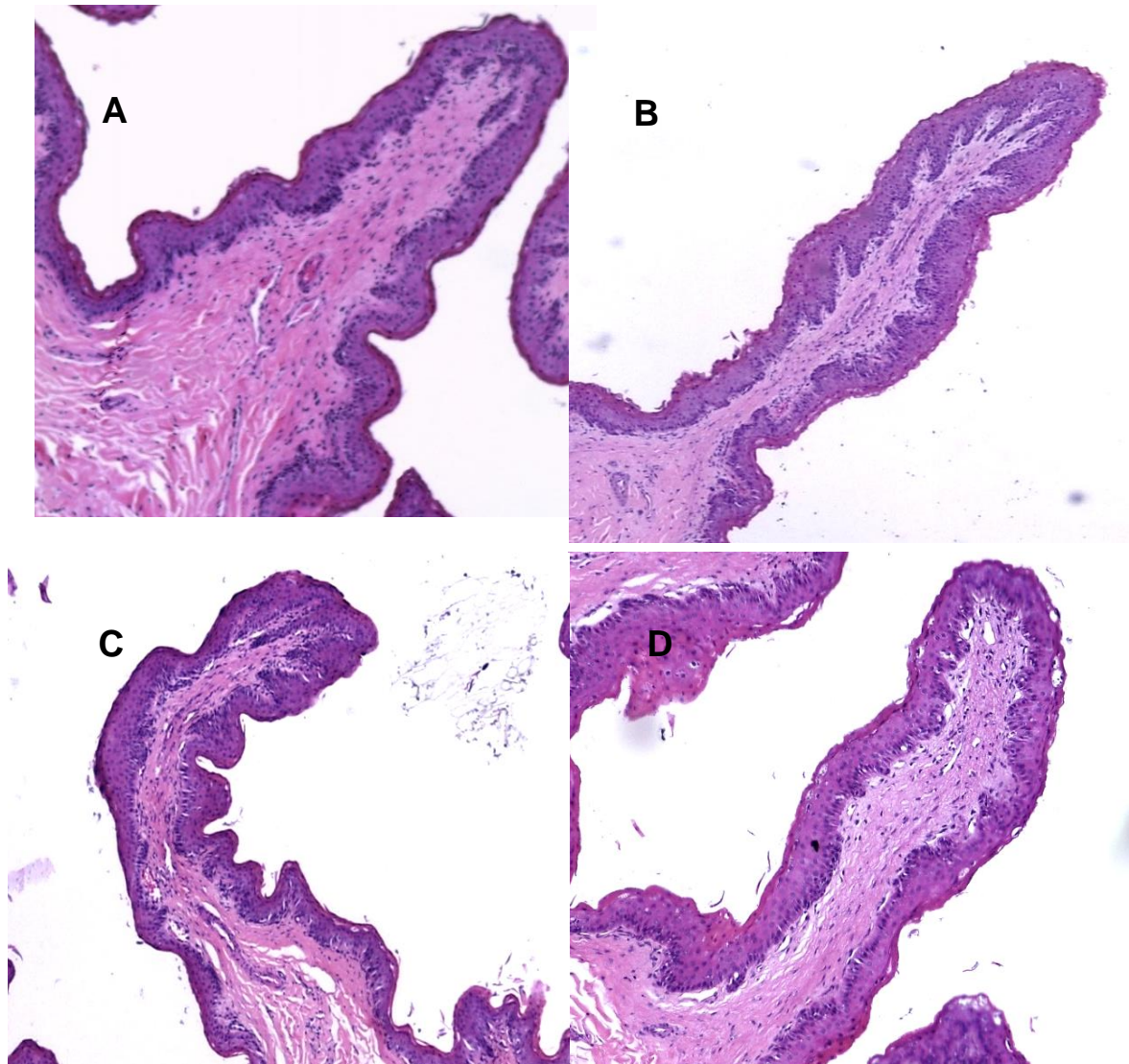


Figura 2. Papila ruminal de bovinos alimentados com dietas de alto amido (A), baixo amido (B), alto amido + vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal + hidróximinerais Cu e Zn (C), e baixo amido + vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal + hidróximinerais Cu e Zn (D). Foto com a objetiva 10x.

Na análise histopatológica do ceco (Figura 3), o único processo observado foi a presença na lâmina própria de infiltrado inflamatório mononuclear associado a eosinófilos, que apresentaram níveis discreto e moderado de infiltrado. Contudo, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para teor de amido, adição de VitB+HTM(Cu+Zn) ou interação entre essas duas condições.

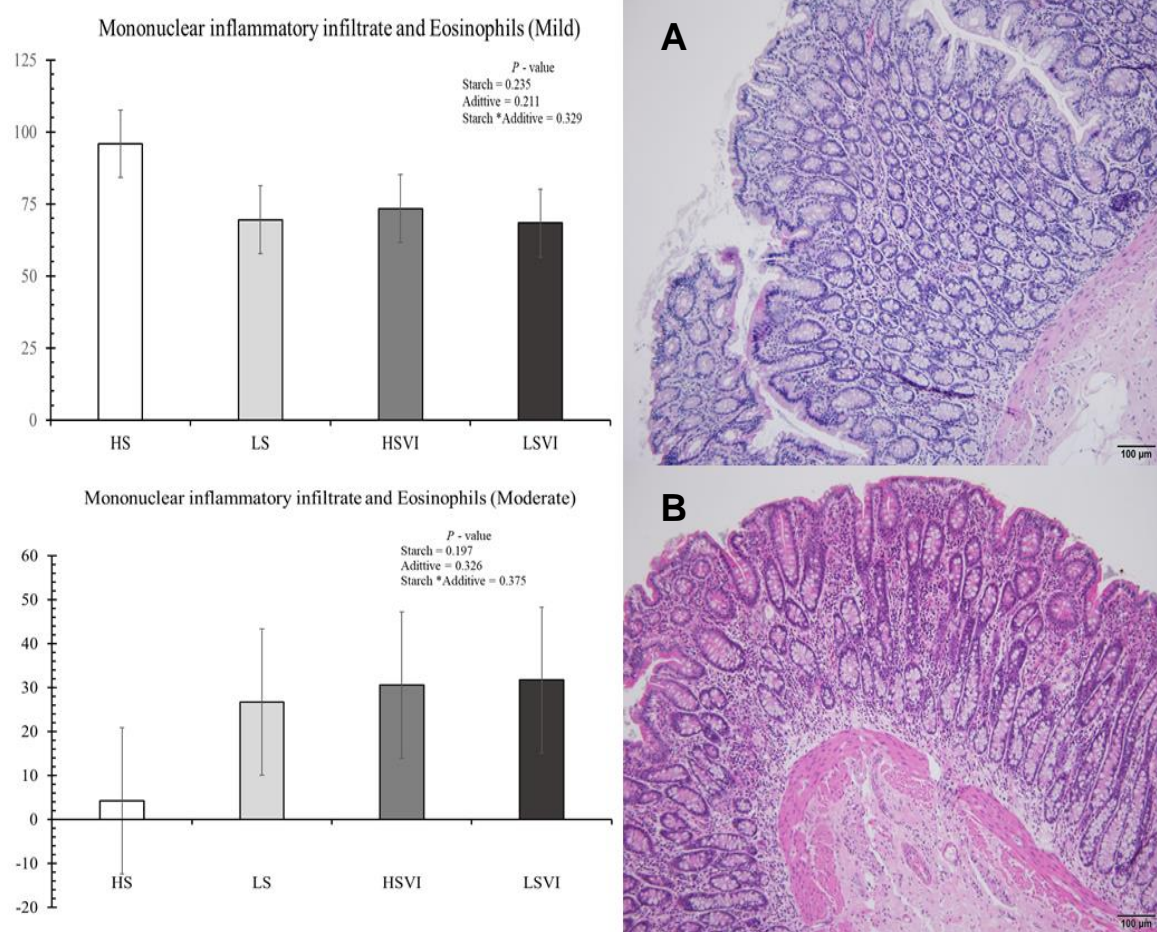


Figura 3. Histopatologia do ceco de bovinos alimentados com dietas de alto amido (HS), baixo amido (LS), alto amido + vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal + hidróximinerais Cu e Zn (HSVI), e baixo amido + vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal + hidróximinerais Cu e Zn (LSVI). A = Epitélio do ceco de animal do tratamento LSVI; B = Epitélio do ceco de animal do tratamento HS. Fotos tiradas com a objetiva 10x.

Discussão

Consumo, desempenho e parâmetros de carcaça

A ausência de efeito do fornecimento das vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e dos minerais Cu e Zn, sobre o CMS e desempenho dos animais podem ser devido as vitaminas do complexo B consumidas via alimentação e produzidas no rúmen serem suficientes para atingir a demanda dos animais, com o fornecimento dessas vitaminas atuando como excedentes, uma vez que os minerais Cu e Zn foram incluídos em quantidades que excedessem as recomendações. Nesse contexto, Scadura et al. (2008) e Juchem et al. (2012), ao avaliarem o fornecimento

de vitaminas do complexo B para vacas de leite de alta produção em dietas adequadamente formuladas, não observaram efeito do tratamento sobre o CMS.

Alguns trabalhos também mostraram não haver efeito significativo para o CMS e ganho de peso em bovinos quando compararam o fornecimento de hidróximinerais com outras fontes minerais como sulfatos e óxidos (Caramalac et al., 2017; Hilscher et al., 2019; Van Kuijk et al., 2022).

Era esperado que animais dos tratamentos HSVI e LSVI apresentassem maior ganho de peso que animais dos tratamentos HS e LS. Entretanto, o perfil da dieta tem grande influência sobre a produção das vitaminas do complexo B no rúmen (Zinn et al., 1987; Santschi et al., 2005; Schwab et al., 2006), e neste caso, tanto as dietas de alto ou baixo nível de amido devem ter proporcionado quantidades adequadas dessas vitaminas e minerais aos animais. A diferença de 2,3 vezes na concentração de amido entre as dietas (HS vs LS) não proporcionou uma situação desafiadora aos animais, uma vez que não foram observados danos ao epitélio ruminal ou alterações histopatológicas no ceco, bem como a capacidade absorptiva da parede ruminal, e provavelmente não foram desafiadoras o suficiente para provocar maior estresse oxidativo no fígado, principalmente para os tratamentos de alto amido.

O maior ganho de peso e melhor EA dos animais que receberam dietas de alto amido em detrimento dos que receberam dieta de baixo amido pode ser atribuído à maior concentração energética das dietas, onde dietas de alto amido apresentaram NDT 8% maior em relação as dietas de baixo amido. Os nutrientes metabolizados a partir do amido, de forma geral, são gliconeogênicos, pois há maior produção de propionato no rúmen em comparação aos nutrientes metabolizados a partir da FDN, que são mais lipogênicos, pois há maior produção de acetato e menor produção de propionato (Leiva et al., 2000).

A menor relação acetato:propionato no rúmen, para um mesmo ganho de proteína, está associada a maior eficiência de uso da energia metabolizável para manutenção (km) e ganho (kg; NRC, 2007) pelos animais, pois reduz a degradação de aminoácidos para suprimir a deficiência de energia (Tedeschi et al., 2008), o que significa que aumentar a produção de propionato pode promover maior ganho de massa muscular, que pode refletir em melhor EA.

As diferenças na EA podem ser associadas a digestibilidade, geração de gases durante a fermentação ruminal, absorção de nutrientes, perdas por excreção, produção de calor e eficiência de conversão de energia para manutenção e crescimento

(Nkrumah et al., 2006). Cribbs et al. (2015), ao avaliarem a substituição de milho floculado por até 20% de polpa cítrica desidratada para novilhas por 56 dias de confinamento, também observaram redução da EA.

Uma diferença na relação acetato:propionato também pode explicar a diferença no rendimento de carcaça quente entre os tratamentos, que pode ter acarretado menor quantidade de gordura visceral nos animais que receberam dietas de baixo amido. No rúmen, o amido promove maior produção de propionato, um ácido graxo de cadeia curta gliconeogênico, enquanto no intestino o amido aumenta a disponibilidade de glicose, que promove maior concentração sanguínea de insulina, estimulando a lipogênese. Em dietas baseadas em grãos, o escape de amido do rúmen para o intestino pode chegar a até 40% (Orskov, 1986). Essa relação entre maior disponibilidade de glicose e gordura visceral foi observada por Baldwin et al. (2007), que ao avaliarem a infusão de amido hidrolisado e glicose no abomaso de novilhos, observaram aumento na deposição de gordura abdominal em relação a gordura subcutânea, mesmo ocorrendo similar ingestão de calorías.

Morfologia e histomorfometria do epitélio ruminal e histopatologia do ceco

As papilas ruminais sofrem adaptações de acordo com a dieta para basicamente duas funções: estabilização do pH e absorção de ácidos graxos de cadeia curta (Dirksen et al., 1985). A menor área média das papilas e maior espessura do epitélio queratinizado (Figura 1) nas dietas de alto amido pode ser devido ao menor pH ruminal em resposta a maior quantidade de amido na dieta. Quantidades excessivas de amido no rúmen podem levar a um menor desenvolvimento das papilas e hiperqueratose do epitélio como forma de proteção ao baixo pH ruminal (Millen et al., 2016). Apesar da polpa cítrica possuir alto teor de pectina, que também é rapidamente fermentável no rúmen, produz menos ácido láctico em relação ao amido, promovendo pH mais alto (Bampidis and Robinson, 2006) e, conseqüentemente, ocasionando melhor desenvolvimento das papilas ruminais.

Assim como o tamanho, a densidade de papilas também sofre influência da dieta, onde juntas, essas adaptações (tamanho e densidade) tentam manter a área de superfície de absorção ruminal adequada para a manutenção do metabolismo energético (Dirksen et al., 1985). Neste caso, além do efeito do teor de amido da dieta, a densidade de papilas também foi afetada pela adição das vitaminas do complexo B + HTM. Apesar dessas diferenças, a área de superfície de absorção e a participação

das papilas na área total de absorção não diferiram entre os tratamentos, mostrando que o epitélio ruminal se adaptou, mantendo equilíbrio entre número e área das papilas, o que auxilia na explicação de ausência de efeito da inclusão de vitaminas do complexo B + HTM sobre o desempenho animal, uma vez que a capacidade absorptiva da parede ruminal não foi alterada entre os tratamentos. Uma vez que a área de superfície absorptiva (ASA) da parede ruminal foi a variável morfométrica mais correlacionada com a velocidade de absorção dos ácidos graxos de cadeia curta (Melo et al., 2013), não foi influenciada pelos tratamentos, também não é esperado alteração no CMS e no desempenho animal.

Na utilização de dietas desafiadoras (e.g. alto grão/amido), é esperado a ocorrência de maior estresse oxidativo, bem como maior incidência de infiltrado inflamatório no intestino (Alemany-Cosme et al., 2021). Entretanto, não foi observado infiltrado inflamatório mononuclear de intensidade acentuada (Figura 3) em nenhuma das amostras, o que pode ser um indicativo de que as dietas não foram desafiadoras o suficiente para provocar uma resposta negativa no epitélio intestinal, principalmente por não haver diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos de baixo e alto amido.

Ainda são escassos os trabalhos que avaliam o efeito da dieta sobre as alterações histopatológicas nos intestinos, especialmente o ceco, em animais ruminantes. Contudo, ao avaliarem três diferentes níveis de amido (25, 35 e 45%) na dieta de bovinos confinados, Silva et al. (2023) não observaram diferenças significativas para parâmetros morfométricos e score de lesão no ceco.

Qualidade da carne

A perda de água por gotejamento é associada positivamente com o potencial glicolítico (quantidade de compostos que podem ser transformados em ácido lático), mesmo sem alteração do pH final da carne (Traore et al., 2012). Esse fator pode explicar a maior perda por gotejamento nas dietas de alto amido, pois o amido que escapa da digestão ruminal é absorvido no intestino como glicose e pode elevar o glicogênio muscular (Immonen et al., 2001).

O chroma está relacionado ao valor de a^* e, quanto maior o valor de chroma, mais intenso é o vermelho da carne. A variação no a^* e chroma podem se dar pela capacidade antioxidante do músculo, que induz à maior ou menor formação de metamioglobina (Salim et al., 2022). Contudo, a redução nos valores de chroma, b^* e

a* para as carnes do tratamento HSVI em relação a HS demonstram menor estabilidade da coloração da carne com a inclusão das vitaminas do complexo B e HTM em dietas de alto amido.

Era esperado que animais que receberam dietas de alto amido ao longo de todo o período apresentassem maior teor de gordura intramuscular na carne, porém, o pH ruminal possui influência sobre a deposição de gordura intramuscular. A biohidrogenação em pH ruminal baixo promove maior síntese do ácido graxo C18:2 trans10-cis-12, que possui efeito negativo sobre o gene SREBF1, que reduz a biossíntese de lipídios no músculo pela redução da ativação de enzimas, reduzindo, assim, a deposição de gordura intramuscular (Teixeira et al., 2017).

Nesse contexto, os resultados rejeitam a nossa hipótese que a inclusão de vitaminas do complexo B e HTM na dieta aumentariam o ganho de peso animal, associado ao efeito positivo sobre os parâmetros de qualidade de carne independentemente do nível de amido na dieta, uma vez que o desempenho foi influenciado apenas pelo nível de amido na dieta e a carne sofreu apenas algumas alterações de cor.

Conclusão

A adição de vitaminas do complexo B + hidróximinerais Cu e Zn não oferecem melhorias para o desempenho produtivo, qualidade da carne e saúde ruminal de bovinos Nelore confinados. As dietas com alto teor de amido apresentaram maior ganho de peso, melhor CA e EA, porém afetaram negativamente alguns parâmetros de saúde ruminal como a espessura do epitélio queratinizado e área média das papilas, sem alterar a superfície de absorção ruminal. Portanto, a utilização de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal + hidróximinerais Cu e Zn não são recomendadas em dietas de alto concentrado para bovinos Nelore em confinamento, independentemente da estratégia de redução do nível de amido na segunda metade do confinamento ou não.

Referências Bibliográficas

ABULARACH ML, ROCHA CE, FELÍCIO PE (1998) Características de qualidade do contra-filé (m. L. dorsi) de touros jovens da raça Nelore. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 18:205-210.

ALEMANY-COSME E, SÁEZ-GONZÁLEZ E, MORET I, MATEOS B, IBORRA M, NOS P, SANDOVAL J, BELTRÁN B (2021) Oxidative stress in the pathogenesis of Crohn's disease and the interconnective with immunological response, microbiota, external environmental factor, and epigenetics. **Antioxidants** 10:1-21.

AMSA (American Meat Science Association) (Eds.) (1995) **Research guidelines for cookery, sensory and instrumental tenderness measurements of fresh meat**. Chicago: National Livestock and Meat Board, 48 p.

AOAC (15^a Ed.) (1990) **Official methods of analysis**. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.

AOAC (16^a Ed.) (1995) **Official methods of analysis**. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

AOAC (16^a Ed.) (1998) **Official methods of analysis**. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

AOAC (18^a Ed.) (2005) **Official methods of analysis**. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

AVILA VD, CARVALHO VM, BONIN E, MOREIRA LS, MOTTIN C, RAMOS AVG, MENIQUETI AB, BALDOQUI DC, COMAR JF, PRADO IN (2022) Mix of natural extracts to improve the oxidative state and liver activity in bulls finished feedlot. **Livestock Science** 259:1-8.

BALDWIN RL, MCLEOD KR, MCNAMARA JP, ELSASSER TH, BAUMANN RG (2007) Influence of abomasal carbohydrates on subcutaneous, omental, and mesenteric adipose lipogenic and lipolytic rates in growing beef steers. **Journal of Animal Science** 85:2271-2282.

BAMPIDIS VA, ROBINSON PH (2006) Citrus by-products as ruminant feeds: A review. **Animal Feed Science and Technology** 128:175-217.

CAÑEQUE V, PÉREZ C, VELASCO S, DIAZ MT, LAUZURICA S, ÁLVAREZ I, RUIZ DO HUIDOBRO F, ONEGA E, DE LA FUENTE F (2004) Carcass and meat quality of light lambs using principal component analysis. **Meat Science** 67:595-605.

CARAMALAC LS, NETTO AS, MARTINS PMGA, MORIEL P, RANCHES J, FERNANDES HJ, ARTHINGTON JD (2017) Effects of hydroxychloride sources of copper, zinc and manganese on measures of supplement intake, mineral status, and pre- and postweaning performance of beefs calves. **Journal of Animal Science** 95:1739-1750.

CRIBBS JT, BERNHARD BC, YOUNG TR, JENNINGS MA, BURDICK SANCHEZ NC, CARROLL JA, CALLAWAY TR, SCHMIDT TB, JOHNSON BJ, RATHAMANN RJ (2015) Dehydrated citrus pulp alters feedlot performance of crossbred heifers during the received period and modulates serum metabolite concentrations before and after and endotoxin challenge. **Journal of Animal Science** 93:5791-5800.

DANIEL JPL, RESENDE-JUNIOR JC, CRUZ FJ (2006) Participation of the reticulorumen and omasum in the total absorptive surface of the bovine forestomach. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 43:688-694.

DIRKSEN GU, LIEBICH HG, MAYER E (1985) Adaptative changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. **The Bovine Practitioner** 20:116-120.

EVANS E, MAIR DT (2013) Effects of rumen protected B vitamin blend upon milk production and component yield in lactating dairy cows. **Open Journal of Animal Science** 3:76-82.

GUO Y, XU X, ZOU Y, YANG Z, LI S, CAO Z (2013) Changes in feed intake, nutrient digestion, plasma metabolites, and oxidative stress parameters in dairy cows with

subacute ruminal acidosis and its regulation with pelleted beet pulp. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 4:1-10.

HERNÁNDEZ SALUEÑA B, SAÉNZ GAMASA C, DIÑERO RUBIAL JM, ALBERDI ODRIOZA C (2019) CIELAB color paths during meat shelf life. **Meat Science** 157:1-8.

HILSCHER FH, LAUDERT SB, HELDT JS, COOPER RJ, DICKE BD, JORDON DJ, SCOTT TL, ERICKSON GE (2019) Effect of copper and zinc source on finishing performance and incidence of food rot in feedlot steers. **Applied Animal Science** 35:94-100.

IMMONEN K, SCHAEFER DM, PUOLANNE E, KAUFFMAN RG, NORDHEIM EV (2001) The relative effect of dietary energy density on repleted and resting muscle glycogen concentrations. **Meat Science** 54:155-162.

JUCHEM SO, ROBINSON PH, EVANS E (2012) A fat-based rumen protection technology post-rationally delivers a B vitamin complex to impact performance of multiparous Holstein cows. **Animal Feed Science and Technology** 174:68-78.

LECLERC H, ESPINOSA DA, EVANS E, GAYTRAN RZ, FLORES JDG (2015) Effect of rumen protected B vitamins supplementation during receiving period on the productive performance of beef cattle. **ADSA-ASAS Joint Annual Meeting**, Abstract T352.

LEIVA E, HALL MB, VAN HORN HH (2000) Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of Dairy Science** 83:2866-2875.

LUNA LG (3^a Ed.) (1968) **Manual of histology staining methods of the armed force institute of pathology**. McGraw-Hill book company, New York. 258p.

MCDOWELL LR (2^a Ed.) (2003) **Minerals in Animal and Human Nutrition**. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands.

MELO LQ, COSTA SF, LOPES F, GUERREIRO MC, ARMENTANO LE, PEREIRA MN (2013) Rumen morphometrics and the effect of digesta pH and volume on volatile fatty acid absorption. **Journal of Animal Science** 91:1775–1783.

MILLEN DD, AARRIGONI MB, PACHECO RDL (Eds.) (2016) **Rumenology**. Springer International Publishing Switzerland. 314p.

MORRISON EI, REINHARDT H, LECLERC H, DEVRIES TJ, LEBLANC SJ (2018) Effect of rumen-protected B vitamins and choline supplementation on health, production, and reproduction in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science** 101:9016-9027.

NASEM (8^a Eds.) (2016) **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. National Academies Press, Washington, DC, USA. 494p.

NKRUMAH JD, OKINE EK, MATHINSON GW, SCHMID K, LI C, BASARAB JA, PRICE MA, WANG Z, MOORE SS (2006) Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science** 84:145-153.

NRC (Eds.) (2007) **Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids**. National Academy of Science, Washington. 384p.

ORSKOV ER (1986) Starch digestion and utilization in ruminants. **Journal of Animal Science** 63:1624-1633.

PEREIRA MCS, CRUZ GD, ARRIGONI MDB, RIGUEIRO ALN, SILVA J, CARRARA TVB, SANTOS PCS, CURSINO LL, MILLEN DD (2016) Relationships of feedlot performance, feeding behavior, rumen morphometrics, and carcass characteristics of Nelore cattle differing in phenotypic residual feed intake. **Journal of Animal Science** 94:4287-4296.

PINHEIRO TR, MERCADANTE MEZ, ALBUQUERQUE LG, CYRILLO JNSG, BRANCO RH (2011) Phenotypic and genetic parameters compared during repeated measures of longissimus muscle area and subcutaneous fat thickness in Nelore cattle. **Genetics and Molecular Research** 10:2944-2952.

RESENDE JÚNIOR JC, PEREIRA MN, BOER H, TAMMINGA S (2006) Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal of Dairy Science** 89:3096-3106.

SALIM APAA, FERRARI RG, MONTEIRO MLG, MANO SB (2022) Effect of different systems on color of Longissimus muscle of Bos cattle: A systematic review and meta-analysis. **Meat Science** 192:1-12.

SANTSCHI DE, BERTHIAUME R, MATTE JJ, MUSTAFA AF, GIRARD CL (2005) Fate of supplementary B-vitamins in the gastrointestinal tract of dairy cows. **Journal of Dairy Science** 88:2043-2054.

SCADURA FC, ROBINSON PH, EVANS E, LORDELO M (2008) Effects of ruminally protected B-vitamin supplemented on milk yield and composition of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology** 144:111-124.

SCHWAB EC, SCHWAB CG, SHAVER RD, GIRARD CL, PUTNAM DE, WHITEHOUSE NL (2006) Dietary forage nonfiber carbohydrate contents influence B-vitamin intake, duodenal flow, and apparent ruminal synthesis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** 89:174-187.

SGORLON S, STRADAIOLI G, GABAI G, STEFANON B (2008) Variation of starch and fat in the diet affects metabolic status and oxidative stress in ewes. **Small Ruminant Research** 74:123-129.

SHAEFFER GL, LLOYD KE, SPEARS JW (2017) Bioavailability of zinc hydroxychloride relative to zinc sulfate in growing cattle fed a corn-cottonseed hull-based diet. **Animal Feed Science and Technology** 232:1-5.

SILVA TIS, SOUZA JM, ACEDO TS, CARVALHO VV, PERDIGÃO A, SILVA LAF, SILVESTRE AM, NIEHEUS MB, SCHLEIFER WF, CASALI DM, MARTINS CL, ARRIGONI MDB, MILLEN DD. (2023) Feedlot performance, rumen and cecum morphometrics of Nellore cattle fed increasing levels of diet starch containing blend of essential oils and amylase or monesin. **Frontiers in Veterinary Science** 10:1-13.

SMITH SB, CROUSE JD (1984) Relative contribution of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. **The Journal of Nutrition** 114:792-800.

TEIXEIRA PD, OLIVEIRA DO, CHIZZOTTI ML, CHALFUN-JUNIOR A, COELHO TC, GIONBELLI MP, PAIVA LV, CARVALHO JRR, LADEIRA MM (2017) Subspecies and diet affect the expression of genes involved in lipid metabolism and chemical composition of muscle in beef cattle. **Meat Science** 133:110-118.

TRAORE S, AUBRY L, GATELLIER P, PRZYBYLSKI W, JAWORSKA D, KAJAK-SIEMASZKO K, SANTÉ-LHOUTELLIER V (2012) Higher drip loss is associated with protein oxidation. **Meat Science** 90:917-924.

VAN KUIJK S, SWIEGERS P, HAN Y (2022) Hydroxychloride trace minerals improve apparent total tract nutrient digestibility in Bonsmara beef cattle. **Livestock Science** 256:1-6.

VAN KUIJK SJA, JACOBS M, SMITS CHM, HAN Y (2019) The effect of hydroxychloride trace minerals on the growth performance and carcass quality of grower/finisher pigs: a meta-analysis. **Journal of Animal Science** 97:4619-4624.

VAN SOEST PJ, WINE RH (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 50:50–55.

WALTON JP, WAGHORN GC, PLAIZIER JC, BIRTLES M, MCBRIDE BW (2001) Influence of condensed tannins on gut morphology in sheep fed *Lotus pedunculatus*. **Canadian Journal of Animal Science** 81:605-607.

WHEELER TL, SHACKELFORD SD, KOOHMARAIE M (1996) Sampling, cooking, and coring effects on Warner-Bratsler shear force values in beef. **Journal of Animal Science** 74:1553-1562.

ZINN RA, OWENS FN, STUART RL, DUNBAR JR, NORMAN BB (1987) B-vitamin supplementation of diets for feedlot calves. **Journal of Animal Science** 65:267-277.

CAPÍTULO 3 – Efeitos da inclusão de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e hidroximinerais Zn e Cu em dietas com diferentes níveis de amido sobre o transcriptoma do fígado de bovinos Nelore confinados

Resumo – O fígado é um órgão central no metabolismo de animais ruminantes, que pode sofrer danos com o fornecimento de dietas de elevado potencial oxidativo afetando a saúde e o desempenho animal. Neste contexto, o fornecimento de vitaminas e minerais podem atuar como hepatoprotetores. Objetivou-se avaliar diferenças na expressão gênica no fígado de bovinos Nelore confinados, alimentados com dietas de diferentes níveis de amido, recebendo ou não VitB+HTM(Cu+Zn). Foram utilizados 120 machos Nelore inteiros, confinados por 108 dias. Nos dias 1-55 d do confinamento os animais foram divididos em 2 tratamentos com 53,99% de amido na MS: HS = alto amido e HSVI = alto amido + VitB+HTM(Cu+Zn). Do dia 56 a 108 de confinamento, os animais foram divididos em 4 tratamentos: HS; HSVI; LS = baixo amido (23.33% de amido na MS) e LSVI = baixo amido + VitB+HTM(Cu+Zn). A adição de VitB+HTM(Cu+Zn) aumentou o percentual de danos no fígado, associado a infiltrado inflamatório de nível discreto ($P = 0,024$), contudo, reduziu os de nível moderado ($P = 0,046$). Quando avaliado o efeito do nível de amido na dieta sobre a expressão gênica, os animais do tratamento baixo amido apresentaram maior expressão de genes e enriquecimento de vias metabólicas relacionados a proteção hepática (CYP1A2, GSTA4, GSTA1, HP, GSTA1 e GPX3) e metabolismo de ácidos graxos (HADHA, ACSL1, ACSL5, HADHB, EHHADH, CYP4A1 e ACADL), enquanto tratamentos de alto amido apresentaram maior expressão de genes relacionados a processos imunes (MMP9 e MMP12). Ao avaliar o transcriptoma hepático dos animais que receberam VitB+HTM(Cu+Zn), foi observado maior expressão de genes e vias metabólicas relacionados a proteção hepática (BoLa-DRB3, CYP2E1, CYP1A2, STAT3, PARK7, GADD45A, IFI6, SAA2 e SAA4) e produção de energia (G6PC, CPD1, PC, NDUFA13, DLST, NDUFB10, NDUFS5, NDUFB7, NDUFB3 e NDUFS3). A interação entre nível de amido e adição de VitB+HTM(Cu+Zn), alterou o transcriptoma hepático. No grupo HS foram identificados genes relacionados a secreção e sinalização de insulina (ADCYAP1R1 e SOCS1, respectivamente), sinalização de AMPK (CCNA2) e via TNF *MMP9), enquanto no grupo HSVI foram identificados genes e vias relacionados a processos imunes e proteção hepática (CLDN11, MMP9, MMP12, MT1E, MT1A, CCNA2 e IL1A). Para o grupo LS foram enriquecidas vias de secreção pancreática (TRPC1 e ADCY2), sinalização de glucagon (FBP2 e ADCY2) e AMPK (CCNA2 e FBP2). Dietas de baixo amido apresentaram maior expressão de genes relacionados a proteção hepática e genes que enriqueceram vias de metabolismo e degradação de ácidos graxos, enquanto dietas de alto amido apresentaram maior expressão de genes ligados a processos imunes. A adição de VitB+HTM(Cu+Zn) promoveu maior expressão de genes ligados à proteção hepática e de genes relacionados ao metabolismo energético, que enriqueceram vias do metabolismo de piruvato. Dietas de alto amido sem VitB+HTM(Cu+Zn) (HS) apresentam maior expressão de genes que enriquecem vias indicadoras de resistência insulínica.

Palavras-chave: Confinamento. Inflamação. Metabolismo energético. RNAseq.

Introdução

A prática de oferecer dietas ricas em grãos para bovinos em sistema de confinamento é associada ao aumento do estresse oxidativo, com consequência negativa sobre a saúde e desempenho animal (Sgorlon et al., 2008; Guo et al., 2013; Avila et al., 2022), principalmente por afetar a atividade de órgãos como o fígado, que desempenha papel central no metabolismo de nutrientes e na resposta ao estresse oxidativo (Puppel et al., 2014; Fonseca et al., 2019). Nesse contexto, o processo de intensificação do sistema de produção de bovinos de corte (dietas de alto concentrado), necessitam de estratégias nutricionais que melhorem a atividade hepática, visando a maximização do desempenho animal.

Estudos sobre a relação entre dietas de alto concentrado e estresse oxidativo em bovinos de corte ainda são escassos. Porém, diversos estudos com vacas leiteiras mostram que o fornecimento de dietas ricas em concentrado podem elevar o estresse oxidativo e desencadear respostas inflamatórias, bem como danos a atividade e saúde hepática e da glândula mamária, o que leva a redução no desempenho animal (Abaker et al., 2017; Ayemele et al., 2021; Ma et al., 2022).

Contudo, existe a possibilidade da utilização de vitaminas do complexo B e minerais, como Cu (cobre) e Zn (zinco), que além de atuarem como cofatores enzimáticos no metabolismo de nutrientes (Sinclair et al., 2007; NASEM, 2016). Isso não somente promove a saúde hepática, mas também a resposta dos sistemas imune e antioxidante dos animais em sistemas de produção desafiadores, como o confinamento com dietas ricas em grãos. No entanto, a influência da combinação entre vitaminas do complexo B e hidróximinerais Cu e Zn sobre o metabolismo hepático de bovinos de corte ainda é pouco compreendida.

Nesse cenário, nossa hipótese é de que as vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal, combinadas com hidróximinerais Cu e Zn [VitB+HTM(Cu+Zn)] promovem maior expressão de genes relacionados a eficiência energética e proteção hepática, principalmente em dietas ricas em amido, por serem mais desafiadoras. A confirmação dessa hipótese possibilita a adição de vitaminas e minerais como estratégia para redução do estresse oxidativo em animais a partir de sistemas intensivos de produção.

Sendo assim, objetivou-se avaliar o efeito do nível de amido e a adição de vitaminas do complexo B + hidróximinerais Cu e Zn na dieta sobre a histopatologia e expressão gênica do fígado de bovinos Nelore confinados.

Material e métodos

Estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA; protocolo 0059/2022) e realizado no confinamento da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp campus Botucatu.

Animais e dietas

Foram utilizados 120 Nelores inteiros, com idade aproximada de 30 meses e peso corporal inicial de 374 ± 28 kg. Os animais foram vermifugados e vacinados contra raiva e clostridioses no início do período experimental. Inicialmente, os 120 animais foram alocados em cinco baias coletivas (n=24) para aclimatação durante nove dias. Durante esse período (9d) os animais tiveram livre acesso à água e receberam alimentação na proporção volumoso concentrado de 70:30 à base de feno, milho, soja e mistura mineral. Após período de aclimatação (9d), os animais permaneceram em jejum de alimento sólido por 16h e então foram pesados e divididos em dois grupos (blocos), em relação ao peso corporal inicial, e alocados em 24 baias cobertas, de piso ripado suspenso, com bebedouro automático e cocho individuais, contendo cinco animais por baia.

O protocolo de adaptação à dieta experimental foi o “step up”, consistindo no uso de três dietas variando a relação volumoso:concentrado, por um período total de 14 dias. As dietas foram compostas por milho, soja, ureia, mistura mineral-vitamínica, bagaço-de-cana e silagem de sorgo. A relação volumoso:concentrado foi de 40:60 (5 dias), 30:70 (4 dias) e 20:80 (5 dias) nas dietas de adaptação, respectivamente, até alcançar a relação de 11:89 para a dieta de terminação (Tabela 1). As dietas foram calculadas para que fosse atingido o ganho médio diário de aproximadamente 1,5 kg, de acordo com o NASEM (2016).

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Item	Dietas de terminação	
	Alto amido	Baixo amido
Ingredientes das dietas experimentais, % da MS		
Bagaço de cana	11,00	11,00
Milho moído	75,46	21,81
Milho desengordurado moído	-	14,90
Polpa cítrica	-	38,52
Farelo de soja	9,52	9,75
Mistura mineral ¹	3,12	3,12
Ureia	0,90	0,90
Composição química, % da MS		
Matéria seca	89,24	89,33
Proteína bruta	14,46	14,87
Extrato etéreo	2,06	2,95
Fibra em detergente neutro	19,66	27,31
Fibra em detergente ácido	8,73	16,48
Carboidratos não fibrosos	58,01	17,34
Amido	53,99	23,33
Nutrientes digestíveis totais	72,70	67,84

MS = matéria seca.

¹Mistura mineral sem Vivalto® e IntelliBond® = Ca (7.60 g/kg); Cl (2.44 g/kg); K (4.90 g/kg); Mg (4.02 g/kg); Na (3.64 g/kg); P (3.20 g/kg); total S (6.80 g/kg); Co (0.59 mg/kg); total Cu (1.11 mg/kg); total Cu (15 mg/kg); total Fe (118.95 mg/kg); total I (0.70 mg/kg); total Mn (43.00 mg/kg); total Se (0.25 mg/kg); total Zn (62.00 mg/kg); biotin (94.74 mcg/kg); folic acid (0.19 mg/kg); niacin (22.12 mg/kg); pantothenic acid (6.08 mg/kg); vit. A (3740 UI); vit. B1 (3.45 mg/kg); vit. B2 (1.34 mg/kg); vit. B6 (4.69 mg/kg); vit. D3 (360 UI); vit. E (54.00 UI); sodium monensin (23.40 mg/kg).

²Mistura mineral com Vivalto® e IntelliBond® = Ca (7.00 g/kg); Cl (2.47 g/kg); K (4.90 g/kg); Mg (3.92 g/kg); Na(3.64 g/kg); P (3.20 g/kg); total S (6.80 g/kg); Co (0.59 mg/kg); total Cu (1.11 mg/kg); Cu IntelliBond (10.00 mg/kg); total Cu (24.98 mg/kg); total Fe (119.04 mg/kg); total I (24.00 mg/kg); total Mn (43.00 mg/kg); total Se (0.25 mg/kg); Zn IntelliBond (35.00 mg/kg); total Zn (96.55 mg/kg); biotin (16244.41 mcg/kg); folic acid (21.94 mg/kg); niacin (22.19 mg/kg); pantothenic acid (206.08 mg/kg); vit. A (8445.94 UI); vit. B1 (3.47 mg/kg); vit. B12 (2000.00 mcg/kg); vit. B2 (1.34 mg/kg); vit. B6 (132.21 mg/kg); vit. D3 (1509.20 UI); vit. E (95.34 UI); sodium monensin (23.40 mg/kg).

O período de confinamento foi dividido em duas etapas: a primeira de 1 a 55 dias, e a segunda de 56 a 108 dias. Nos primeiros 55 dias de confinamento todos os animais receberam dieta de alto amido (HS), sendo divididos em dois tratamentos: **HS**: sem adição das vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal e hidróximinerais Zn e Cu; e **HSVI**: com adição do produto comercial de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal (Vivalto®, Trouw Nutrition) e hidróximinerais cobre e zinco (IntelliBond® Cu e Zn, Trouw Nutrition) (VitB+HTM(Cu+Zn)). A partir do 56º dia de confinamento, metade dos animais passaram a receber dieta de baixo amido, sendo então divididos em quatro tratamentos (Figura 1): **HS**: Dieta de alto amido (sem VitB+HTM(Cu+Zn)); **LS**: Dieta

baixo amido (sem VitB+HTM(Cu+Zn)); **HSVI**: Dieta de alto amido + VitB+HTM(Cu+Zn); e **LSVI**: Dieta de baixo amido + VitB+HTM(Cu+Zn).

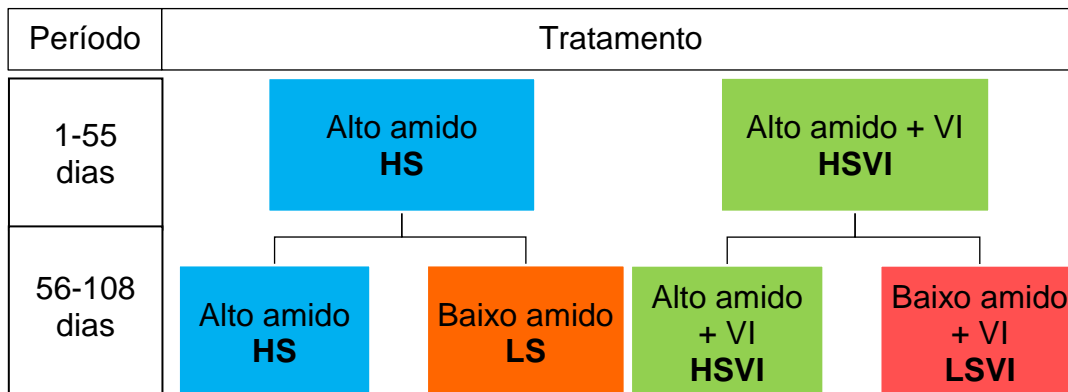


Figura 1. Esquema de distribuição dos tratamentos divididos entre 1 a 55 dias e 56 a 108 dias de terminação. As caixas de cores iguais indicam a mesma ração.

A transição da dieta de alto amido para baixo amido nos tratamentos LS e LSVI ocorreu gradualmente, até que se atingisse 100% do fornecimento da ração de baixo amido, da seguinte forma: **1º dia** (dia 56): fornecimento de 33% da ração de baixo amido + 67% da ração de alto amido; **2º dia** (dia 57): fornecimento de 67% da ração de baixo amido + 33% da ração de alto amido; **3º dia** (dia 58): fornecimento de 100% da ração de baixo amido.

A dieta foi fornecida em dois tratos, 50% às 10h e a outra metade (50%) às 16h. Semanalmente foram coletadas amostra da dieta fornecida e sobras, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -20° C para posterior análise de DM segundo AOAC (1995; método 930.15), matéria mineral (AOAC, 1990; método 942.05), proteína bruta (PB; AOAC, 1998; método 988.05), extrato etéreo (EE; AOAC, 1990; método 930.15), amido (AOAC, 2005; método 996.11) e fibra em detergente neutro (NDF) segundo Van Soest et al. (1994).

Ao final do período experimental (108 dias), os animais foram pesados por dois dias seguidos, sem jejum de sólidos, antes do primeiro trato, e então a média de peso desses dois dias foi utilizada para obtenção do peso corporal final (PCF). Então os animais foram transportados para frigorífico comercial (Frigoestrela, Estrela D'Oeste, SP), onde foram insensibilizados por concussão cerebral com pistola de dardo cativo, seguido pela sangria, esfolagem e evisceração.

Coleta e histopatologia do tecido hepático

Amostras de aproximadamente 1cm² do fígado foram coletadas de todos os animais logo após o abate (Walton et al., 2001) e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 24h. Após esse período, foram colocadas em álcool 70% até processamento das amostras. No laboratório, as amostras foram desidratadas em álcool, diafanizadas com xilol e embebidas em Paraplast® (Sigma, Saint Louis, MO). Seções de 5µm foram cortadas em micrótomo rotativo, desparafinizadas, hidratadas e então coloridas pela técnica hematoxilina-eosina conforme descrito por Luna (1968; Figura 2).

As lâminas foram analisadas em microscópio de Olympus BX-61, nas objetivas de 10x, 20x, 40x e na objetiva de 100x, através do uso de óleo de imersão quando necessário na microscopia do fígado. Foi estabelecido um protocolo de avaliação baseado na composição e intensidade da lesão e/ou infiltrado inflamatório, macrófago espumoso e degeneração hidrópica. A intensidade foi dividida em quatro escores, sendo estes 0 (zero) para ausência lesão e/ou infiltrado inflamatório, 1 (um) para discreta, 2 (dois) para moderada e 3 (três) para lesão, infiltrado inflamatório, macrófago espumoso e/ou degeneração hidrópica acentuada.

Transcriptoma do tecido hepático

Aproximadamente 50 mg de tecido hepático coletados imediatamente ao abate (armazenados em nitrogênio líquido) foram utilizados para extração do RNA utilizando kit Rneasy (Quiagen, Valencia, CA, EUA) segundo recomendação do fabricante. Destes, foram selecionadas 6 amostras por tratamento, sendo uma de cada baia, para análise. A concentração e integridade do RNA total foi verificada por leitura da absorbância em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Santa Clara, CA, EUA). A integridade do RNA também foi verificada por equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) e a concentração do RNA extraído e as contaminações por DNA genômico foram medidas por meio de Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

O sequenciamento (RNA-Seq) foi conduzido em plataforma HiSeq 2500 System (Illumina). A partir do RNA total extraído das amostras foi obtido o RNA mensageiro, o qual foi utilizado na construção das bibliotecas de cDNA com

adaptadores ligados às extremidades. Cada molécula foi sequenciada em ambas as extremidades (sequenciamento pair-end). Os dados de sequenciamento gerados pela plataforma HiSeq System Illumina foram convertidos ao formato FastQ e separados por bibliotecas (dados multiplexados) por meio do software Casava (Illumina). As análises computacionais foram conduzidas na plataforma iPlant Collaborative (Goff et al., 2011). Os fragmentos sequenciados foram tratados conforme procedimentos previamente descritos (Berton et al., 2016).

Nas análises de sequenciamento, após a remoção dos adaptadores de sequenciamento e das sequências de baixa qualidade por meio do programa Seqclean (<http://sourceforge.net/projects/seqclean>), as reads foram mapeadas ao genoma de referência bovino (*Bos taurus* ARS-UCD1.2), disponível em: http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index/, utilizando o programa Tophat v.2.0.11 (Trapnell et al., 2012). O mapeamento foi realizado de forma independente para cada amostra, permitindo até dois mismatches por read. A montagem dos transcritos foi realizada com o programa Cufflinks v2.2.1 (Trapnell et al., 2010), para o qual foi fornecido um arquivo de anotação de referência.

Subsequentemente, foram estimados a abundância dos transcritos, cujo nível de expressão foi determinado pelo número normalizado de fragmento por kilobase por milhão de fragmentos mapeados (RPKM). Uma vez montados os transcritos para cada uma das amostras, por meio do programa Cuffmerge v.2.0.2 foi gerado um arquivo único de anotação, unindo de maneira parcimoniosa os transcritos montados. Quanto a questão de trimagem das reads para alinhamento do RNA-seq, foi utilizado o software Trim Galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). A qualidade do alinhamento e do sequenciamento foram avaliados por meio do software FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e multiQC (<https://multiqc.info/>), visando a geração de métricas de qualidade.

A matriz de contagem foi produzida por meio do programa HTSeq-count v.0.6.1p1 (Anders et al., 2015), que utilizou arquivos provenientes do mapeamento de cada biblioteca efetuado pelo programa HISAT2 e a anotação proveniente da execução do Cufflinks. Foi utilizado o modo intersection nonempty para contagem das sobreposições dos mapeamentos das sequências nos genes, no qual as sequências que alinharam em mais de um gene foram consideradas ambíguas e descartadas da

contagem. Foram criadas matrizes distintas para cada tratamento (Baixo vs. Alto amido; Controle vs VitB+HTM(Cu+Zn) e interações nível de amido e VitB+HTM(Cu+Zn).). O programa HTSeq-count permitiu a quantificação individual dos fragmentos de sequências em cada gene por biblioteca. No estudo de predição de novos transcritos utilizando o Cufflinks e o Cuffmerge, o software Rsubread, que já possui pipelines de integração com esses softwares, foi utilizado no lugar do HISAT2.

Para a análise dos dados de sequenciamento e expressão gênica foram utilizados diferentes métodos como edgeR e Inferência Bayesiana – baySeq. O primeiro é um método da máxima verossimilhança condicional ajustada pelos quantis (qCML), utilizado em um teste exato análogo ao de Fisher (Robinson and Smyth, 2008). Para determinar a expressão diferencial pelo método implementado no pacote edgeR (Galaxy tool version v.0.0.2) foi considerado o parâmetro de comparação pairwise para tipo de análise e foi assumido que os dados de contagem seguem distribuição binomial negativa. Após, o fator de normalização, chamado trimmed mean of M-values (TMM), foi estimado entre cada par de amostras (Robinson and Oshlack, 2010). A expressão de cada gene foi calculada como média de expressão de todas as amostras para cada grupo e apresentada como média da função logarítmica das contagens por milhões (CPM). O procedimento de Benjamini and Hochberg (1995) foi utilizado para indicar a proporção esperada de hipóteses nulas rejeitadas erroneamente, possibilitando o controle da taxa de falsas descobertas (False Discovery Rate - FDR). Valores de significância ajustadas para $FDR < 1\%$ foram utilizados para identificar os genes diferencialmente expressos. O volcano plot foi construído usando o Log^2 (fold change) < 1 ou > 1 e p-valor ajustado de < 0.05 .

Já o método baySeq v.2.18.0 (Hardcastle and Kelly, 2010), implementado como um pacote do repositório R/Biocondutor e baseado em Inferência Bayesiana, utiliza informações a priori para ajustar um modelo não linear aos dados, visando quantificar perturbações e incertezas em suas estimativas (Liu and Logvinenko, 2008). O método assume distribuição binomial negativa e por iterações até a convergência, obtém-se, pela máxima verossimilhança, uma distribuição de probabilidade prévia empiricamente determinada a partir do conjunto de dados inteiros (Hardcastle and Kelly, 2010). Este método produz probabilidades posteriores em vez de valores de significância e possui controle da FDR. O critério de $p < 1\%$, sendo p a probabilidade posterior, foi utilizado para determinar genes diferencialmente expressos.

Para a identificação do papel biológicos dos genes identificados como diferencialmente expressos entre grupos de animais (Baixo vs. Alto amido; Controle vs VitB+HTM(Cu+Zn) e interações nível de amido e VitB+HTM(Cu+Zn), listas dos genes com diferença de expressão foram utilizadas para a análise de termos de ontologia de genes por meio da ferramenta Database for Annotation, Visualization and Discovery Integrated (DAVID) versão 6.8 (Huang et al., 2007). Para a identificação das vias metabólicas que estes genes participam foi utilizada a plataforma KEGG Pathway Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Em complementação a análise de termos de ontologia de genes, foi utilizado o pacote do R clusterProfiler (<https://guangchuangyu.github.io/software/clusterProfiler/documentation/>), pois é uma ferramenta que auxiliará na visualização dos resultados.

Análise estatística

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados em esquema fatorial 2x2, sendo o nível de amido na dieta (alto e baixo) e a inclusão ou não dos produtos Vivalto + IntelliBond, foram considerados como efeitos fixos, e o bloco e as baias como efeitos aleatórios. Os dados foram testados para a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE), à avaliação da homogeneidade das variâncias pelo teste BoxCox (PROC TRANSREG). Os dados que não apresentaram distribuição normal no resíduo, foram transformados pelo procedimento PROC RANK. Para comparação de média foi realizado o teste Tukey (PROC MIXED), no software estatístico SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Para a variável consumo de matéria seca e histopatologia do fígado (As alterações percentuais no tecido hepático foram calculadas como o número de animais com alterações histopatológicas correspondentes em comparação com todos os animais do grupo) a baia foi utilizada como unidade experimental (6 repetições por tratamento). Para as variáveis de desempenho, o animal foi utilizado como unidade experimental. A significância foi definida como $p \leq 0,05$.

Resultados

Desempenho e histopatologia do fígado

Os animais que receberam dietas com alto teor de amido apresentaram maior peso corporal final ($P = 0,004$); ganho médio diário (GMD; $P = 0,001$), entretanto, não houve efeito para o consumo de matéria seca (CMS; $P = 0,451$; Tabela 2).

Ao avaliarmos o efeito do nível de amido sobre os parâmetros histopatológico, animais que receberam dietas HS apresentaram maior percentual de danos associado com macrófago espumoso discreto ($P = 0,002$; Tabela 2; Figura 2D) quando comparado ao grupo LS. Entretanto, o fornecimento de VitB+HTM(Cu+Zn) aumentou a ocorrência de infiltrados inflamatórios discretos ($P = 0,024$), contudo, reduziu o percentual de infiltrados inflamatórios moderados ($P = 0,046$).

Ao avaliar a interação amido \times VitB+HTM(Cu+Zn), animais do tratamento HSVI diferiram apenas dos tratamentos LS e LSVI para a ocorrência de macrófago espumoso total ($P = 0,018$), apresentando maior valor, enquanto o tratamento LS apresentou o maior valor, diferindo apenas do tratamento LSVI, para o percentual de macrófago espumoso moderado ($P = 0,030$).

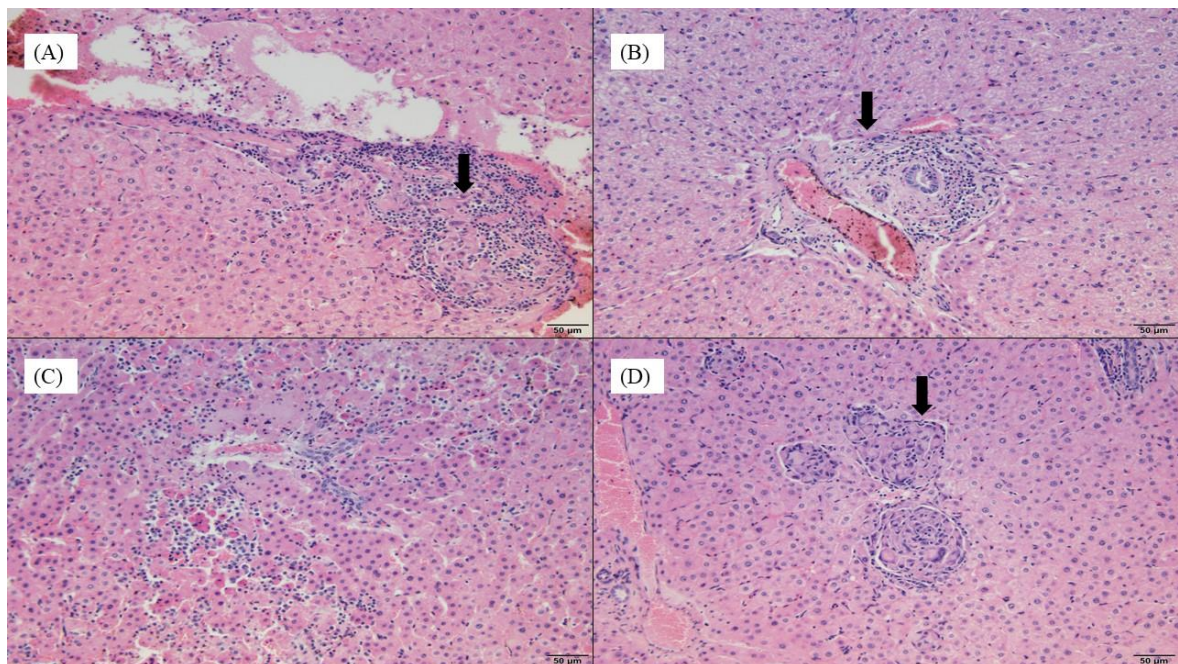


Figura 2. Histomorfometria do fígado, A = Infiltrado mononuclear na região veia centro lobular; B = Infiltrado mononuclear na região espaço porta; C = Necrose; D = macrófago espumoso

Expressão gênica

Efeito do nível de amido na dieta (Baixo vs Alto)

Animais que receberam dietas de baixo amido apresentaram enriquecimento de vias KEGG relacionadas a proteção hepática (Figura 3), como metabolismo de drogas (CYP1A2) e xenobióticos (CYP1A2, GSTA4 e GSTA1) pelo citocromo P450 e metabolismo de drogas por outras enzimas (GSTA1 e GSTA4), e enriquecimento de genes (GO; Figura 4) também relacionados a proteção hepática, como processos imunes (XBP1 e STAT3), atividade antioxidante e detoxificação (HP, GSTA1 e GPX3), e resposta de fase aguda (HP), quando comparados a tratamentos de alto amido. Também foram identificados enriquecimento de vias KEGG relacionadas ao metabolismo de lipídios, como vias de degradação e metabolismo de ácidos graxos (HADHA, ACSL1, ACSL5, HADHB, EHHADH, CYP4A1 e ACADL) para os tratamentos de baixo amido.

Para os genes diferencialmente expressos (DEGs; Figura 7A) na condição baixo vs alto amido, foram expressos genes relacionados a resposta imune (MMP9 e MMP12) e proteção contra danos oxidativos (MT1E e MT1A), que foram negativamente expressos no baixo amido.

Dentre os genes exclusivamente expressos nos tratamentos de alto amido, foram encontrados a subunidade 3 reguladora de fosfoinositina-3 quinase (PIK3R3) e a metaloproteinase-9 (MMP9; Apêndice A). Para os tratamentos de baixo amido, os genes FBP2 e DUSP26 (Apêndice B) foram exclusivamente expressos.

Efeito da adição de vitaminas do complexo B e hidróximinerais Cu e Zn

Ao avaliarmos a adição de VitB+HTM(Cu+Zn) (Figura 5), foi observado enriquecimento de vias KEGG relacionadas à saúde e imunidade como exemplo, processamento e apresentação de antígenos (BoLA-DRB3, metabolismo de drogas e xenobióticos pela citocromo P450 (CYP1A2 e CYP2E1), metabolismo de drogas por outras enzimas (CYP2E1); e vias relacionadas ao metabolismo energético, como fosforilação oxidativa (UQCRB, ATP5MF, UQCR11 e ATP6AP1), vias do ciclo do ácido cítrico (DLST, IDH2, FH e PC – piruvato carboxilase) e metabolismo do piruvato (PKLR, PC e FH). Os dados de ontologia dos genes expressados (Figura 6) apresentaram a relação de genes a resposta imune e de defesa (STAT3), processos

metabólicos de espécies reativas ao oxigênio (PARK7, GADD45A e IFI6), resposta de fase aguda (SAA4 e SAA2), gliconeogênese (G6PC, GPD1 e PC), geração de precursores metabólicos e energia (G6PC, GPD1, IDH2 e DLST) e complexo da cadeia respiratória (NDUFA13, NDUFB10, NDUFS5, NDUFB7, NDUFB3 e NDUFS3).

Na análise de DEGs (Figura 7B) para a comparação de VitB+HTM(Cu+Zn) vs. sem adição de produto, foram identificados poucos genes, e um deles foi o LCN12, relacionado a resposta inflamatória, e que foi positivamente regulado nos tratamentos que receberam VitB+HTM(Cu+Zn).

Dentre os genes exclusivamente expressos, para os tratamentos que receberam VitB+HTM(Cu+Zn) foi encontrado o gene ZMAT3 (Apêndice C), e para os tratamentos sem adição do produto, ELOVL7 e CRABP1 (Apêndice D).

Interação entre nível de amido (Baixo vs Alto) e a inclusão do complexo vitamina B e hidroximinerais Cu e Zn

Entre os tratamentos, pode-se observar que os tratamentos com alta concentração de amido apresentaram ontologia de genes exclusivamente expressos relacionados a morte celular e atividade mitocondrial (Figuras 8A e 8C). O tratamento LS (Figura 8B) apresentou genes exclusivamente expressos relacionados a diversos processos. Dentre eles estão a gliconeogênese, transporte de íons potássio, regulação de transporter transmembrana, glicosilação proteica, catabolismo de lipídios e processos biossintéticos de carboidratos. O tratamento LSVI (Figura 8D) apresentou atividade de genes exclusivamente expressos relacionados ao metabolismo de carboidratos, nucleotídeos e DNA.

Dentre as vias KEGG enriquecidas exclusivas nos tratamentos, foram encontrados genes relacionados a secreção de insulina (ADCYAP1R1), sinalização de AMPK (CCNA2), sinalização de insulina (SOCS1), sinalização da via TNF (MMP9) e sinalização da via FoxO (CCNB1) no tratamento HS (Apêndice F).

Para o tratamento LS foram exclusivamente enriquecidas vias KEGG de secreção pancreática (TRPC1 e ADCY2), via de sinalização do glucagon (FBP2 e ADCY2) e sinalização da via AMPK (CCNA2 e FBP2; Apêndice F).

No tratamento HSVI, foram enriquecidas vias KEGG exclusivas de vias de migração transendotelial de leucócitos (CLDN11 e MMP9), senescência celular (CCNA2 e IL1A), resistência endócrina (MMP9), via de sinalização do TNF (CCNA2) e sinalização da via AMPK (CCNA2; Apêndice G).

No tratamento LSVI o enriquecimento de vias KEGG exclusivas encontradas foram relacionados a sinalização da via AMPc (CNGA2; Apêndice H).

Na análise de DEGs (Figura 9), foram identificados 673 genes para LS vs HS, sendo 46 “down regulated” e 88 “up regulated”, com genes relacionados a resposta imune (MMP9 e MMP12) e resposta a danos oxidativos (MT1E e MT1A) negativamente regulados nos tratamentos de baixo amido. Para LSVI vs LS, 387 genes foram identificados, sendo 52 “down regulated” e 47 “up regulated”, com os genes SAA4 e SULT1B1, relacionado a proteção hepática, positivamente regulados. Entre os tratamentos LSVI vs HSVI, foram identificados 173 genes, sendo 32 “down regulated” e 23 “up regulated”, com genes relacionados a resposta imune (MMP9 e MMP12) e proteção hepática (MT1E e CYP1A1) negativamente regulados no tratamento LSVI. Para a interação entre HS vs HSVI, apenas o gene ENSBTAG00000033680 foi identificado como significativo, sendo negativamente regulado no tratamento HS.

Table 2. Consumo de matéria seca, peso corporal final, ganho de peso médio diário e histopatologia do fígado de bovinos alimentados com dietas de baixo ou alto amido, recebendo ou não Vivalto + IntelliBond C e Z

Item	Tratamentos ¹				EPM	P - valor		
	HS	LS	HSVI	LSVI		Amido	VitB+HTM (Cu+Zn)	Amido x VitB+HTM(Cu+Zn)
Peso corporal final, kg	525,05	510,02	536,01	516,00	6,099	0,004	0,166	0,682
CMS 1-108 dias, kg/d*	10,02	9,70	10,56	9,65	0,255	0,451	0,664	0,616
GMD 1-108 dias, kg	1,39	1,25	1,50	1,32	0,049	0,001	0,090	0,700
Inf. Inflamatório mono. discreto	68,33	68,33	86,67	73,33	4,859	0,194	0,024	0,194
Inf. Inflamatório mono. moderado	28,33	31,67	10,00	26,67	5,553	0,095	0,046	0,267
Degeneração hidrópica total	75,83	65,83	66,67	53,33	6,957	0,123	0,209	0,884
Degeneração hidrópica discreto	45,83	36,67	26,67	26,67	9,318	0,634	0,144	0,679
Degeneração hidrópica moderado	26,67	25,00	26,67	20,00	6,962	0,593	0,756	0,681
Degeneração hidrópica acentuado	3,33	4,17	13,33	6,67	4,762	0,643	0,252	0,443
Necrose aleatória total	17,50	27,50	33,33	33,33	9,102	0,583	0,302	0,603
Necrose aleatória discreta	14,17	10,00	26,67	20,00	7,829	0,641	0,229	0,899
Necrose aleatória moderada	3,33	13,33	6,67	10,00	4,831	0,187	0,931	0,425
Macrófago espumoso total	61,67ab	42,50bc	72,00a	23,33c	6,227	<.0001	0,744	0,018
Macrófago espumoso discreto	37,50	10,00	36,67	20,00	6,532	0,002	0,538	0,328
Macrófago espumoso moderado	13,00ab	28,33a	13,33ab	0,00b	6,153	0,995	0,019	0,030
Macrófago espumoso acentuado	10,00	4,17	10,00	3,33	5,518	0,318	0,927	0,928

¹HS = Alto amido; LS = Baixo amido; HSVI = Alto amido + Vivalto + IntelliBond C e Z; LSVI = Baixo amido + Vivalto + IntelliBond C e Z; SEM = standard error mean (n = 30/treatment). *(n = 6/treatment).



Figura 3: Enriquecimento das vias KEGG diferencialmente expressas na condição baixo vs alto amido.



Figura 4: Ontologia dos genes diferencialmente expressos na condição baixo vs alto amido.



Figura 5: Enriquecimento das vias KEGG diferencialmente expressas na condição adição de VitB+HTM(Cu+Zn) vs. sem VitB+HTM(Cu+Zn).



Figura 6: Ontologia dos genes diferencialmente expressos na condição adição de VitB+HTM(Cu+Zn) vs sem VitB+HTM(Cu+Zn).

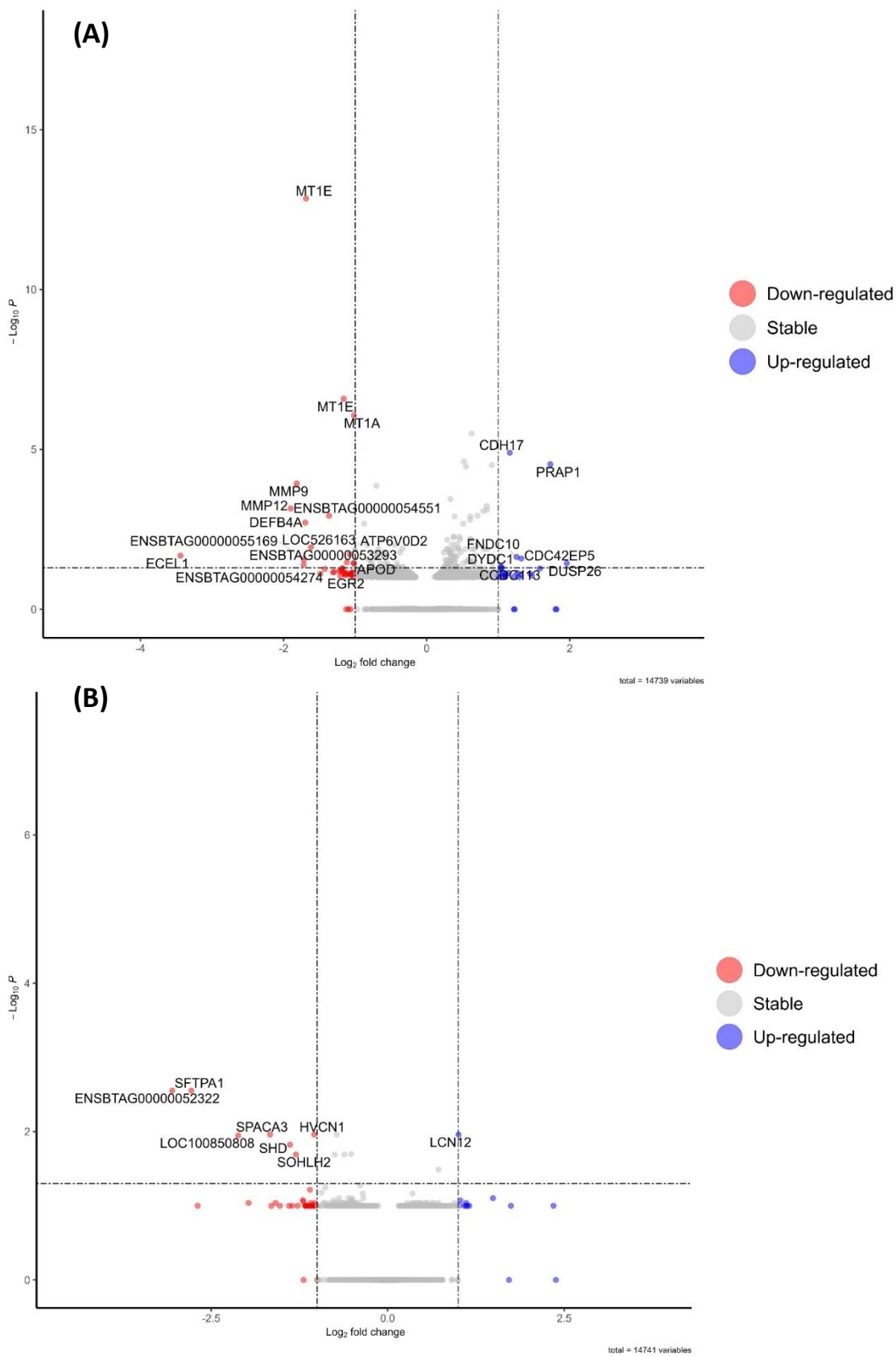


Figura 7: Genes diferencialmente expressos (DEGs) na condição baixo vs alto amido (A) e adição de VitB+HTM(Cu+Zn) vs sem VitB+HTM(Cu+Zn) (B).

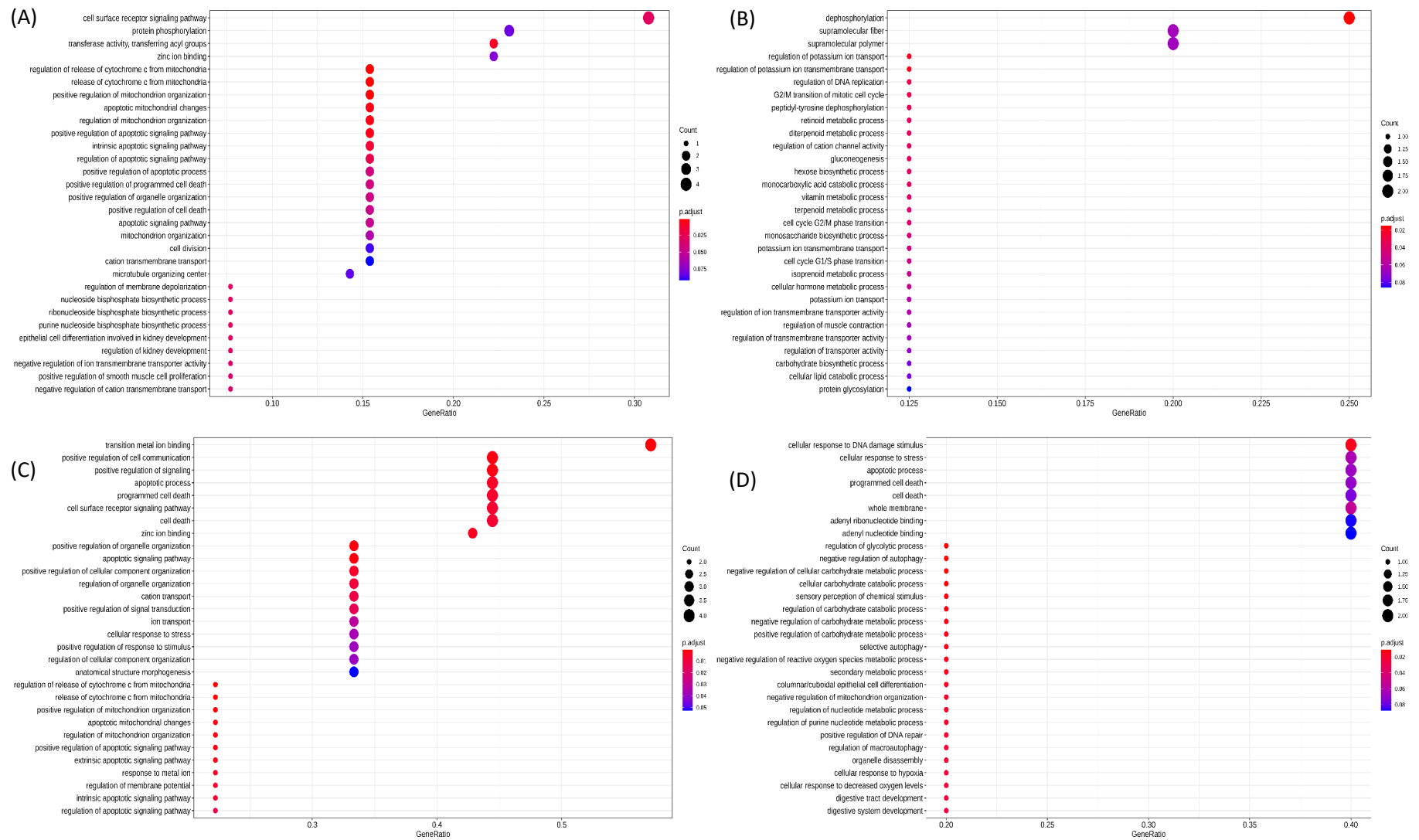


Figure 8: Ontologia dos genes identificados como exclusivamente expressos nos tratamentos; A = HS (High starch); B = LS (Low starch); C = HSVI (High starch + Vivalto + IntelliBond); D = LSVI (Low starch + Vivalto + IntelliBond).

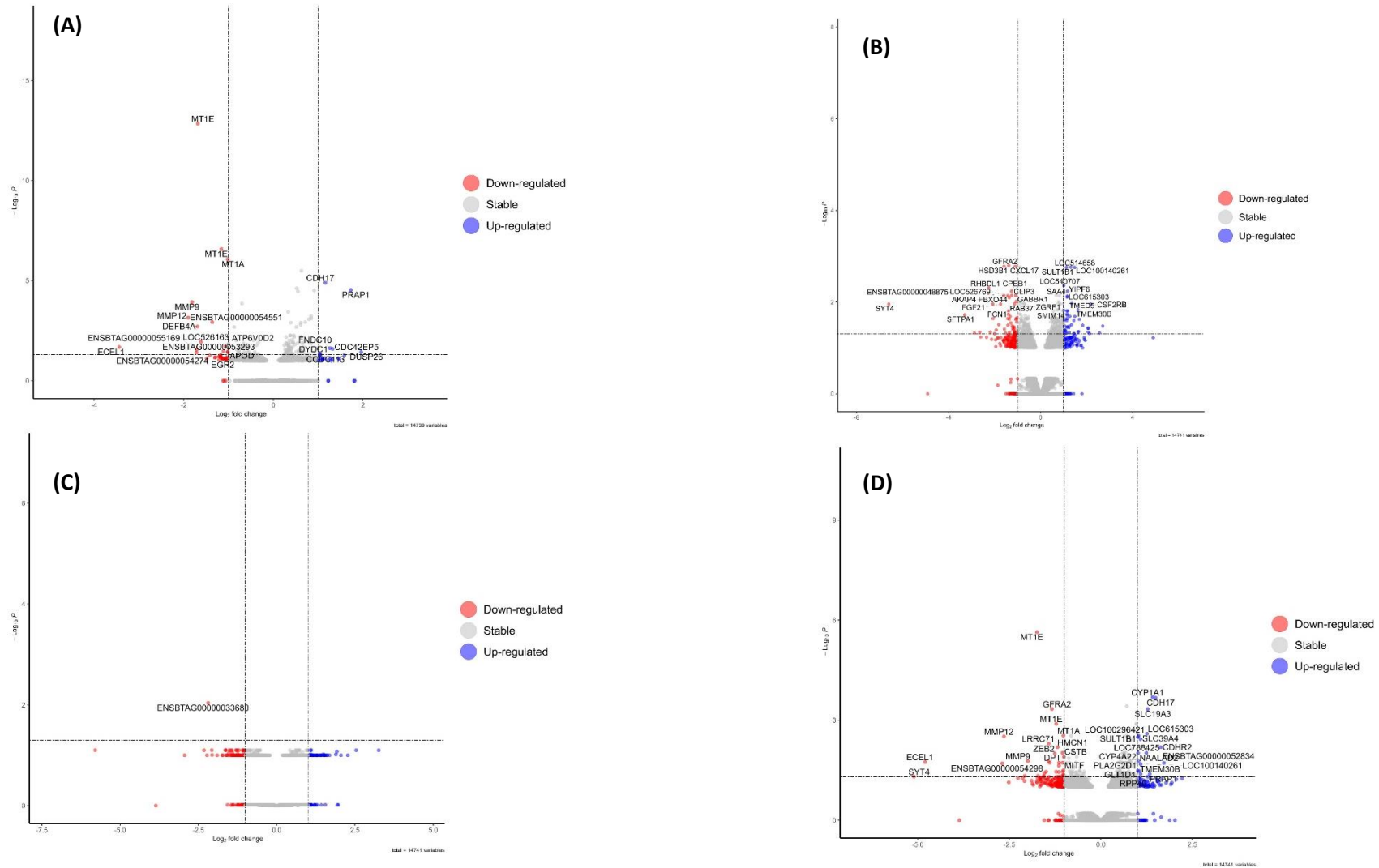


Figura 9: Genes diferencialmente expressos (DEGs) entre os tratamentos. A = LS vs HS; B = LSVI vs LS; C = HS vs HSVI; D = LSVI vs HSVI.

Discussão

A redução do peso corporal final e o GMD dos animais que receberam dietas de baixo amido pode ser associado a redução do teor energético das dietas (NDT de 72,7 vs 67,8), uma vez que o CMS não diferiu entre os tratamentos. Entretanto, dietas ricas em amido são associadas ao aumento do estresse oxidativo no organismo animal, com a ocorrência de distúrbios metabólicos em bovinos (Sgorlon et al., 2008; Guo et al., 2013), como a acidose ruminal e abscessos hepáticos (Nagaraja e Chengappa, 1997), causando danos o tecido hepático, podendo resultar em perda de função (Lundy-Woofolk et a., 2023). Contudo, os abscessos não são as únicas lesões encontradas em fígados de bovinos criados em sistemas intensivos. Lesões microscópicas podem ser encontradas mesmo em fígados macroscopicamente íntegros (Mendes e Pilati, 2007).

A maior incidência de macrófagos espumosos de nível discreto nos tratamentos de alto amido provavelmente ocorreu devido a redução do pH ruminal causado pela alta concentração de amido, que pode causar danos à barreira epitelial e aumento da concentração ruminal de lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana externa das bactérias gram negativas, que pode chegar ao fígado por meio da circulação portal, causando resposta inflamatória (Sanz-Fernandez et al., 2020; Zhang et al., 2022).

O gene STAT3 é importante na sinalização de macrófagos, fazendo o recrutamento destes em tecidos infectados (Cabrera-Ortega et al., 2017), assim como o gene XBP1, que atua na ativação de macrófagos da resposta imune inata (Wang et al., 2022), podendo ser associados à maior ocorrência de fígados com macrófagos espumosos nos tratamentos de alto amido.

A relação entre a incidência de macrófagos, um tipo de leucócito, e o gene MMP9, exclusivamente expresso no tratamento alto amido, foi observada em fígados de ratos, com presença de leucócitos, onde houve maior expressão do gene MMP9 em fígados com maior incidência de macrófagos quando comparado a fígados saudáveis (Hamada et al., 2008). Macrófagos podem ter função inflamatória (tipo M1) ou anti-inflamatória (tipo M2) e, no segundo caso, promove o reparo de tecidos e induz a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), como a MMP9 (Zhang e Wang, 2014) e a MMP12 (Kopeck et al., 2017), que foram menos expressas nos tratamentos de baixo amido em relação aos de alto amido na dieta. Além disso, o outro gene

identificado como exclusivamente expresso na condição alto amido, PIK3R3, também é relacionado a proteção hepática, atuando contra a fibrose, que pode ser originada a partir de condições inflamatórias crônicas (Fu et al., 2020). Essas relações indicam que fígados de animais que receberam dietas de alto amido apresentaram resposta anti-inflamatória mais acentuada relacionada aos macrófagos, que podem estar associados ao tipo de macrófago presente e/ou maior incidência, no geral, de macrófagos no fígado.

Apesar de apresentarem menor incidência de macrófagos, o enriquecimento de vias relacionadas ao metabolismo de drogas e xenobióticos, e de atividade antioxidante e detoxificação foi observado nos tratamentos de baixo amido. Nessas vias, foram encontrados genes de atividade contra ROS, como o CYP1A2 (Shertzer et al., 2004), GSTA4 (Desmots et al., 2002), GSTA1 (Liu et al., 2014), HP (Maffei et al., 2016) e GPX3 (Qi et al., 2018). Essa observação pode ser associada ao enriquecimento das vias metabólicas de degradação e metabolismo de ácidos graxos para as dietas de baixo amido. Apesar da mitocôndria ser associada como fonte de ROS, ela não é a única e nem a principal fonte de ROS no organismo animal (Zhang e Wong, 2021). Na célula, o microsomo é o maior produtor de ROS, seguido pelo peroxissomo, mitocôndria e, por fim, outras enzimas citosólicas (Boveris et al., 1972). Logo, pode ser que a maior expressão de genes de defesa contra ROS seja em resposta a maior produção de ROS pela atividade superior de peroxissomos e microsomos, relacionada aos genes CYP4A1 e EHHADA, respectivamente (Ranea-Robles et al., 2021), no grupo que recebeu dietas com menor concentração de amido.

Enquanto os genes EHHADH e CYP4A1 participam da oxidação dos ácidos graxos nos peroxissomos e microsomos, respectivamente (Ranea-Robles et al., 2021), os genes HADHA, HADHB e ACADL atuam na β -oxidação mitocondrial (Costa et al., 2018; Shao et al., 2019; Busato et al., 2022; Li et al., 2022). A β -oxidação é utilizada quando a glicose disponível para absorção no intestino é limitada (Chow e Jesse, 1992). Esse resultado pode ter ocorrido devido aos diferentes teores de amido das dietas e, conseqüentemente, menor absorção de glicose para os animais dos tratamentos de baixo amido, resultando em maior necessidade de produção de energia a partir da oxidação lipídica.

Essa possível diferença na absorção de glicose também pode estar relacionada a expressão exclusiva do gene FBP2 nos tratamentos de baixo amido. O FBP2

participa da via gliconeogênica e, no fígado de ratos, tem a expressão estimulada pela insulina e inibida pelo glucagon (Zhao et al., 2012).

Por fim, a expressão exclusiva do gene DUSP26 em dietas de baixo amido também possui efeito hepatoprotetor e foi identificado como importante no combate à esteatose (Ye et al., 2019), podendo ser uma resposta ao aumento da oxidação de ácidos graxos no fígado.

No entanto, a menor resposta inflamatória associada com a maior resposta hepatoprotetora para os tratamentos de baixo amido não apresentaram melhora sobre o desempenho animal quando comparado aos tratamentos de alto amido.

Os minerais traço como o cobre e zinco atuam em diversos processos biológicos e, dentre eles, estão a resposta imune (Nelson e Cox, 2018; NASEM, 2016), barreira de defesa epitelial (Horst et al., 2020) e sistema antioxidante (NASEM, 2016; López-Alonso e Miranda, 2020).

A adição de VitB+HTM(Cu+Zn) enriqueceram vias metabólicas associadas a processos imunes como apresentação de antígenos (BoLA-DRB3), resposta imune e de defesa (STAT3) e resposta de fase aguda (AHSG, SAA4, F2 e SAA2), demonstrando o potencial hepatoprotetor com a adição de VitB+HTM(Cu+Zn), o que pode explicar a redução no percentual de animais com infiltrado inflamatório mononuclear de nível moderado no fígado.

O gene STAT3 inibe a proliferação de células T, as mantendo em estado de quiescência, aumentando o tempo de sobrevivência delas (Cabrera-Ortega et al., 2017). O fator de transcrição 3 é estimulado pelas células Th17, que recrutam neutrófilos e macrófagos em tecidos infectados, especialmente em superfícies de mucosas (Cabrera-Ortega et al., 2017). A maior expressão desses genes nos tratamentos com VitB+HTM(Cu+Zn) indica maior capacidade de respostas anti-inflamatória nesses animais.

Outro gene de importância para resposta imune, e que foi altamente expresso nos animais que receberam VitB+HTM(Cu+Zn) foi o BoLA-DRB3. O BoLA-DRB3 está associado a indução e regulação de resposta imune em bovinos, fornecendo antígenos “não próprios” às células T (Yue et al., 2020). A maior expressão desse gene indica maior resistência do animal a processos inflamatórios como, por exemplo, a mastite (Pokorska et al., 2018) e estresse térmico (Yue et al., 2020; Kim et al., 2022)

em vacas leiteiras, o tornando um forte candidato como marcador de resistência à processos inflamatórios.

Ainda contribuindo para a proteção do fígado nos animais que receberam VitB+HTM(Cu+Zn), foram identificados genes atuantes contra ROS como o PARK7 (Cheng et al., 2018), o IFI6 (Liu et al., 2022) e o GADD45A, que além de atuar na remoção das ROS, também regula positivamente enzimas antioxidantes (Hong et al., 2016). Além desses genes, o gene exclusivamente expresso nessa condição, ZMAT3, também auxilia na proteção hepática, atuando contra proliferação de células cancerígenas (Chaturvedi et al., 2015).

Genes relacionados a resposta de fase aguda, como SAA2 e SAA4, encontrados nos animais que receberam VitB+HTM(Cu+Zn) também atuam contra inflamação, sendo o gene SAA4 considerado pouco responsivo a condições inflamatórias (Otsuka et al., 2020). Contudo, assim como no presente estudo, Otsuka et al. (2020), ao avaliarem novilhas Holandes-Friesian submetidas a desafio com endotoxinas, que levaram os animais a condição inflamatória crônica, também observaram aumento da expressão dos genes SAA2 e SAA4. As proteínas de fase aguda amiloide A sérico (SAA) são produzidas no fígado e atuam na resposta imunológica, inflamatória e vias de proteção (Ceciliani et al., 2012).

O fornecimento de VitB+HTM(Cu+Zn), além de estimular resposta imune e anti-inflamatória, também estimulou a expressão de via metabólicas associada ao metabolismo energético hepático, uma vez que houve enriquecimento de vias e genes associados a vias da fosforilação oxidativa (UQCRB, ATP5MF, UQCR11, ATP6AP1), ciclo do ácido cítrico (PC), metabolismo de carbono (PKLR), processos de oxidação-redução (G6PC), geração de precursores metabólicos e energia (G6PC e GPD1) e, complexos da cadeia respiratória (NDUFA13, NDUFB10, NDUFS5, NDUFB7, NDUFB3 e NDUFS3).

Dentre esses genes, o GPD1 participa da glicólise, convertendo di-hidroxiacetona-fosfato em gliceraldeído-3-fosfato (Nelson e Cox, 2018); a PKLR converte o fosfoenolpiruvato em piruvato (Liu et al., 2019), e a G6PC, que converte a glicose-6-fosfato em glicose (Grasmann et al., 2019).

Na etapa do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), observamos a expressão de 3 genes que foram: DLST, que codifica uma proteína associada ao complexo α -

cetoglutarato-desidrogenase; o IDH2, que codifica a enzima isocitrato-desidrogenase; e o FH, que codifica a enzima fumarase (Raimundo et al., 2011), nos fígados dos animais que receberam VitB+HTM(Cu+Zn). Além disso, a piruvato carboxilase (PC) também auxilia no suprimento de substrato para o ciclo do TCA, sendo a enzima responsável pela carboxilação do piruvato a oxaloacetato, podendo ser utilizado no ciclo do TCA ou, quando necessário, para a produção de glicose na via gliconeogênica (Nelson e Cox, 2018).

O fornecimento de VitB+HTM(Cu+Zn), além de estimular a expressão de genes da via glicolítica e do ciclo do TCA, também foi associado com a maior expressão de genes relacionados à fosforilação oxidativa. Os genes NDFA13, NDUFS3, NDUFS5, NDUF7, NDUF10, e NDUF3 codificam proteínas do complexo I da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, enquanto a UQCRB a UQCR11 participam do complexo III, e ATP5MF e ATP6AP1 participam do complexo V (ATP sintase; Araujo et al., 2018; Ding et al., 2022; Vercellino e Sazanov, 2022).

Entretanto, durante o processo de produção de ATP pela cadeia transportadora de elétrons, as ROS O_2^- (superóxido) e H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) são geradas e, em excesso, podem causar problemas ao fígado (Kowaltowski et al., 2009; Puppel et al., 2014). Este, provavelmente, é um dos motivos para o enriquecimento de vias metabólicas relacionadas a proteção hepática e a maior expressão de genes atuantes contra ROS, como foi observado em nosso trabalho. Nesse contexto, a adição de VitB+HTM(Cu+Zn) promoveu maior produção de energia em resposta ao aumento da atividade das etapas de produção de energia, desde a glicólise até a fosforilação oxidativa.

A capacidade das vitaminas B em melhorar a eficiência energética em bovinos também foi observada em vacas leiteiras (Scadura et al., 2008; Graulet et al., 2006). Associado a esses resultados, Lopes et al. (2021), ao avaliarem o fornecimento de vitaminas do complexo B protegidas da degradação ruminal + hidróximinerais Cu e Zn para bovinos Nelore terminados em pasto, observaram maior expressão de proteínas relacionadas a cadeia de transporte de elétrons e outras vias de oxidação-redução no fígado de animais que receberam o produto, aumentando a produção ROS, que levaram a maior expressão de proteínas ligadas à resposta a danos oxidativos e maior expressão de proteínas de fase aguda, indicando maior capacidade citoprotetora nesses fígados.

Nesse contexto, indiferente do sistema de terminação (Pasto vs. Confinado), o fornecimento de VitB+HTM(Cu+Zn), apresentaram maior expressão de genes e vias metabólicas associadas ao metabolismo energético, resposta inflamatória e anti-inflamatória no fígado de bovinos.

Como estratégia para compreender a interação entre o nível de amido e a adição de VitB+HTM(Cu+Zn), foi avaliada a expressão de genes exclusivos em cada tratamento.

A resistência à insulina (RI) em ruminantes pode ser causada pelo consumo excessivo de energia e está associada a maior resposta inflamatória, reportada em vacas leiteiras (Leiva et al., 2014; Leiva et al., 2015) e em bovinos de corte confinados recebendo dieta com alta concentração de amido (38%; Sousa et al., 2022).

Apesar dos estudos limitados em relação a RI e inflamação aguda em bovinos de corte confinados, acreditamos que a expressão de genes relacionados a resistência insulínica, resistência endócrina, secreção de insulina e sinalização da via TNF no tratamento HS podem ter a RI como uma possível explicação. Relações entre RI e as vias citadas e genes relacionados também são observadas no fígado de ratos, onde animais obesos e com RI apresentam maior expressão de SOCS1 (Ueki et al., 2004), o enriquecimento de vias de sinalização de AMPK, sinalização insulínica, secreção de insulina (Liu et al., 2017) e maior expressão do gene MMP9 (Xie et al., 2018), que também foram observados no tratamento HS do presente estudo.

Diferente do tratamento HS, o tratamento HSVI apresentou genes exclusivamente expressos associados a resposta inflamatória e anti-inflamatória. Essa diferença indica que, apesar da alta concentração de amido em ambos os tratamentos, a adição de VitB+HTM(Cu+Zn) promoveu maior proteção hepática. O CCNA2, um dos genes encontrados na pele de humanos com psoríase, uma inflamação crônica, participa da via de sinalização do TNF, que é usualmente detectado na fase de resposta aguda de tecidos, e é ativado, primariamente, por células imunes como os macrófagos (Mogulevtseva et al., 2018). Logo, a expressão desse gene e a relação com a via TNF no tratamento HSVI podem ser explicados pela alta proporção de fígados com macrófagos no tratamento HSVI.

O gene CCNA2 também possui relação direta com o ciclo celular e, quando silenciado, aumenta as chances de senescência celular prematura (Xu et al., 2019).

Em tecidos como fígado, rins, pulmão e coração de ratos, esse gene é mais expresso em animais mais novos quando comparados com animais velhos, auxiliando na prevenção da senescência celular e de doenças relacionadas ao avanço da idade (Xu et al., 2019).

A relação com os macrófagos também acontece para a via de migração transendotelial de leucócitos (MMP9), identificada no tratamento HSVI. A maior expressão de MMP9 é observada antes do processo de adesão/transmigração dos leucócitos, e em leucócitos de fígados lesionados de ratos a expressão de MMP9 é significativamente maior quando comparada a fígados saudáveis (Hamada et al., 2008).

Esses resultados indicam que o grupo HSVI apresentou vantagens em relação a proteção hepática quando comparado ao grupo HS, mostrando a importância da do fornecimento de VitB+HTM(Cu+Zn) em dietas de alto amido, auxiliando na prevenção da RI, uma vez que as evidências de RI foram encontradas somente no grupo HS.

O gene ADCY2, exclusivamente expresso no tratamento LS, é comum às vias de secreção pancreática e glucagon e é importante para síntese e degradação do glicogênio (Li et al., 2014), enquanto a FBP2, comum às vias do glucagon e sinalização de AMPK, atua na degradação e síntese da glicose (Guo et al., 2019). O AMPK tem papel importante na regulação energética, sendo ativado quando a relação AMP:ATP está alta, como ocorre em vacas leiteiras em cetose, é ativado pelo glucagon levando ao aumento da oxidação lipídica e redução do acúmulo de gordura no fígado (Li et al., 2019).

Uma vez que o fornecimento de VitB+HTM(Cu+Zn) promoveu maior expressão de genes relacionados à produção energética, a expressão exclusiva desses dois genes no tratamento LS [sem VitB+HTM(Cu+Zn)] pode indicar menor produção de energia nesses animais, o que levou ao aumento da sinalização do glucagon.

Outra diferença encontrada quando comparados os tratamentos LSVI vs LS, os genes SAA4 e SULT1B1, positivamente regulados no tratamento LSVI, indicam maior proteção hepática. Enquanto o primeiro atua na resposta de fase aguda (Otsuka et al., 2020), o segundo codifica proteínas necessárias ao metabolismo de drogas (Sultana et al., 2018).

Diante desse contexto, os resultados do presente estudo aceitam nossa hipótese de que a adição de VitB+HTM(Cu+Zn) promove maior proteção hepática e eficiência do metabolismo energético, independentemente do nível de amido da dieta, contudo, apresenta resultados ainda mais expressivos quando combinado com dietas de alto amido.

Conclusão

O fornecimento de dietas de alto amido promove maior ganho de peso nos animais, contudo, aumenta a incidência de macrófagos de nível moderado no fígado. A adição de VitB+HTM(Cu+Zn) oferece benefícios na redução da incidência de inflamatórios mononucleares de nível moderado.

Dietas de baixo amido apresentam maior expressão de genes relacionados a proteção hepática e genes que enriquecem vias de metabolismo e degradação de ácidos graxos, enquanto dietas de alto amido apresentam maior expressão de genes ligados a processos imunes. O fornecimento de dieta de alto amido, sem VitB+HTM(Cu+Zn) também promove expressão de genes relacionados à resistência insulínica.

A adição de VitB+HTM(Cu+Zn) apresenta maior expressão de genes e vias metabólicas associadas ao metabolismo energético, resposta inflamatória e anti-inflamatória no fígado de bovinos.

Referências Bibliográficas

ABAKER JA, XU TL, JIN D, CHANG GJ, ZHANG K, SHEN XZ (2017) Lipopolysaccharide derived from the digestive tract provokes oxidative stress in the liver of dairy cows fed a high-grain diet. **Journal of Dairy Science** 100:666-678.

ANDERS S, PYL PT, HUBER W (2015) HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics** 31:1–5.

AOAC (15ª Ed.) (1990) **Official methods of analysis**. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.

AOAC (16ª Ed.) (1995) **Official methods of analysis**. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

AOAC (16^a Ed.) (1998) **Official methods of analysis**. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

AOAC (18^a Eds.) (2005) **Official methods of analysis**. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

ARAUJO LF, SIENA ADD, PLAÇA JR, BROTTTO DB, BARROS II, MUYS BR, BIAGI JR CAO, PERONNI KC, SOUSA JF, MOLETTA GA, WEST LC, WEST AP, LEOPOLDINO AM, ESPREAFICO EM, SILVA JR WA (2018) Mitochondrial transcription factor A (TFAM) shapes metabolic and invasion genes signatures in melanoma. **Scientific Reports** 8:1-14.

AVILA VD, CARVALHO VM, BONIN E, MOREIRA LS, MOTTIN C, RAMOS AVG, MENIQUETI AB, BALDOQUI DC, COMAR JF, PRADO IN (2022) Mix of natural extracts to improve the oxidative state and liver activity in bulls finished feedlot. **Livestock Science** 259:1-8.

AYEMELE AG, TILAHUN M, LINGLING S, ELSAADAWY SA, GUO Z, ZHAO G, XU J, BU D (2021) Oxidative stress in dairy cows: insights into the mechanistic mode of actions and mitigating strategies. **Antioxidants** 10:1-21.

BENJAMINI Y, HOCHBERG Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of Royal Statistical Society: Series B** 57:289–300.

BERTON MP, FONSECA LFS, GIMENEZ DFJ, UTEMBERGUE BL, CESAR ASM, COUTINHO LL, DE LEMOS MVA, ABOUJAOUDE C, PEREIRA ASC, SILVA RMO, STAFUZZA NB, FEITOSA FLB, CHIAIA HLJ, OLIVIERI BF, PERIPOLLI E, TONUSSI RL, GORDO DM, ESPIGOLAN R, FERRINHO AM, MUELLER LF, ALBUQUERQUE LG, OLIVEIRA HN, DUCKETT S, BALDI F (2016) Gene expression profile of intramuscular muscle in Nellore cattle with extreme values of fatty acid. **BMC Genomics** 17:1-16.

BOVERIS A, OSHINO N, CHANCE B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochemical Journal** 128:617-630.

BUSATO S, FORD HR, ABDELATTY AM, ESTILL CT, BIONAZ M (2022) Peroxisome proliferator-activated receptor activation in precision-cut bovine liver slices reveals novel putative PPAR targets in periparturient dairy cows. **Frontiers in Veterinary Science** 9:1-19.

CABRERA-ORTEGA AA, FEINBERG D, LIANG Y, ROSSA JUNIOR C, GRAVES DT (2017) The role of forkhead box 1 (FOXO1) in the immune system: dendritic cells, T cells, B cells, and hematopoietic stem cells. **Critical Reviews in Immunology** 37:1-13.

CECILIANI F, CERON JJ, ECKERSALL PD, SAUERWEIN H (2012) Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics** 75:4207-4231.

CHATURVEDI P, NEELAMRAJU Y, ARIF W, KALSOTRA A, JANGA SC (2015) Uncovering RNA binding proteins associated with age and gender during liver maturation. **Scientific Reports** 5:1-10.

CHENG Y, MARION TN, CAO X, WANG W, CAO Y (2018) Park 7: A novel therapeutic target for macrophages in sepsis-induced immunosuppression. **Frontier in Immunology** 9:1-8.

CHOW JC, JESSE BW (1992) Interactions between gluconeogenesis and fatty acid oxidation in isolated sheep hepatocytes. **Journal of Dairy Science** 75:2142-2148.

DESMOTS F, RISSEL M, PIGEON C, LOYER P, LORÉAL O, GUILLOUZO A (2002) Differential effects of iron overload on GST isoform expression in mouse liver and kidney and correlation between GSTA4 induction and overproduction of free radicals. **Free Radical Biology and Medicine** 32:93-101.

DING Z, WEI Q, LIU C, ZHANG H, HUANG F (2022) The quality changes and proteomic analysis of cattle muscle postmortem during rigor mortis. **Foods** 11:1-16

FONSECA LD, ELER JP, PEREIRA MA, ROSA AF, ALEXANDRE PA, MONCAU CT, SALVATO F, ROSA-FERNANDES L, PALMISANO G, FERRAZ JBS, FUKUMASU H (2019) Liver proteomics unreveal metabolic pathways related to Feed Efficiency in beef cattle. **Scientific Reports** 9:1-11.

FU J, WU B, ZHONG S, DENG W, LIN F (2020) miR-29a-3p suppresses hepatic fibrosis pathogenesis by modulating hepatic stellate cell proliferation via targeting PIK3R3 gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 529:922-929.

GOFF SA, VAUGHN M, MCKAY S, LYONS E, STAPLETON AE, GESSLER D, MATASCI N, WANS L, HANLON M, LENARDS A, MUIR A, MERCHANT N, LOWRY S, MOCK S, HELMKE M, KUBACH A, NARRO M, HOPKINS N, MICKLOS D, HILGERT U, GONZALES M, JORDAN C, SKIDMORE E, DOOLEY R, CAZES J, MCLAY R, LU Z, PASTERNAK S, KOESTERKE L, PIEL WH, GRENE R, NOUTSOS C, GENDLER K, FENG X, TANG C, LENT M, KIM S, KVILEKVAL K, MANJUNATH BS, TANNEN V, STAMATAKIS A, SANDERSON M, WELCH SM, CRANSTON KA, SOLTIS P, SOLTIS D, O'MEARA B, ANE C, BRUTNELL T, KLEBENSTEIN DJ, WHITE JW, LEEBENS-MACK J, DONOGHUE MJ, SPALDING EP, VISION TJ, MYERS CR, LOWENTHAL D, ENQUIST BJ, BOYLE B, AKOGLU A, ANDREWS G, RAM S, WARE D, STEIN L, STANZIONE D (2011) **The iPlant collaborative: Cyberinfrastructure for plant biology**, 2011. *Frontiers in Plant Science* 2:1-16.

GOUVÊA VN, BATISTEL F, SOUZA J, CHAGAS LJ, SITTA C, CAMPANILI PRB, GALVANI DB, PIRES AV, OWENS FN, SANTOS FAP (2016) Flint corn grain processing and citrus pulp level in finishing diets for feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 94:665-677.

GRAULET B, MATTE JJ, DESROCHERS A, DOEPEL L, PALIN MF, GIRARD CL (2007) Effects of dietary supplements of folic acid and vitamins B12 on metabolism of dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* 90:3442-3455.

GUO X, ZHANG W, LI M, GAO P, HEI W, HE Z, WU Y, LIU J, CAI C, LI B, CAO G (2019) Transcriptome profile of skeletal muscle at different developmental stages in Large White and Macheu pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 99:867-880.

GUO Y, XU X, ZOU Y, YANG Z, LI S, CAO Z (2013) Changes in feed intake, nutrient digestion, plasma metabolites, and oxidative stress parameters in dairy cows with subacute ruminal acidosis and its regulation with pelleted beet pulp. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4:1-10.

HAMADA T, FONDEVILA C, BUSUTTIL RW, COITO AJ (2008) Metalloproteinase-9 deficiency protects Against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 47:186-198.

HARDCASTLE TJ, KELLY KA (2010) BaySeq: Empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. *BMC Bioinformatics* 11:1-14.

HONG L, SUN QF, XU TY, WE YH, ZHANG H, FU RQ, CAI FG, ZHOU QQ, ZHOU K, DU QW, ZHANG D, XU S, DING JG (2016) New role and molecular mechanism of Gadd45a in hepatic fibrosis. *World Journal of Gastroenterology* 22:2779-2788.

HUANG DW, SHERMAN BT, TAN Q, KIR J, LIU D, BRYANT D, GUO Y, STEPHENS R, BASELER MW, LANE HC, LEMPICKI RA (2007) DAVID Bioinformatics Resources: Expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. **Nucleic Acids Research** 35:169-175.

KIM SH, RAMOS SC, VALENCIA RA, CHO YI, LEE SS (2022) Heat stress: effect on rumen microbes and host physiology, and strategies to alleviate the negative impacts on lactating dairy cows. **Frontiers in Microbiology** 13:1-23.

KOPEC AK, JOSHI N, CLINE-FEDEWA H, WOJCICKI AV, RAY JL, SULLIVAN BP, FROEHLICH JE, JOHNSON BF, FLICK MJ, LUYENDYK JP (2017) Fibrin(ogen) drives repair after acetaminophen-induced liver injury via leukocyte $\alpha\beta 2$ integrin-dependent upregulation of Mmp12. **Journal of Hepatology** 66:787-797.

KOWALTOWSKI AJ, SOUZA-PINTO NC, CASTILHO RF, VERCESI AE (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, 49:333-343.

LI T, JIN M, FEI X, YUAN Z, WANG Y, QUAN K, WANG T, YANG J, HE M, WEI C (2022) Transcriptome comparison reveals the difference in liver fat metabolism between different sheep breeds. **Animals** 12:1-15.

LI Y, DING H, DONG J, RAHMAN SU, FENG S, WANG X, WU J, WANG Z, LIU G, LI X, LI X. Glucagon attenuates lipid accumulation in cow hepatocytes through AMPK signaling pathway activation. **Journal of Cellular Physiology** 234:6054-6066.

LI YX, JIN HG, YAN CG, REN CY, JIANG CJ, JIN CD, SEO KS, JIN X (2014) Molecular cloning, sequence identification, and gene expression analysis of bovine ADCY2 gene. **Molecular Biology Reports** 41:3561-3568.

LIU F, LIN Y, LI Z, MA X, HAN Q, LIU Y, ZHOU Q, LIU J, LI R, LI J, GAO L (2014) Glutathione S-transferase A1 (GSTA1) release, an early indicator of acute hepatic injury in mice. **Food and Chemical Toxicology** 71:225-230.

LIU J, CHEN H, QIAO G, ZHANG JT, ZHANG S, ZHU C, CHEN Y, TAN J, LI W, WANG S, TIAN H, CHEN Z, MA D, TIA J, WU YL (2023) PLEK2 and IFI6, representing mesenchymal and immune-suppressive microenvironment, predicts resistance to neoadjuvant immunotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy** 72:881-893.

LIU JS, LOGVINENKO T (2008) Bayesian methods in biological sequence analysis, In: BALDING, D. J.; BISHOP, M.; CANNINGS, C. (Eds.). **Handbook of Statistical Genetics: Third Edition**. Wiley, Chichester, p.66–93.

LIU XL, MING YN, ZHANG JY, CHEN XY, ZENG MD, MAO YM (2017) Gene-metabolite network analysis in different nonalcoholic fatty liver disease phenotypes. **Experimental & Molecular Medicine** 49:1-9.

LIU Z, ZHANG C, LEE S, KIM W, KLEVSTIG M, HARZANDI AM, SIKANIC N, ARIF M, STAHLMAN M, NIELSEN J, UHLEN M, BOREN J, MARDINOGLU A (2019) Pyruvate kinase L/R is a regulator of lipid metabolism and mitochondrial function. **Metabolic Engineering** 52:263-272.

LOPES MM, BRITO TR, LAGE JF, COSTA TC, FONTES MMS, SERÃO NVL, MENDES TAO, REIS RA, VERONEZE R, SILVA FF, DUARTE MS (2021) Proteomic analysis of liver from finishing beef cattle supplemented with rumen-protected B-vitamin blend and hydroxy trace minerals. **Animals** 11:1934-1945.

LUNA LG (1968) (3^a Ed.) **Manual of histology staining methods of the armed force** institute of pathology. McGraw-Hill book company, New York. 258p.

LUNDY-WOOLFOLK EL, GENTHER-SCHROEDER ON, BRANINE M, HANSEN SL (2023) Effects of supplemental zinc on growth, carcass characteristics and liver abscess formation in steers with experimentally induced ruminal acidosis challenge. **Translational Animal Science** 7:1-10.

MA N, ABAKER JA, WEI G, SHEN X, CHANG G (2022) A high-concentrate diet induces inflammatory response and oxidative stress and depresses milk fat synthesis in the mammary gland of dairy cows. **Journal of Dairy Science** 105:5493-5505.

MAFFEI M, BARONE I, SCABIA G, SANTINI F (2016) The multifaceted haptoglobin in the context of adipose tissue and metabolism. **Endocrine Reviews** 37:403-416.

MOGULEVTSEVA JA, MEZENTSEV AV, BRUSKIN SA (2018) Impact of metalloproteinase 1 deficiency induced by specific small hairpin RNA on the physiological effects of tumor necrosis factor. **Russian Journal of Genetics** 54:960-966.

NASEM (8^a Ed.) (2016) **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. National Academies Press, Washington, DC, USA. 494p.

OTSUKA M, NISHI Y, TSUKANO K, TSUCHIYA M, LAKRITZ J, SUZUKI K (2020) Sequential changes in hepatic mRNA abundance and serum concentration of serum amyloid A in cattle with acute inflammation caused by endotoxin. **The Journal of Veterinary Medical Science** 82:1006-1011.

POKORSKA J, KULAJ D, DUSZA M, OCHREM A, MAKULSKA J (2018) The influence of BoLA-DRB3 alleles on incidence of clinical mastitis, cystic ovary disease and milk traits in Holstein Friesian cattle. **Molecular Biology Reports** 45:917-923.

PUPPEL K, KAPUSTA A, KUCZYNSKA B (2014) The etiology of oxidative stress in the various species of animals, a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 95:2179-2184.

QI X, NG K, T, LIAN Q, LI QX, GENG W, LING CC, YEOUNG WH, MA YY, LIU XB, LIU H, LIU J, YANG XX, LO CM, MAN K (2018) Glutathione peroxidase 3 delivered by hiPSC-MSCs ameliorate hepatic IR injury via inhibition of hepatic senescence. **Theranostics** 8:212-222.

RAIMUNDO N, BAYSAL BE, SHADEL GS (2011) Revisiting the TCA cycle: signaling tumor formation. **Trends in molecular and Medicine** 17:641-649.

RANEA-ROBLES P, VIOLANTE S, ARGMANN C, DODATKO T, BHATTACHARYA D, CHEN H, YU C, FRIEDMAN SL, PUCHOWICA M, HOUTEN SM (2021) Murine deficiency of peroxisomal L-bifunctional protein (EHHADH) causes medium-chain-3-hydroxydicarboxylic aciduria and perturbs hepatic cholesterol homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences** 78:5631-5646.

ROBINSON MD, OSHLACK AA (2010) Scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology** 11:1-9.

ROBINSON MD, SMYTH GK (2008) Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics** 9:321–332.

SANZ-FERNANDEZ MV, DANIEL J, SEYMOUR DJ, KVIDERA SK, BESTER Z, DOELMAN J, MANTÍN-TERESO J (2020) Targeting the hindgut to improve health and performance in cattle. **Animals** 10:1-13.

SCADURA FC, ROBINSON PH, EVANS E, LORDELO M (2008) Effects of ruminally protected B-vitamin supplemented on milk yield and composition of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology** 144:111-124.

SGORLON S, STRADAIOLI G, GABAI G, STEFANON B (2008) Variation of starch and fat in the diet affects metabolic status and oxidative stress in ewes. **Small Ruminant Research** 74:123-129.

SHAO F, WANG X, YU J, SHEN K, QI C, GU Z (2019) Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits the expression of the fatty acid oxidation-regulatory genes CROT and HADHB in chicken liver. **British Poultry Science** 60:115-124.

SHERTZER HG, CLAY CD, GENTER MB, CHNEIDER SN, NBERT DW, DALTON TP (2004) CYP1A2 protects against reactive oxygen production in mouse liver microsomes. **Free Radical and Medicine** 36:605-617.

SOUSA OA, CAPPELLOZZA BI, FONSECA VG, COOKE RFC (2022) Insulin resistance increases as days on feed advance in feedlot *Bos indicus* beef cattle offered a high-concentrate finishing diet. **Journal of Animal Science** 100:1-4.

SULTANA H, WATANABE K, RANA MM, TAKASHIMA R, OHASHI A, KOMAI M, SHIRAKAWA H (2018) Effects of vitamin K2 on the expression of genes involved in bile acid synthesis and glucose homeostasis in mice with human PXR. **Nutrients** 10:1-14.

TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, PERTEA G, KIM D, KELLEY DR, PIMENTEL H, SALZBERG SL, RINN JL, PACTHER L (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature Protocols** 7:562–578.

TRAPNELL C, WILLIAMS BA, PERTEA G, MORTAZAVI A, KWAN G, VAN BAREN MJ, SALZBERG SL, WOLD BJ, PATCHER L (2010) Transcripts assembly and qualification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoforms switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology** 28:511-515.

UEKI K, KONDO T, KAHN CR (2004) Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. **Molecular and Cellular Biology** 24:5434-5446.

VAN SOEST PJ, WINE RH (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 50:50–55.

WALTON JP, WAGHORN GC, PLAIZIER JC, BIRTLES M, MCBRIDE BW (2001) Influence of condensed tannins on gut morphology in sheep fed *Lotus pedunculatus*. **Canadian Journal of Animal Science** 81:605-607.

WANG Q, BU Q, LIU M, ZHANG R, GU J, LI L, ZHOU J, LIANG Y, SU W, LIU Z, WANG M, LIAN Z, LU L, ZHOU H (2022) XBP1-mediated activation of the STING signaling pathway in macrophages contributes to liver fibrosis progression. **JHEP Reports** 4:1-17.

XIE Y, SONG T, HUO M, ZHANG Y, ZHANG YY, MA ZH, WANG N, ZHANG JP, CHU L (2018) Fasudil alleviates hepatic fibrosis in type 1 diabetic rats: involvement of the inflammation and RhoA/ROCK pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences** 22:5665-5677.

XU C, WANG Z (2006) Effect of propionate, pyruvate and B-hydroxybutyric acid on pyruvate carboxylase mRNA expression of in vitro culture bovine hepatocytes. **Animal Science Journal** 77:440-446.

XU S, WU W, HUANG H, HUANG R, XIE L, SU A, LIU S, ZHENG R, YUAN Y, ZHENG H, SUN X, XIONG X, LIU X (2019) The p53/miRNAs/Ccna2 pathway serves as a novel regulator of cellular senescence: Complement of the canonical p53/p21 pathway. **Aging Cell** 18:1-14.

YE P, LIU J, XU W, LIU D, DING X, LE S, ZHANG H, CHEN S, CHEN M, XIA J (2019) Dusp-specificity phosphatase 26 protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice through transforming growth factor beta-activated kinase 1 suppression. **Hepatology** 69:1946-1964.

YUE S, WANG Z, WANG Z, PENG Q, XUE B (2020) Transcriptome functional analysis of mammary gland of cows in heat stress and thermoneutral condition. **Animals** 10:1-18.

ZHANG H, XUE Y, XIE W, WANG Y, MA N, CHANG G, SHEN X (2022) Subacute ruminal acidosis downregulates FOXA2, changes oxidative stress status, and induce autophagy in the liver of dairy cows fed a high concentrate diet. **Journal of Dairy Science** 106:2007-2018.

ZHANG Y, WONG HS (2021) Are mitochondria the main contributor of reactive oxygen in cells? **Journal of Experimental Biology** 224:1-9.

ZHAO L, IWASAKI Y, NISHIYAMA M, TAGUCHI T, TSUGITA M, OKAZAKI M, NAKAYAMA S, KAMBAYASHI M, FUJIMOTO S, HASHIMOTO K, MURAO K, TERADA Y (2012) Liver X receptor α is involved in the transcriptional regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. **Diabetes** 61:1062-1071.

APÊNDICES

Apêndice A. Genes exclusivamente expressos nos tratamentos de alto amido – GO enrichment

Descrição	Gene Ratio	Gene ID	P ajustado
epithelial cell differentiation involved in kidney development	1/1	MMP9	0,002
regulation of kidney development	1/1	MMP9	0,002
negative regulation of ion transmembrane transporter activity	1/1	MMP9	0,002
positive regulation of smooth muscle cell proliferation	1/1	MMP9	0,002
negative regulation of cation transmembrane transport	1/1	MMP9	0,002
formation of primary germ layer	1/1	MMP9	0,002
negative regulation of ion transmembrane transport	1/1	MMP9	0,002
cell differentiation involved in kidney development	1/1	MMP9	0,002
negative regulation of transporter activity	1/1	MMP9	0,003
regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway	1/1	MMP9	0,003
regulation of release of cytochrome c from mitochondria	1/1	MMP9	0,003
regulation of ERBB signaling pathway	1/1	MMP9	0,003
epidermal growth factor receptor signaling pathway	1/1	MMP9	0,003
positive regulation of DNA binding	1/1	MMP9	0,003
negative regulation of transmembrane transport	1/1	MMP9	0,003
negative regulation of ion transport	1/1	MMP9	0,004
metalloendopeptidase activity	1/1	MMP9	0,004
release of cytochrome c from mitochondria	1/1	MMP9	0,004
ERBB signaling pathway	1/1	MMP9	0,004
positive regulation of mitochondrion organization	1/1	MMP9	0,004
negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway	1/1	MMP9	0,004
regulation of cation channel activity	1/1	MMP9	0,004
smooth muscle cell proliferation	1/1	MMP9	0,004
regulation of smooth muscle cell proliferation	1/1	MMP9	0,004
regulation of epithelial cell differentiation	1/1	MMP9	0,004
regulation of DNA binding	1/1	MMP9	0,005
positive regulation of protein binding	1/1	MMP9	0,005
negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	1/1	MMP9	0,005

female pregnancy	1/1	MMP9	0,005
negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity	1/1	MMP9	0,006
Gastrulation	1/1	MMP9	0,006
muscle cell proliferation	1/1	MMP9	0,006
multi-multicellular organism process	1/1	MMP9	0,006
cellular response to reactive oxygen species	1/1	MMP9	0,007
positive regulation of epithelial cell migration	1/1	MMP9	0,007
regulation of ion transmembrane transporter activity	1/1	MMP9	0,007
apoptotic mitochondrial changes	1/1	MMP9	0,007
regulation of mitochondrion organization	1/1	MMP9	0,007
metallopeptidase activity	1/1	MMP9	0,008
regulation of transmembrane transporter activity	1/1	MMP9	0,008
cellular response to metal ion	1/1	MMP9	0,008
positive regulation of apoptotic signaling pathway	1/1	MMP9	0,008
regulation of transporter activity	1/1	MMP9	0,008
regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway	1/1	MMP9	0,009
response to reactive oxygen species	1/1	MMP9	0,009
cellular response to inorganic substance	1/1	MMP9	0,009
positive regulation of binding	1/1	MMP9	0,010
regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	1/1	MMP9	0,010
kidney development	1/1	MMP9	0,010
regulation of protein binding	1/1	MMP9	0,010
negative regulation of apoptotic signaling pathway	1/1	MMP9	0,010
renal system development	1/1	MMP9	0,011
regulation of cysteine-type endopeptidase activity	1/1	MMP9	0,011
negative regulation of endopeptidase activity	1/1	MMP9	0,012
urogenital system development	1/1	MMP9	0,012
response to metal ion	1/1	MMP9	0,012
cellular response to oxidative stress	1/1	MMP9	0,012
regulation of epithelial cell migration	1/1	MMP9	0,012

extracellular matrix	1/1	MMP9	0,012
negative regulation of peptidase activity	1/1	MMP9	0,013
regulation of cation transmembrane transport	1/1	MMP9	0,013
intrinsic apoptotic signaling pathway	1/1	MMP9	0,014
response to peptide	1/1	MMP9	0,014
cellular response to chemical stress	1/1	MMP9	0,014
epithelial cell migration	1/1	MMP9	0,015
epithelium migration	1/1	MMP9	0,015
tissue migration	1/1	MMP9	0,016
regulation of binding	1/1	MMP9	0,016
skeletal system development	1/1	MMP9	0,017
regulation of apoptotic signaling pathway	1/1	MMP9	0,018
ameboidal-type cell migration	1/1	MMP9	0,018
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	1/1	MMP9	0,018
regulation of ion transmembrane transport	1/1	MMP9	0,018
negative regulation of proteolysis	1/1	MMP9	0,018
embryonic morphogenesis	1/1	MMP9	0,018
regulation of endopeptidase activity	1/1	MMP9	0,018
negative regulation of transport	1/1	MMP9	0,019
response to inorganic substance	1/1	MMP9	0,019
response to oxidative stress	1/1	MMP9	0,020
positive regulation of cell migration	1/1	MMP9	0,020
negative regulation of hydrolase activity	1/1	MMP9	0,020
regulation of peptidase activity	1/1	MMP9	0,020
regulation of transmembrane transport	1/1	MMP9	0,021
positive regulation of cell motility	1/1	MMP9	0,021
positive regulation of cellular component movement	1/1	MMP9	0,022
negative regulation of intracellular signal transduction	1/1	MMP9	0,022
positive regulation of locomotion	1/1	MMP9	0,022
regulation of ion transport	1/1	MMP9	0,024

negative regulation of cell differentiation	1/1	MMP9	0,024
epithelial cell differentiation	1/1	MMP9	0,024
positive regulation of apoptotic process	1/1	MMP9	0,025
positive regulation of programmed cell death	1/1	MMP9	0,025
endopeptidase activity	1/1	MMP9	0,025
positive regulation of organelle organization	1/1	MMP9	0,026
positive regulation of cell death	1/1	MMP9	0,026
apoptotic signaling pathway	1/1	MMP9	0,027
mitochondrion organization	1/1	MMP9	0,031
enzyme linked receptor protein signaling pathway	1/1	MMP9	0,031
regulation of proteolysis	1/1	MMP9	0,032
positive regulation of cell population proliferation	1/1	MMP9	0,033
negative regulation of developmental process	1/1	MMP9	0,034
regulation of cell migration	1/1	MMP9	0,035
negative regulation of catalytic activity	1/1	MMP9	0,035
response to organonitrogen compound	1/1	MMP9	0,037
regulation of cell motility	1/1	MMP9	0,037
peptidase activity, acting on L-amino acid peptides	1/1	MMP9	0,037
embryo development	1/1	MMP9	0,037
negative regulation of apoptotic process	1/1	MMP9	0,037
positive regulation of protein phosphorylation	1/1	MMP9	0,038
peptidase activity	1/1	MMP9	0,038
negative regulation of programmed cell death	1/1	MMP9	0,039
regulation of cellular component movement	1/1	MMP9	0,039
regulation of locomotion	1/1	MMP9	0,039
positive regulation of phosphorylation	1/1	MMP9	0,039
cation transmembrane transport	1/1	MMP9	0,039
negative regulation of cell death	1/1	MMP9	0,041
epithelium development	1/1	MMP9	0,041
response to nitrogen compound	1/1	MMP9	0,042

positive regulation of phosphorus metabolic process	1/1	MMP9	0,043
positive regulation of phosphate metabolic process	1/1	MMP9	0,043
positive regulation of cellular component organization	1/1	MMP9	0,044
anatomical structure formation involved in morphogenesis	1/1	MMP9	0,044
positive regulation of protein modification process	1/1	MMP9	0,046
multi-organism reproductive process	1/1	MMP9	0,046
cellular response to oxygen-containing compound	1/1	MMP9	0,046
multi-organism process	1/1	MMP9	0,047
negative regulation of molecular function	1/1	MMP9	0,047
negative regulation of multicellular organismal process	1/1	MMP9	0,048
negative regulation of signal transduction	1/1	MMP9	0,048
negative regulation of cellular protein metabolic process	1/1	MMP9	0,050
regulation of organelle organization	1/1	MMP9	0,050

Apêndice B. Genes exclusivamente expressos nos tratamentos de baixo amido - GO enrichment

Descrição	Gene Ratio	Gene ID	P ajustado
Dephosphorylation	2/2	FBP2/DUSP26	>0,001
protein tyrosine phosphatase activity	1/2	DUSP26	0,007
peptidyl-tyrosine dephosphorylation	1/2	DUSP26	0,008
Gluconeogenesis	1/2	FBP2	0,009
hexose biosynthetic process	1/2	FBP2	0,009
Z disc	1/2	FBP2	0,009
I band	1/2	FBP2	0,009
monosaccharide biosynthetic process	1/2	FBP2	0,010
phosphoprotein phosphatase activity	1/2	DUSP26	0,015
Sarcomere	1/2	FBP2	0,016
Myofibril	1/2	FBP2	0,017
contractile fiber	1/2	FBP2	0,018
carbohydrate biosynthetic process	1/2	FBP2	0,019
glucose metabolic process	1/2	FBP2	0,022
phosphatase activity	1/2	DUSP26	0,024
hexose metabolic process	1/2	FBP2	0,026
monosaccharide metabolic process	1/2	FBP2	0,028
protein dephosphorylation	1/2	DUSP26	0,032
phosphoric ester hydrolase activity	1/2	DUSP26	0,037

Apêndice C. Genes exclusivamente expressos nos tratamentos com VitB+HTM(Cu+Zn) – GO enrichment

Descrição	Gene Ratio	Gene ID	P ajustado
regulation of growth	1/1	ZMAT3	0,026
Growth	1/1	ZMAT3	0,037
cellular response to DNA damage stimulus	1/1	ZMAT3	0,041
Nucleolus	1/1	ZMAT3	0,041

Apêndice D. Genes exclusivamente expressos nos tratamentos sem suplemento – GO enrichment

Descrição	Gene Ratio	Gene ID	P ajustado
monocarboxylic acid metabolic process	2/2	ELOVL7/CRABP1	0,001
cellular lipid metabolic process	2/2	ELOVL7/CRABP1	0,002
carboxylic acid metabolic process	2/2	ELOVL7/CRABP1	0,003
oxoacid metabolic process	2/2	ELOVL7/CRABP1	0,003
organic acid metabolic process	2/2	ELOVL7/CRABP1	0,003
lipid metabolic process	2/2	ELOVL7/CRABP1	0,005
nucleoside bisphosphate biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,004
ribonucleoside bisphosphate biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,004
purine nucleoside bisphosphate biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,004
acyl-CoA metabolic process	1/2	ELOVL7	0,007
thioester metabolic process	1/2	ELOVL7	0,007
retinoid metabolic process	1/2	CRABP1	0,008
unsaturated fatty acid biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,008
diterpenoid metabolic process	1/2	CRABP1	0,008
nucleoside bisphosphate metabolic process	1/2	ELOVL7	0,008
ribonucleoside bisphosphate metabolic process	1/2	ELOVL7	0,008
purine nucleoside bisphosphate metabolic process	1/2	ELOVL7	0,008
fatty acid derivative biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,008
monocarboxylic acid catabolic process	1/2	CRABP1	0,009
vitamin metabolic process	1/2	CRABP1	0,009
terpenoid metabolic process	1/2	CRABP1	0,010
unsaturated fatty acid metabolic process	1/2	ELOVL7	0,012
fatty acid derivative metabolic process	1/2	ELOVL7	0,012
isoprenoid metabolic process	1/2	CRABP1	0,013
cellular hormone metabolic process	1/2	CRABP1	0,013
sulfur compound biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,016
coenzyme biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,017
cellular lipid catabolic process	1/2	CRABP1	0,019

purine ribonucleotide biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,020
purine nucleotide biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,021
fatty acid biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,022
ribonucleotide biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,022
hormone metabolic process	1/2	CRABP1	0,022
ribose phosphate biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,022
purine-containing compound biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,023
monocarboxylic acid biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,027
coenzyme metabolic process	1/2	ELOVL7	0,027
organic acid catabolic process	1/2	CRABP1	0,029
carboxylic acid catabolic process	1/2	CRABP1	0,029
cofactor biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,029
sulfur compound metabolic process	1/2	ELOVL7	0,030
nucleotide biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,031
nucleoside phosphate biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,033
lipid catabolic process	1/2	CRABP1	0,037
fatty acid metabolic process	1/2	ELOVL7	0,038
purine ribonucleotide metabolic process	1/2	ELOVL7	0,039
protein homooligomerization	1/2	CRABP1	0,040
ribonucleotide metabolic process	1/2	ELOVL7	0,041
carboxylic acid biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,041
purine nucleotide metabolic process	1/2	ELOVL7	0,041
regulation of hormone levels	1/2	CRABP1	0,041
organic acid biosynthetic process	1/2	ELOVL7	0,041
ribose phosphate metabolic process	1/2	ELOVL7	0,041
small molecule catabolic process	1/2	CRABP1	0,043
cofactor metabolic process	1/2	ELOVL7	0,045
purine-containing compound metabolic process	1/2	ELOVL7	0,047

Apêndice E. Enriquecimento de vias KEGG exclusivamente expressos no tratamento HS

Descrição	Gene Ratio	Gene ID	P ajustado
Progesterone-mediated oocyte maturation	3/19	PIK3R3/CCNA2/CCNB1	>0,001
Cellular senescence	3/19	PIK3R3/CCNA2/CCNB1	0,004
cAMP signaling pathway	3/19	PIK3R3/ADCYAP1R1/LOC521568	0,013
Neuroactive ligand-receptor interaction	3/19	ADCYAP1R1/ADRA2C/GRIK2	0,041
Folate biosynthesis	2/19	MGC127133/LOC538060	0,003
Prolactin signaling pathway	2/19	PIK3R3/SOCS1	0,013
Insulin secretion	2/19	ADCYAP1R1/KCNMB1	0,013
Arachidonic acid metabolismo	2/19	MGC127133/LOC538060	0,014
Endocrine resistance	2/19	PIK3R3/MMP9	0,016
Cholinergic synapse	2/19	PIK3R3/KCNJ4	0,023
Leukocyte transendothelial migration	2/19	PIK3R3/MMP9	0,024
Growth hormone synthesis, secretion and action	2/19	PIK3R3/SOCS1	0,025
AMPK signaling pathway	2/19	PIK3R3/CCNA2	0,027
TNF signaling pathway	2/19	PIK3R3/MMP9	0,027
Cell cycle	2/19	CCNA2/CCNB1	0,028
FoxO signaling pathway	2/19	PIK3R3/CCNB1	0,030
Relaxin signaling pathway	2/19	PIK3R3/MMP9	0,030
Osteoclast differentiation	2/19	PIK3R3/SOCS1	0,033
Insulin signaling pathway	2/19	PIK3R3/SOCS1	0,033
Estrogen signaling pathway	2/19	PIK3R3/MMP9	0,033
Natural killer cell mediated cytotoxicity	2/19	PIK3R3/LOC618565	0,042
cGMP-PKG signaling pathway	2/19	ADRA2C/KCNMB1	0,049

Apêndice F. Enriquecimento de vias KEGG exclusivamente expressos no tratamento LS

Descrição	Gene Ratio	Gene ID	P ajustado
Chemokine signaling pathway	3/17	ADCY2/CCL1/CCR8	0,005
Ovarian steroidogenesis	2/17	LOC538060/ADCY2	0,006
Progesterone-mediated oocyte maturation	2/17	CCNA2/ADCY2	0,012
Antigen processing and presentation	2/17	NKG2A/LOC618565	0,012
Pancreatic secretion	2/17	TRPC1/ADCY2	0,015
Glucagon signaling pathway	2/17	FBP2/ADCY2	0,015
Salivary secretion	2/17	WC1-10/ADCY2	0,015
Glutamatergic synapse	2/17	TRPC1/ADCY2	0,018
Cholinergic synapse	2/17	KCNJ4/ADCY2	0,019
AMPK signaling pathway	2/17	CCNA2/FBP2	0,022
Oxytocin signaling pathway	2/17	KCNJ4/ADCY2	0,033
Natural killer cell mediated cytotoxicity	2/17	NKG2A/LOC618565	0,034
cGMP-PKG signaling pathway	2/17	ADRA2C/ADCY2	0,040

Apêndice G. Enriquecimento de vias KEGG exclusivamente expressos no tratamento HSVI

Description	Gene Ratio	Gene ID	P ajustado
Progesterone-mediated oocyte maturation	3/20	PIK3R3/CCNA2/PGR	0,001
Leukocyte transendothelial migration	3/20	CLDN11/PIK3R3/MMP9	0,002
Estrogen signaling pathway	3/20	PIK3R3/PGR/MMP9	0,003
Cellular senescence	3/20	PIK3R3/CCNA2/IL1A	0,005
cGMP-PKG signaling pathway	3/20	OPRD1/ADRA2C/KCNMB1	0,006
Cytokine-cytokine receptor interaction	3/20	TNFSF8/IL1A/CCR8	0,036
GnRH secretion	2/20	TRPC1/PIK3R3	0,009
Endocrine resistance	2/20	PIK3R3/MMP9	0,018
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	2/20	PIK3R3/IL1A	0,021
Sphingolipid signaling pathway	2/20	OPRD1/PIK3R3	0,028
AMPK signaling pathway	2/20	PIK3R3/CCNA2	0,030
TNF signaling pathway	2/20	PIK3R3/MMP9	0,030
Relaxin signaling pathway	2/20	PIK3R3/MMP9	0,033
Osteoclast differentiation	2/20	PIK3R3/IL1A	0,037

Apêndice H. Enriquecimento de vias KEGG exclusivamente expressos no tratamento LSVI

Descrição	Gene Ratio	Gene ID	P ajustado
cAMP signaling pathway	2/11	CNGA2/LOC521568	0,033