

Universidade Estadual Paulista – UNESP
Campus de Jaboticabal/SP

**Aditivos e seu uso combinado em dietas com altos teores de concentrado
para bovinos Nelore confinados.**

Laís de Aquino Tomaz

Zootecnista

2024

**T
E
S
E**

/

**T
O
M
A
Z**

**L.
A.**

**2
0
2
4**

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Campus de Jaboticabal

**Aditivos e seu uso combinado em dietas com altos teores de
concentrado para bovinos Nelore confinados.**

Discente: Laís de Aquino Tomaz

Orientador: Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Zootecnia (Nutrição e Alimentação Animal).

2024

T655a Tomaz, Laís de Aquino
Aditivos e seu uso combinado em dietas com altos teores de concentrado para bovinos Nelore confinados. / Laís de Aquino Tomaz. -- Jaboticabal, 2023
94 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Otávio Rodrigues Machado Neto

1. Bovinocultura de corte. 2. Confinamento. 3. Nelore. 4. Aditivos. 5. Monensina sódica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a). Essa ficha não pode ser modificada.

REGISTRO DE IMPACTO

O presente estudo identificou que o aditivo propionato de laidlomycina pode ser mais uma alternativa de uso em dietas altamente energéticas para bovinos confinados. Além disso, através do estudo de transcriptoma de papilas ruminais, a monensina sódica foi o aditivo mais eficiente em manter a saúde ruminal de bovinos Nelore. Tais achados podem contribuir para a tomada de decisão dos produtores no momento de definir qual o melhor aditivo para seu sistema de produção, visando melhor eficiência em seus resultados.

IMPACT STATEMEN

The present study identified the Laidlomycin Propionate additive may be one alternative for use in high-energy diets for feedlot cattle. Furthermore, through the study of ruminal papilla transcriptome, sodium monensin was the most efficient additive in maintaining the ruminal health of Nelore cattle. These findings may contribute to the decision-making of producers when defining the best additive for their production system, aiming at better efficiency in their results.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ADITIVOS E SEU USO COMBINADO EM DIETAS COM ALTOS TEORES DE CONCENTRADO PARA BOVINOS NELORE CONFINADOS

AUTORA: LAÍS DE AQUINO TOMAZ

ORIENTADOR: OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO

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: 30/10/2023 17:29:30 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Ass.Dr. WELDER ANGELO BALDASSINI (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente



WELDER ANGELO BALDASSINI
Data: 08/11/2023 08:24:52 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Pós-doutorando GERMÁN DARÍO RAMÍREZ ZAMUDIO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FZEA USP Pirassununga/SP

Documento assinado digitalmente



GERMÁN DARÍO RAMÍREZ ZAMUDIO
Data: 07/11/2023 12:12:56 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente



PRISCILLA DUTRA TEIXEIRA
Data: 26/09/2023 13:35:13 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. MARCOS ROBERTO CHIARATTI (Participação Virtual)
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)

Documento assinado digitalmente



MARCOS ROBERTO CHIARATTI
Data: 25/09/2023 08:19:03 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 21 de julho de 2023

Dados curriculares do autor

Laís de Aquino Tomaz– nascida no dia 03 de setembro de 1992 na cidade de Botucatu, interior de São Paulo. Iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Dracena, em agosto de 2011. Durante o curso de graduação foi bolsista CAPES do programa “Cursinho Alvo”, atuando como professora no curso pré-vestibular, bolsista MEC do Programa de Educação Tutorial (PET) e bolsista de iniciação científica pela PROPe, sob orientação do professor Dr. Danilo Millen. Concluiu a graduação em julho de 2016 após estágio obrigatório realizado na Universidade do Kansas (KSU) em Manhattan/KS, nos Estados Unidos. Em março de 2017 ingressou no curso de mestrado em Zootecnia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) na UNESP, campus de Botucatu, sob orientação do professor Dr. Mario de Beni Arrigoni, sendo bolsista CAPES (2017) e FAPESP (2018). A FAPESP lhe concedeu a bolsa BEPE para a realização do mestrado sanduíche na Universidade da Florida (UF) em Gainesville/FL sob orientação do professor Dr. Antônio Faciola. Concluiu o mestrado em abril de 2019 e em agosto do mesmo ano iniciou o doutorado em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias na UNESP, campus de Jaboticabal-SP, sob orientação do Professor Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto, sendo bolsista CNPq e realizando experimento voltado à nutrição de bovinos de corte em confinamento. Atualmente, é consultora técnica no Mato Grosso pela empresa PREMIX.

Dedico,

Aos meus pais, Angela Maria de Aquino Tomaz e João Cláudio Tomaz da Silva,

Meus maiores exemplos de caráter, de força, de coragem, de humildade, de dedicação, de cuidado,

de fé, de vida,

Meu suporte, minha base Sem eles, eu nada seria.

Minha gratidão é e sempre será eterna.

AGRADECIMENTOS

Á Deus e a Nossa Senhora Aparecida, que me delegaram uma das missões mais valiosas: VIVER, e estão me proporcionando saúde, coragem, fé e esperança para persistir meus sonhos e ideais.

Aos meus pais, Angela Maria de Aquino Tomaz e João Cláudio Tomaz da Silva. Meus maiores exemplos de seres humanos. Obrigada por cada lição de vida e por toda a dedicação, todo amor, preocupação, suporte, compreensão, paciência e pela presença, mesmo que na ausência. amo vocês incondicionalmente.

Aos meus avós: Joaquim, Dirce, Yolanda e Nelson, minhas irmãs: Camila e Aline, meus cunhados: Laerte e Sérgio, minha sobrinha: Nauá e todos os tios, tias, primos que sempre estiveram presentes, me incentivando, torcendo e rezando. Obrigada!!

Ao meu professor e orientador, Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto, que me cedeu a oportunidade de trabalhar consigo, e me confiabilizou este projeto. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e toda a colaboração para minha formação profissional e pessoal.

Aos demais professores que contribuíram para a condução do experimento: Prof. Mário Arrigoni e Prof. Welder Baldassini;

Aos professores Flávio Rezende e Gustavo Rezende pelas considerações na defesa deste projeto e prof. Marina Danes, prof. Welder, Dr. German Dario e Dr. Juliana Akamine pelas considerações no exame de qualificação.

Obrigada Prof. José Roberto Sartori, por disponibilizar o laboratório de histologia; Prof. Sérgio Luis Felisbino por preparar as lâminas histológicas; Prof. Marcos Roberto Chiaratti pelas análises de sequenciamento.

Obrigada a empresa Zoetis, na pessoa de Everton Carvalho, pela parceria, confiança e apoio para a realização deste projeto;

Obrigada aos colaboradores da UNESP de Botucatu: Gisele (laboratório de bromatologia-FMVZ); Andressa e Renato (secretários do departamento-FMVZ); Cláudia (secretaria da pós graduação da FMVZ); Renata Capela (UNIPEX) pelas análises de sangue; Du, Wilson e Paulinho por toda a ajuda no confinamento. Aos funcionários da fábrica de ração, na pessoa do Sandro. Aos colaboradores da FEPAF-FMVZ e aos colaboradores da UNESP de Jaboticabal: Diego, Branca, Marcia, Eliana, Cláudio, obrigada pelo suporte, mesmo que online, durante todos esses anos.

Obrigada Rodrigo Torres, Juliana Akamine e Sérgio Pereira, pós doutorandos que colaboraram para a elaboração dessa tese. Obrigada pela disponibilidade e toda a ajuda prestada.

Obrigada aos membros do NUPPEC e a cada estagiário que passou pelo confinamento no

momento desse estudo. Foi de grande importância cada participação, em especial: Luiz Antônio Fogaça, Camila Prado, Mateus Parra, Henrique Morais, Jean Galvão, Matheus Rossi, Lucas Rodrigues, Helena Graciane, Maria Carolina Arruda, Isabella Romão, Mariane Gennari, Samara Silva, Bárbara Valdambri e Richard Vaquero;

Aos grandes amigos de pós graduação que tive o prazer de compartilhar bons e desafiadores momentos: Camila Pereira, Bismarck Santiago, Leone Rocha, Flabiele Soares, Hozane Souza, Matheus Oliveira, Anderson Koster, Yasmin Calaça, Rafaela Rodrigues, Pedro Garcia, Karine Dalla Vecchia. Muito obrigada!!! Vocês foram essenciais para a conclusão desse projeto e quero levá-los sempre comigo.

Obrigada ao Frigoestrela por todo auxílio no abate dos animais e coleta de amostras e usina São Manuel pela doação do bagaço de cana.

Obrigada Thamiris Lemos, minha psicóloga, e quem me apoiou em grande parte deste processo.

Obrigada imensamente a todos os meus amigos da vida, sou muito abençoada por estar rodeada de tantas pessoas boas. Em especial: Família “Chicãozada” e aos amigos e irmãos que a UNESP me ajudou a encontrar. AMO MUITO VOCÊS!.

Obrigada ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - número do processo: 140158/2020-0CN pela bolsa concedida para a elaboração do estudo.

Obrigada PREMIX e a todos os colaboradores, na pessoa de André Pastori D’Aurea, pela oportunidade de um emprego ao final deste curso e por todo o suporte na minha carreira profissional.

NADA se conquista sozinho, por isso... mais uma vez... obrigada a quem colaborou para uma construção de vida até aqui e...

NUNCA parem de aprender... A vida nunca para de ensinar!

...Eu nunca serei perfeito, mas eu posso e vou melhorar... Eu vou falhar, mas eu posso e vou, falhar menos...

Eu vou querer desistir, mas eu posso e vou continuar tentando...

“O Senhor, pois, é Aquele que vai adiante de ti; Ele estará contigo, não te deixará,

Nem te desampará,

Não temas, nem te espantes”

Sumário

Considerações Gerais	1
CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura.....	3
1.1 Uso de confinamento no Brasil.....	3
1.2 Saúde ruminal	5
1.3 Aditivos utilizados em confinamento de bovinos de corte.....	8
1.4 Monensina Sódica.....	11
1.5 Virginiamicina e uso combinado com a monensina	15
1.6 Propionato de Laidlomocina.....	18
2. Referências Bibliográficas.	20
CAPÍTULO 2 – Uso de Propionato de Laidlomocina para bovinos confinados em dietas de alto concentrado	29
2.1 Introdução e Justificativa.....	31
2.2 Objetivos e hipótese.....	32
2.3 Material e Métodos.....	32
2.3.1 Animais e local do experimento.....	32
2.3.2. Dieta e ingredientes.....	33
2.3.3.Comportamento ingestivo	35
2.3.3.1 Avaliação do Índice de Seleção de Ingredientes.....	36
2.3.3.2. Análise de Componentes Principais.....	37
2.3.4. Perfil metabólico do sangue.....	38
2.3.5 Histomorfometria do epitélio ruminal	39
2.3.6. Análise estatística	40
2.4 Resultados.....	41
2.4.1. Desempenho Produtivo.....	41
2.4.2. Comportamento ingestivo.....	46
2.4.3. Saúde Ruminal.....	50
2.4.4.Parâmetros Sanguíneos	51
2.5 Discussão	52
2.6 Conclusão	57
2.7 Referência.....	57
CAPÍTULO 3: Perfil transcriptômico do epitélio ruminal de bovinos confinados submetidos a dieta com alta inclusão de concentrado com Monensina sódica ou uso combinado de Monensina e Virginiamicina.	62
3.1 Introdução.....	64
3.2 Objetivo e Hipótese	65

3.3 Material e Métodos	65
3.3.1 Extração do RNA, preparação da biblioteca e sequenciamento	65
3.3.2. Mapeamento das sequências no genoma de referência.....	66
3.3.3. Identificação de genes diferencialmente expressos.....	66
3.4. Resultados.....	67
3.4.1. Avaliação geral do transcriptoma	68
3.5. Discussão	73
3.5.1.Regulação da proliferação celular.....	73
3.5.2. Desenvolvimento do epitélio ruminal	77
3.5.3. Atividade de transporte ativo transmembrana.....	81
3.5.4.Processos catabólicos de ácidos graxos.....	85
3.5.5.Considerações finais.....	88
3.6 Conclusão	89
3.7. Referências bibliográficas	89
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	106

RESUMO - O objetivo do estudo foi avaliar a inclusão de aditivos e seu uso combinado em dietas com altos teores de concentrado para bovinos Nelore confinados, em relação ao consumo de matéria seca, desempenho produtivo, comportamento ingestivo, parâmetros sanguíneos e saúde ruminal, envolvendo análises histo-morfológicas e de transcriptoma de papilas ruminais. Utilizou-se 96 bovinos machos não-castrados da raça Nelore alocados no confinamento experimental da FMVZ-UNESP, campus de Botucatu, com peso inicial médio de 332 ± 28 kg e 24 meses de idade. Os animais foram divididos em três tratamentos de acordo com a associação ou não dos aditivos: Tratamento 1: Monensina sódica (T1: MON); Tratamento 2: MON + Virginiamicina (T2: MON+VM) e tratamento 3: Propionato de laidlomocina (T3: LP), caracterizando um delineamento em blocos casualizados, com 8 repetições por tratamento (4 animais/baia). O período experimental teve duração de 118 dias, sendo 24 dias de fase de adaptação e a dieta final foi composta por uma proporção de concentrado: volumoso de 90:10. No abate, coletou-se o peso de carcaça quente e fragmentos de epitélio ruminal. Utilizou-se o procedimento PROC MIXED do SAS 9.4, considerando um nível de significância de $P \geq 0,05$ para avaliação estatística dos dados. O programa R foi utilizado para elaboração do gráfico de regressão não linear do consumo de matéria seca. Durante a adaptação, houve efeito de tratamento para o CMS ($P < 0,001$), onde bovinos suplementados com LP apresentaram uma maior ingestão, chegando a estabilizar o consumo mais rapidamente. Este fato acarretou em um maior consumo de FDN ($P = 0,019$), o que pode ter contribuído para um maior tempo de ruminação ($P = 0,035$). Para as análises histológicas, reportou-se que bovinos que consumiram MON apresentaram papila com menor espessura de queratina ($P < 0,01$), e a combinação de MON + VM obteve os maiores valores ($P = 0,0299$) para largura de papila. A laidlomocina apresentou resultados semelhantes de desempenho em relação aos demais tratamentos e pode ser uma alternativa de uso em dietas para bovinos confinados. A maior expressão de genes envolvidos na proliferação celular (CLD3, E2F1, FADD), transporte transmembranar, (CYSRT1, BLC2A1) e desenvolvimento do epitélio (PRLR e THRB) contribuiu para justificar as mudanças histo-morfológicas no epitélio ruminal e, aparentemente a Monensina parece ser mais eficiente em manter o ambiente ruminal mais protegido frente à fermentação ruminal.

PALAVRA CHAVE: aditivos, ionóforo, virginiamicina, Nelore, confinamento

ABSTRACT - The objective of the study was to evaluate the inclusion of additives and their combined use in diets with high concentrate levels for feedlot Nellore cattle, in relation to dry matter intake, performance, ingestive behavior, blood parameters and ruminal health by histomorphological and transcriptome analysis of ruminal papillae. Ninety-six non-castrated Nellore male cattle allocated in the experimental feedlot at FMVZ-UNESP, Botucatu campus, with average initial weight of 332 (± 28) kg and 24 months were used. The animals were divided into three treatments according to association or not of the additives: Treatment 1: Sodium Monensin (T1: MON); Treatment 2: MON + Virginiamycin (T2: MON+VM) and treatment 3: Laylomycin propionate (T3: LP), randomly block design, with 8 replications by treatment (4 animals/pen). The experimental period lasted 118 days, with 24 days of adaptation phase and the final diet consisted of a concentrate: roughage ratio of 90:10. At slaughter, hot carcass weight and rumen epithelium fragments were collected. The PROC MIXED procedure of SAS 9.4 was used, considering a significance level of $P \geq 0.05$ for the statistical evaluation of the data. The R program was used to create the non-linear regression graph of dry matter intake. During adaptation, there was a treatment effect for DMI ($P < 0.001$), where cattle supplemented with LP had a higher DMI, stabilizing consumption more quickly. This fact led to a higher consumption of NDF ($P = 0.019$), which may have resulted in a longer rumination time ($P = 0.035$). For the histological analyses, it was reported that cattle MON presented smaller keratin thickness of papilla ($P < 0.01$), and MON + VM obtained the highest values ($P = 0.0299$) for papilla width. LP presented similar performance results in relation to the other treatments and can be an alternative use in feedlot cattle diets. The higher expression of genes involved in cell proliferation (CLD3, E2F1, FADD), transmembrane transport (CYSRT1, BLC2A1) and epithelial development (PRLR and THRB) contributed to justify the histomorphogenic changes in the ruminal epithelium and apparently, Monensin seems to be more efficient in keeping the ruminal environment more protected against ruminal fermentation.

KEY WORDS: Additives, ionophores, virginiamycin, Nellore, feedlot

Considerações Gerais

As atualidades e perspectivas da cadeia produtiva da carne nacional têm expressado enorme potencial econômico. Em 2022, o Brasil atingiu seu recorde de volume de carne bovina exportada, alcançando 2,26 milhões de toneladas vendidas para mais de 150 países, um aumento de 22,6% em relação a 2021. Para 2023, as expectativas se mantêm e o Brasil deve seguir como líder mundial na oferta de carne (ABIEC, 2023).

Entretanto, para atender ao crescente mercado consumidor, é necessário aperfeiçoar o sistema de produção, por meio de estratégias que busquem o encurtamento do período de abate, juntamente com ferramentas que tragam eficiência à cadeia produtiva.

Logo, o objetivo de aumento de produtividade se baseia no abate de animais jovens, os quais são submetidos a dietas com alto concentrado para atender aos requerimentos de manutenção dos animais e maximizar seu ganho de peso. Entretanto, elevados níveis energético dietéticos, aumenta-se ocorrências de distúrbios metabólicos, como a acidose ruminal, pelas limitações fisiológicas dos animais (Owens et al., 1998).

Portanto, a formulação de dietas que promovam melhorias no desempenho animal, especialmente em bovinos confinados, na tentativa de melhorar eficiência alimentar, diminuição dos custos de produção e de riscos de distúrbios metabólicos, obtendo melhores resultados sobre as características de carcaça e carne são necessárias nos dias de hoje.

Um das principais variáveis analisadas e controladas deste sistema, é o consumo de matéria seca (CMS), considerada a mais importante e com capacidade de afetar diretamente o desempenho animal (Waldo e Jorgensen, 1981). O consumo de alimento adequado garante os nutrientes e a energia exigidos pelos microrganismos para desenvolvimento, maximização da fermentação ruminal e conseqüentemente, ganho de peso. São várias as características que podem afetar o consumo de alimento, podendo ser intrínseca a dieta ou/e ao animal.

O uso de aditivos antimicrobianos em confinamento é uma importante ferramenta para controlar desordens metabólicas, pois atuam por meio da seleção de microrganismos desejáveis que degradam carboidrato não estrutural, como o amido, e intensifica a fermentação ruminal, aumentando a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente o propionato; Dessa forma, é considerado uma importante ferramenta para regular o CMS, devido a saciedade química (Nagaraja et al., 1997).

Em um levantamento realizado com nutricionistas de confinamento no Brasil,

99,78% dos entrevistados utilizam aditivos em dietas de terminação de bovinos, sendo a Monensina Sódica escolhida como primeira opção, representando 86,1%, seguida da virginiamicina com 5,6% e a combinação de monensina com virginiamicina com 2,8% de utilização. Quando perguntados sobre a segunda opção de aditivos, 65,7% dos nutricionistas optaram pela Virginiamicina (Silvestre e Millen, 2021).

Muito relatos da literatura suportam a teoria que a Monensina limita o CMS e melhora a eficiência alimentar (EA) (Goodrich et al., 1984; Ellis et al., 2012). Porém, deve-se salientar que o CMS em relação ao peso corporal de bovinos conforme os dias de confinamento tende a diminuir (Rigueiro et al, 2020), assim a sobra de nutrientes para ganho tende a ser reduzida, limitando o desempenho. Da mesma forma, a exigência de manutenção do animal está diretamente correlacionada ao seu peso corporal (BCNRM, 2016), ou seja, quanto mais pesado o animal vai ficando ao longo do confinamento, maior será a exigência de manutenção. Assim, a modulação do CMS e conseqüentemente de energia, através do uso de aditivos pode ser ajustada para não prejudicar o desempenho.

Nesse sentido, o uso combinado de Monensina com Virginiamicina (MONVM) além de novos aditivos que visem estimular o CMS estão sendo utilizados estrategicamente em dietas com alto concentrado afim de promover efeitos aditivos que promovam melhora na saúde ruminal e conseqüentemente no desempenho produtivo.

Em meta-análise de Cernicchiaro et al. (2016), examinaram efeitos comparativos na inclusão de Propionato de Laidlomicina (LP) e Monensina Sódica (MON) em bovinos de corte, e concluíram que a LP apresentou melhores resultados relacionados ao CMS, ganho de peso diário (GPD) e peso de carcaça quente (PCQ) quando comparado a monensina.

Benatti et al. (2017) reportou resultados positivos quando a MON foi combinada com VM nas doses de 25 ppm de VM combinada com 0:10:20:30 ppm de MON, mostrando aumentos lineares na eficiência alimentar (EA) ($P < 0,01$) e na energia líquida de manutenção e de ganho ($P < 0,01$). Rigueiro (2016), avaliando protocolos para uso combinado de VM (25 ppm) e MON (30 ppm), durante adaptação e terminação de Nelore confinados, encontrou que a suplementação de MON e VM na fase de adaptação e somente VM na terminação foi o protocolo que aumentou o peso vivo final, o CMS em kg/MS e em %PV, o GPD, PCQ, área de olho de lombo (AOL) final e ganho de AOL por dia, sem afetar os parâmetros de saúde ruminal e seletividade da dieta.

A transição de uma dieta rica em forragem para uma dieta altamente fermentável pode

induzir distúrbios digestivos no rúmen. Nesse sentido, ao transicionar novilhas em dietas com 0, 72 e 89% de concentrado, o pH foi diminuído conforme o nível de concentrado foi aumentado e vias envolvidas na atividade catalítica e proliferação de células epiteliais foram sub reguladas, enriquecendo vias relacionadas ao sistema imune e movimento celular dos leucócitos. Dos mais de 11.000 genes identificados, o autor identificou alguns como potenciais reguladores, que podem ser considerados como marcadores genéticos em condição de estresse durante a transição alimentar (Zhao et al., 2017).

Mudanças na expressão gênica de bovinos com e sem abscessos hepáticos foram reportadas por Abbas W. et al., (2020). no qual 211 genes foram identificados como diferencialmente expressos, onde identificou-se que genes envolvidos na síntese proteica foi diminuída em bovinos com abscesso, além da população microbiana epimural localizada na parede do rumen ter sido alterada, o que pode afetar o ganho de peso dos animais.

Sendo assim, a partir de sequências genômicas, é possível identificar um gene ou até todo o genoma de uma espécie e associá-las as suas funções biológicas para então, entender os mecanismos de controle que afetam suas características fenotípicas; esse tipo de estudo abriu um novo leque para a pesquisa científica abordar e aprimorar ferramentas que vêm sendo cada vez mais usuais dentro da nutrição de ruminantes.

Tais relatos indicam que uma maior compreensão dos mecanismos genéticos associados a saúde ruminal pode trazer melhorias nos parâmetros de eficiência no desempenho produtivo.

CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura

1.1 Uso de confinamento no Brasil

Em 2022, o Brasil atingiu seu recorde de volume de carne bovina exportada, alcançando 2,26 milhões de toneladas vendidas para mais de 150 países, um aumento de 22,6% em relação a 2021. Para 2023, as expectativas se mantêm e o Brasil deve seguir como líder mundial na oferta de carne (ABIEC, 2023). Dessa forma, visar a intensificação da produção de bovinos de corte se torna cada vez mais necessário para garantir a demanda do mercado consumidor.

Dessa forma, o confinamento se encontra como uma estratégia cada vez mais usual, visando aumento de produtividade e garantindo maior rentabilidade ao produtor, por meio da capacidade de ter um giro de capital mais rápido e aumentar o fornecimento de carne com

melhor qualidade, pelo fato de disponibilizar animais mais jovens ao abate. Atualmente, 18,02% dos animais abatidos no Brasil já advém de confinamento (6,73 milhões de cabeças). Em 2012, esse número era de 4,08 milhões, ou seja, um aumento de 39,37% em 10 anos. Além disso, a porcentagem de machos abatidos acima de 36 meses vem reduzindo e hoje representa apenas 9,9 % do total (ABIEC, 2023).

O confinamento tem como princípio ofertar uma dieta balanceada no cocho para garantir que os animais supram suas exigências de manutenção e ainda promovam acelerado ganho de peso em um curto período de tempo, aumentando a taxa de desfrute. Para tanto, houve uma mudança no padrão dietético dos animais, com aumento da inclusão de ingredientes concentrados (grãos) e diminuição de ingredientes volumosos. De 2009 a 2019, aumentou-se 12% da inclusão média de concentrado nas dietas de bovinos confinados (71,2% vs 83,3%) sendo que atualmente, 97,2% dos nutricionistas recomendam um nível de concentrado entre 71 a 90%, onde o milho, caracterizado como duro ou “flint”, é o principal grão utilizado com 97,2% de preferência (Silvestre e Millen, 2021).

Utilização de dietas de alto amido promove uma maior eficiência no ganho, com aumento do peso vivo final, assim como carcaças mais pesadas e com acabamento mais homogêneo. Pinto e Millen (2018) reportaram média de peso final para machos não-castrados de 526,5 kg. No último levantamento, Silvestre e Millen, (2021) já reportaram aumento no peso final dessa categoria de 555,8 kg, ou seja, um aumento de quase 30 kg, durante um período de confinamento que passou de 97 para 107 dias em média.

No entanto, dietas de alto amido pode levar a um aumento da fermentação ruminal e acúmulo de produtos finais da fermentação (principalmente ácidos graxos de cadeia curta, mas também ocasionalmente ácido lático), causando uma queda no pH ruminal (Owens et al., 1998). A redução do pH ruminal pode alterar a microbiota ruminal e causar algumas disfunções, como alterações nos padrões de alimentação e ruminação, redução do consumo de alimentos, reduzindo assim o desempenho do animal.

Para tanto, se faz necessário a aplicação de certos procedimentos para garantir que os animais se adaptem a essa dieta, evitando efeitos negativos sobre o desempenho. Adequações de protocolos de adaptação e recebimento dos animais, manejo para controle de consumo de alimento e leitura de cocho, avaliação dos processamentos dos grãos e gestão de dados do sistema, corroboram para o sucesso da operação e abre um cenário favorável para se avaliar a potencialidade de atuação dos aditivos microbianos.

Adicionalmente, os aditivos antimicrobianos são considerados uma importante ferramenta para manipular as reações de fermentação ruminal, aumentar a eficiência de incorporação dos nutrientes pelos microrganismos, afim de fornecer um maior aporte de energia para o hospedeiro, garantindo um melhor desempenho (Nagaraja et al., 1997).

Frente à um cenário pecuário desafiador, com custos de produção elevados e oscilação do valor da arroba, estratégias para garantir um melhor desempenho animal se fazem importante, entretanto, requer cautela e acurácia, pois a margem da lucratividade do produtor está cada vez mais tênue e os custos relacionados a nutrição representam a maior parte dentro do sistema de produção, com excessão da aquisição do animal (ABIEC, 2023).

1.2 Saúde ruminal

Os ruminantes se diferenciam da maioria dos mamíferos por possuírem quatro estômagos. Esses são constituídos pelos pré-estômagos, retículo, rúmen e omaso e o estômago verdadeiro, abomaso. Por não existir barreira física separando o rúmen do retículo, podemos considerar o compartimento denominando-o como, ruminoretículo (Church, 1988; Van Soest, 1994; Cunningham, 2004).

O ruminoretículo, no animal adulto, é o maior compartimento da cavidade abdominal e possui vários sulcos, nos quais se encontram vasos sanguíneos, linfonodos e tecido adiposo. Esses sulcos formam internamente os pilares, os quais delimitam os sacos cranial, dorsal, ventral, cego caudo dorsal

e cego caudo ventral que são muito importantes para a motilidade do rúmen. Juntamente com a própria parede se contraem e relaxam, acentuando ou diminuindo as divisões dentro da luz do ruminoretículo (Church, 1988; Van Soest, 1994; Cunningham, 2004).

Internamente, a mucosa ruminal é constituída por várias papilas, que são prolongamentos do epitélio, formadas por tecido conjuntivo, colágeno e são ricamente vascularizadas. Possuem tamanhos e formas variáveis de acordo com a idade, dieta e região do rúmen. Basicamente, possuem três importantes funções: proteção, metabolismo e absorção (Cunningham et al., 1992).

O epitélio ruminal não possui glândulas e é caracterizado como estratificado pavimentoso queratinizado, sendo formado por quatro camadas: basal, espinosa, granulosa e córnea ou queratinizada (REFERENCIA). A proliferação celular ocorre a partir da camada basal, e por divisão mitótica, sofrem diferenciação e migram para as demais camadas até atingir

a camada córnea e descamar para dentro do lúmen ruminal (Lavker e Matoltsy, 1970).

O estrato basal é a camada onde os compostos absorvidos são metabolizados e estão apoiados na membrana basal; o estrato espinoso varia em relação ao seu número de camadas, que estão unidas por desmossomos e é o local que inicia a metabolização dos AGCC; o estrato granuloso já é notável sinais de degeneração celular e o espaço intercelular começa a diminuir. Por fim, o estrato córneo é a camada mais queratinizada, que detém de uma permeabilidade seletiva a depender das condições do conteúdo ruminal, mas sua principal função é de proteger o epitélio contra abrasão química e invasão de microrganismos (Church et al., 1988; Baldwin e Jesse (1992), Cunningham, 2004).

O desenvolvimento das papilas acontece principalmente pela absorção dos AGCC, oriundos da fermentação ruminal (Sander et al., 1959; Tamate et al., 1962, Costa et al., 2008) No momento em que as bactérias liberam o AGCC para absorção, este está em sua forma protonada, ou seja, carregam uma molécula de H^+ (próton) e que ao cair no meio ruminal, promove a dissociação, ou seja, a liberação do H^+ , sendo este o principal responsável pelo processo de acidificação. Considerando um pH saudável para bovinos de corte variando de 5,8 a 6,8, cerca de 10% e 1% dos AGCC, respectivamente, estão na sua forma protonada, ou seja, 90 e 99% estão dissociados (Millen D.D. et al., 2013)

Em sua forma protonada, a absorção acontece mais rapidamente, de forma passiva, onde o AGCC apenas capta uma molécula de H^+ atravessa o epitélio; já na forma dissociada, os $AGCC^-$ estão eletricamente carregados e sua permeabilidade na camada lipídica do epitélio ruminal é extremamente baixa, sendo necessária um mecanismo de troca para que a absorção aconteça. Neste caso, utiliza-se o ion bicarbonato e então, quando um $AGCC^-$ é absorvido, uma molécula de HCO_3^- (geralmente 50% oriundo da saliva e 50% advindo do sangue) é liberada no fluido ruminal (Aschenbach et al. 2000).

Quando o bicarbonato adentra o meio ruminal, ele capta um H^+ , formando uma molécula de CO_2 e H_2O . Sendo assim, podemos dizer que as duas formas de absorção de AGCC atuam como tamponante no meio, sendo a forma protonada, atuando de forma “direta” e pela forma dissociada, de maneira “indireta”.

Após a absorção, estes AGCC se comportam de maneira diferente no epitélio, onde o butirato apresenta o maior efeito estimulatório para as papilas, seguido pelo propionato e então o acetato com pouco envolvimento neste processo (Nocek e Kesler 1980). Pensando nisso, o perfil dietético da dieta é fundamental para direcionar a produção dos AGCC e desenvolver o

epitélio ruminal.

Em longo prazo, a proliferação celular das papilas aumenta proporcionalmente à velocidade de absorção dos AGCC, contribuindo para a estabilização do pH ruminal, mas se a proliferação das células epiteliais for maior que a descamação, ocorrerá aumento no número de camadas no epitélio, definido como hiperplasia (Jones et al., 2000).

No trabalho de Zitnan et al. (2005), os animais com maior desenvolvimento papilar possuíam maiores concentrações plasmáticas de IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo1). Sakata et al., (1980) ao avaliar o efeito da insulina no processo de mitose celular no epitélio, descreveu que este processo ocorre mediante a produção dos AGCC e que o rúmen se adapta ao aumento da concentração de energia por meio da hiperplasia das células epiteliais (aumento do número de células na camada não cornificada).

Na falta de adaptação ou adaptação inadequada às dietas mais energéticas, o rúmen pode vir a sofrer lesões em sua parede, ocasionando morte celular. O acúmulo destas células na camada córnea é denominado paraqueratose, e ao aumentar significativamente sua espessura, denomina-se hiperqueratose, que pode induzir a aglutinação das papilas, endurecendo-as e impedindo a absorção. (Hinders, Owens e Bull, 1965). De forma geral, é comum que dietas com alto teor de alimentos concentrados estejam associadas a maior prevalência de paraqueratose ruminal (Tamate e Kikuchi, 1978), provavelmente resultante da indução de alta taxa de proliferação e migração celular sem tempo suficiente para diferenciação (Goodlad, 1981).

O acúmulo de AGCC e consequente queda do pH reflete em quadros de acidose ruminal, que acomete outros distúrbios como: diminuição da motilidade, aumento da osmolaridade e intensificação de quadros de hiperqueratose e rumenite, consideradas lesões no epitélio que também impede a absorção dos AGCC e ainda permite entrada de microrganismos indesejáveis, podendo acarretar em abscessos hepáticos (Nagaraja e Titgemeyer, 2007).

Dessa forma, lesões no epitélio podem comprometer diretamente o desempenho dos animais, se fazendo necessária, estratégias nutricionais que maximizem o desempenho, sem comprometer a saúde ruminal.

1.3 Aditivos utilizados em confinamento de bovinos de corte

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), qualquer substância adicionada intencionalmente ao alimento com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, não comprometendo seu valor nutritivo, pode ser definido como aditivo. Cada aditivo possui uma característica específica e uma quantidade indicada para ser fornecida a cada categoria.

Desde 1950, os antibióticos são fornecidos com o intuito de prevenir patologias por meio da seleção de microrganismos competidores de substrato, porém, observou-se efeito positivo como promotor de crescimento animal. Em contrapartida, na década seguinte, uma possível resistência aos princípios como tetraciclina e penicilina levaram a uma redução na utilização desses produtos, acarretando na produção de uma nova classe de antibiótico denominada de ionóforos, que teve sua liberação decretada para bovinos pela “*Food and Drug Administration*” em 1975. Atualmente existem mais de 120 ionóforos comercializados, mas apenas a monensina, narasina, salinomocina, lasalocida e laidlomocina podem ser fornecidas a ruminantes (Nagaraja et al., 1997).

Os ionóforos são considerados antibióticos poliéteres carboxílicos de baixo peso molecular formados por cepas de microrganismos como a *Streptomyces sp.*; Estes atuam como carreadores móveis aumentando a permeabilidade das membranas a íons específicos (Haney jr; Hoehn, 1967). Todos os ionóforos carboxílicos têm um mecanismo similar baseado no desbalanceamento intracelular catiônico, principalmente entre Na^+ e K^+ , que pode atuar na perda da função mitocondrial e das habilidades das células de realizar metabolismo oxidativo, além da perda de integridade da membrana que pode causar sua ruptura (Gad et al., 1985).

A maioria das células expõe prótons ativamente através da membrana celular e mantém o interior mais alcalino. As bactérias mantêm concentrações de K^+ muito altas que no meio externo. As concentrações internas elevadas de K^+ são necessárias não só para a síntese de proteína, como também para tamponar o pH intracelular por meio do mecanismo de troca de K^+/H^+ (Nagaraja et al., 1997). É necessário que o excesso de prótons (H^+) seja expulso da bactéria para que o pH interno se estabilize. Esse pH cria um gradiente químico de prótons; como o interior da membrana é mais negativo que o exterior, é criado também um potencial elétrico. O gradiente químico de prótons e o potencial elétrico são responsáveis pela formação da força motriz de prótons, que pode ser utilizada para importar solutos para dentro da membrana.

Segundo McGuffey (2001), cada ionóforo é capaz de se ligar conforme seu tamanho com um cátion apropriado. A ligação com o cátion inicia a formação do complexo cátion-ionóforo, o qual pode difundir-se pelo interior da membrana. De acordo com Nagaraja (1997), a ordem de seletividade para a monensina é $\text{Na}^+ \gg \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Li}^+ > \text{Cs}^+$ enquanto que para a salinomicina a ordem de seletividade é descrita como: $\text{Rb}^+, \text{Na}^+ > \text{K}^+ \gg \text{Cs}^+ > \text{Sr}^{++} > \text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$, Narasina por: $\text{Na}^+ > \text{K}^+, \text{Rb}^+, \text{Cs}^+, \text{Li}^+$, Lasalocida por: $\text{Ba}^{++} > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$. A Lasalocida é um ionóforo capaz de formar complexos com

cátions bivalentes, já para o propionato de laidlomicina, a ordem de seletividade não é consistente, mas parece ser $\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ e pouquíssima ou nenhuma atividade sobre $\text{Mg}^{++} > \text{Ca}^{++}$ e Sr^{++} (Grafe, 1989).

Os ionóforos atuam principalmente nas bactérias classificadas estruturalmente como Gram-positivas, que possuem uma única camada de peptidoglicano que por ser porosa, possibilita a entrada do mesmo. Já as espécies de bactérias classificadas como Gram-negativas detêm de uma segunda membrana composta por lipoproteínas, lipopolissacarídeos e contém canais de proteínas chamadas de porinas, com aproximadamente 600 dalton, que impede a ação do ionóforo, pois os mesmos são maiores que estes canais. Estas bactérias são em sua maioria, degradadora de carboidrato não estrutural (NSC) (Morais; Berchielli; Reis, 2011), já as Gram-positivas são comumente degradadoras de carboidratos estruturais (SC).

Bactérias Gram-positivas como a *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus spp.* são produtoras de ácido láctico, acetato, hidrogênio e formato e as bactérias Gram-negativas como *Megasphaera Elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* são produtoras de propionato e consumidoras de ácido láctico (Morais et al, 2011), ou seja, a adição de ionóforos altera o padrão de fermentação ruminal, aumentando propionato e diminuindo lactato.

A síntese do propionato ocorre pela maior conversão de fumarato a succinato, sem ocorrer liberação de hidrogênio no meio ruminal, o que propicia uma redução da síntese de metano e conseqüentemente, otimiza o fornecimento de energia ao animal (Bergen e Bates, 1984), enquanto que a síntese de acetato e butirato promove a produção de CH_4 .

O propionato tem o potencial de ser utilizado na gluconeogênese e oxidação pelo ciclo do ácido cítrico, podendo ser mais flexível como fonte de energia do que o acetato, por isso é considerado como o ácido precursor da glicose. De acordo com as informações do NASEN (2016) o propionato representa de 27 a 54% da glicose total sintetizada pelo fígado e por esta razão é considerado o mais importante AGCC fermentado no rúmen (Huntigton., 1997).

Em relação ao lactato, em condições normais, o ácido está presente no meio ruminal e apresenta um valor de pKa mais baixo, sendo considerado 10 vezes mais forte que o propionato em relação ao poder de acidificação e consequente queda de pH (Gladden B. L., 2004). Com o pH de até 5,5 ocorre o equilíbrio entre os microrganismos produtores e utilizadores de ácido láctico (Nocek, 1980); abaixo desse patamar, a condição ruminal propicia a proliferação de bactérias produtoras de lactato, como *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus*, *Butyrivibrio* e *Lachnospira* e minimiza a população das consumidoras, como *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera Elsdenii* e outros microrganismos degradadores de amido e fibra, acumulando lactato e acidificando mais ainda o meio ruminal.

Com a maximização da produção de ácidos sem o mesmo mecanismo de absorção, há o acúmulo dos mesmos no meio ruminal que podem vir a ocasionar distúrbios, como a acidose.

A acidose é o principal problema de ordem nutricional em confinamentos brasileiros (Silvestre e Millen, 2021) e pode desencadear outros problemas como laminite, timpanismos, incidência de abscessos hepáticos, rumenites, redução da motilidade ruminal, aumento da flutuação de consumo, queda no consumo de matéria seca e no desempenho produtivo como um todo. Schwartzkopf-Genswein et al. (2004), relataram que bovinos que tiveram flutuações no consumo de 10% no oferecido, permaneceram mais tempo com o pH ruminal abaixo de 5,5 e apresentaram redução de 6% no ganho de peso diário (GPD) e aumento de 7% na conversão alimentar (CA) em relação animais que permaneceram em um programa constante de alimentação.

Nagaraja e Titgemeyer (2007) classificaram a acidose como sub aguda (pH entre 5,1 e 5,5) e aguda (pH abaixo de 5,0), sendo a sub aguda até mais perigosa pois os sintomas são não evidentes, com excessão da flutuação e redução de consumo, que quando não são controlados, passam despercebidos mas prejudicam diretamente a rentabilidade do produtor. Porém, como a atuação dos ionóforos age inibindo gram-positivas como as *S. bovis*, evita-se então queda no pH e consequentemente, tal distúrbio.

Os ionóforos também são atuantes na redução da proteólise ruminal, pela diminuição da degradação de aminoácidos e consequentemente amônia. Aumentos de 22 a 55% no fluxo de proteína não degradada no rúmen foram observados (Bergen e Bates, 1984) em cinco estudos quando a monensina sódica foi oferecida. Hanson e Klopfenstein (1979) também demonstraram que a monensina causou um melhor desempenho animal em dietas com baixa proteína, demonstrando reduzir a exigência de proteína nas dietas.

1.4 Monensina Sódica

Considerado como o principal ionóforo utilizado em dietas para ruminantes, a Monensina (MON) desorganiza o transporte de íons segundo o modelo em que um cátion monovalente é trocado por outro durante a passagem pela membrana plasmática, tendo cerca de dez vezes maior afinidade por Na^+/H^+ que por K^+/H^+ . Entretanto, o gradiente de K^+ é cerca de 25 vezes maior que o gradiente de Na^+ , tornando o efluxo de K^+ via MON mais favorável que o efluxo de Na^+ (Russell J.B.; Strobel H.J., 1989).

O efluxo de K^+ resulta em acúmulo de H^+ , levando ao decréscimo no pH intracelular. Na tentativa de se autoregular, a célula expulsa H^+ e permite a entrada de Na^+ , causando um desarranjo na bomba de sódio-potássio, que propicia um gasto energético, até que suas forças se cessam e seu metabolismo seja reduzido, fazendo com que a bactéria entre em um estado de inércia ou morte por exaustão (Russell e Strobel, 1989).

Aumentos na concentração de ácido propiônico variaram de 2,42%, 26,08% até 38,62%, seguidos da diminuição de ácido acético de 4,36%, 6,34% e 10,76%, assim como de ácido butírico -23,76%, 6,45% e 4,83% (Johnson et al., 1979; Russell et al., 1980 e Thornton e Owens, 1981), respectivamente com a utilização de MON em comparação com dietas sem o aditivo.

O propionato, além de ser o precursor de glicose também é o metabólito responsável pela regulação da saciedade em ruminantes. Pelos mecanismos quimiostáticos, os AGCC produzidos no rúmen estimulam os microrreceptores da parede ruminal a transmitirem um sinal aos centros de saciedade do cérebro para regular o CMS. Além disso, com o aumento da taxa de fermentação (principalmente em dietas com alta inclusão de amido), tem-se uma diminuição na taxa de passagem e aumento da retenção da dieta, diminuição da motilidade ruminal, fato que também pode contribuir para a redução do CMS, mas neste caso, há melhoria na eficiência alimentar (EA) (Allen, 2000). Em outras palavras, Oliveira et al., (2005) associou a redução do CMS a melhoria de eficiência energética da dieta pela mudança dos padrões de fermentação e Baile et al. (1979), justificou essa redução devido a baixa palatabilidade da MON.

Na produção ruminal de ácidos orgânicos aumenta a concentração ruminal de propionato e reduz a concentração de acetato e butirato sem modificar a concentração total de ácidos graxos voláteis. Adicionalmente reduz a produção de metano de forma indireta, por inibir as bactérias produtoras de hidrogênio e formato, que são intermediários na formação do metano no ambiente

ruminal. E inibe ainda microrganismos produtores de ácido láctico, reduzindo o lactato ruminal e aumentando o pH.

Em função de afetar o desenvolvimento de algumas bactérias que promovem proteólise e deaminação em nível de rúmen, os ionóforos reduzem a degradação das proteínas nesse compartimento, diminuindo a quantidade de amônia, permitindo a sua digestão pós-ruminal. Outro aspecto a ser considerado com a utilização de ionóforo é o aumento de aminoácidos glicogênicos na corrente sanguínea oriundos do intestino delgado, reduzindo a mobilização de tecidos corporais e gliconeogênese.

Dos aditivos melhoradores de desempenho utilizados na nutrição de bovinos, observa-se que o efeito na redução no CMS é mais evidente quando MON é fornecida aos animais (Goodrich et al., 1984), enquanto outros ionóforos, como lasalocida, salinomicina e propionato de laidlomicina, em geral não demonstraram efeito tão claro no consumo (Spires et al., 1990). De acordo com o NRC (1996) recomenda-se que o CMS estimado seja diminuído em 4% em animais suplementados entre 27,5 a 33 ppm de monensina.

Em experimento de dosagem, Raun et al. (1976) utilizaram 35 novilhos Hereford com peso médio inicial de 362,5 kg divididos em seis tratamentos de acordo com a dosagem de monensina adotada: 0; 2,7; 5,5; 11; 22; 33; 44 e 88 ppm. Todas as dosagens, exceto 88 ppm, tiveram GPD iguais ou maiores que o grupo controle (0 ppm), sendo o maior valor 1,01 kg na dosagem 11 ppm. Em relação a eficiência alimentar, a melhor dosagem foi considerada a de 33 ppm.

Segundo Tedeschi, Fox e Tylutki (2003), indicaram que a dosagem de 28 ppm apresentou um aumento na EA de 6 a 7,5% em bovinos confinados na fase de crescimento, com ganho de peso aumentando de 1,6 a 1,8% e redução de 4 a 6% no CMS.

Os autores Duffield, Merrill e Bagg (2012), por meio de uma meta-análise reunindo 40 artigos e 24 relatórios técnicos envolvendo o fornecimento de monensina, indicaram a mesma dosagem de 28,1 ppm, porém com respostas de 2,5% de aumento no GPD e melhora de 6,4% na EA. A dosagem de 25 ppm de MON utilizada por Wang et al (2003), em 320 animais confinados, consumindo dieta de adaptação (57,8% de concentrado) e terminação (93,5 % de concentrado) a base de cevada, foi suficiente para reportar um aumento no GDP durante ambos os períodos (1,69 vs 1,65 kg/d $P=0,07$ e 1,64 vs 1,57 kg/d, $P=0,01$), melhora na CA durante todo o período experimental (5,09 vs 5,26, $P=0,02$), aumento do peso de carcaça quente (PCQ) (322,92 vs 312,75, $P=0,004$) em relação a animais que não consumiram o aditivo.

Gibb et al (2000), avaliando o desempenho e comportamento ingestivo de bovinos Hereford x Angus, com peso inicial de 267 kg e consumindo dietas a base de trigo em confinamento chegando a inclusão de até 97,4% de concentrado e suplementados com MON (26 ppm) ou Salinomicina (13 ppm) vs Controle (sem aditivos), reportaram efeito na redução de consumo dos animais tratados com MON, (8,2; 9,3 9,3 kg MS/dia $P < 0,05$), porém refletiu em uma redução no peso de carcaça (231,2; 228,2; 245,8kg), entretanto para a EA não foi observada diferença estatística (6; 5,8; 5,8, $P > 0,1$).

Em um segundo experimento, mesmo autor citado acima, usou a suplementação de MON (25 ppm) e Salinomicina (13 ppm) em dietas a base de cevada com proporção de concentrado chegando a 92% e não evidenciou diferenças estatísticas no CMS, EA e GPD, porém, animais tratados com MON apresentaram mais idas ao cocho e a cada ida, passaram mais tempo se alimentando (39,7 vs 35,2 min, respectivamente), ou seja, a MON parece regular a intensidade de alimentação e o aditivo foi indicado para categorias ou situações que os animais chegam ao cocho de forma mais intensa.

Outros autores também reportaram que a MON não afetou GPD de bovinos confinados consumindo dietas com alto concentrado (Gibb et al, 2001; Meyer et al., 2009; Montgomery et al., 2009 e Gomes et al., 2001).

De acordo com os dados da meta-análise de Duffield (2012) a eficácia da MON em melhorar a conversão alimentar diminuiu com o passar dos anos, com 8,1% na década de 1970, 6,4% na década de 1980 e 2,3% e 3,5% nas décadas de 1990 e 2000 respectivamente, da mesma forma que a dosagem utilizada. Este fato pode ser justificado pelas melhorias nas condições de manejo, nutrição, processamento de grãos, genética e saúde dos animais confinados. Entretanto, com o aumento da inclusão de ingredientes concentrados na dieta, a utilização deste aditivo se faz mais importante pelo fato de melhorar a saúde ruminal, evitando distúrbios metabólicos.

Erickson et al. (2003) realizaram três experimentos de desempenho com o objetivo de avaliar a interação entre o manejo de cocho e a concentração de MON sobre o desempenho e comportamento alimentar de bovinos confinados. Foram utilizados 1.793 animais no primeiro experimento e 1.615 no segundo, sendo avaliados três tratamentos: 1) manejo de cocho *ad libitum* com 28,6 ppm de MON ou manejo de cocho sem sobra com 2) 28,6 ou 3) 36,3 ppm. de monensina. No primeiro estudo, o manejo de cocho e a concentração de MON não afetaram o desempenho dos animais. A concentração de MON no segundo trabalho não limitou o CMS e aumentou o GPD, porém, sem afetar a EA; Já no terceiro estudo, com novilhos canulados no

rúmen, a MON reduziu o CMS e aumentou número de refeições desses animais, fazendo com que as variações de pH fossem reduzidas.

Depenbusch et al. (2008) avaliaram a eficácia da monensina (300 mg/dia) ou Monensina + Tilosina (300 + 90 mg/dia) (em torno de 37 ppm de MON) em dietas para bovinos de terminação baseadas em milho floculado, sem ou com grão de milho úmido de destilaria (WDGS) (0 ou 25%). 371 bovinos foram utilizados com média de 299 kg e não foi reportado efeito do aditivo no desempenho desses animais consumindo milho floculado.

O estudo está de acordo com os resultados de Sitta (2016), que avaliou o processamento de milho em dietas com adição de aditivos e relatou que a floculação foi mais efetiva em aumentar a digestibilidade do amido no trato total e o desempenho animal, enquanto que os aditivos não demonstraram efeito em aumentar o valor energético das dietas e melhorar a EA. Pelo fato da floculação ser o processamento do grão que mais disponibiliza o amido para aproveitamento pelo animal e ocasionalmente já intensificar a fermentação ruminal, o aditivo parece não ter efeito tão expressivo quando comparado a outros tipos de processamento.

Stock et al. (1990), em experimento de novilhos cruzados confinados, testou-se a interação do tipo de grão (milho ou trigo) x nível de volumoso (0 ou 7,5% (50:50 silagem de milho e feno de alfafa) x inclusão de monensina (0 ou 27,5 ppm) em relação à EA. A adição de MON com milho e sem volumoso tendeu a aumentar a EA (0,153 vs 0,163), mas com 7,5% de volumoso tendeu a deprimir a EA (0,157 vs 0,147). Porém, em dietas à base de trigo, a adição tanto da forragem, como de monensina, melhoraram a EA (0,161 vs 0,159, $P < 0,06$).

Bretschneider et al., (2008), observaram uma relação quadrática entre a dose de MON ou lasalocida e GPD em bovinos de corte alimentados com dietas à base de forragem. Esses autores também observaram que a magnitude da resposta GPD aos ionóforos da dieta pode depender da qualidade da forragem e da relação forragem:concentrado da dieta. Os ionóforos descritos nesta revisão também aumentaram a EA de forma quadrática, porém sem afetar o CMS de animais em pastejo. Os dados estão de acordo com algumas conclusões do estudo de Duffield et al., (2012), que relata que o uso de silagem de milho como fonte de volumoso influenciou positivamente o efeito da MON nos resultados de EA e CMS em comparação a outras fontes.

Outro ponto importante de se avaliar ao definir a dosagem de MON para bovinos confinados, se refere a empresa que a comercializa: Pereira et al (2014), ao testar um produto contendo MON, avaliaram doses de 0,9, 12, 27 e 36 ppm de MON para bovinos confinados consumindo dieta de terminação com 84% de concentrado por 84 dias, constatou que a dose de 9

ppm foi melhor em relação ao peso vivo final, GPD,EA, assim como nos parâmetros de saúde ruminal, onde as dosagens de 9 e 36 ppm apresentaram maiores áreas de superfície absorviva, indicando melhor desenvolvimento do epitélio ruminal.

De Paula, M. (2021), avaliando duas diferentes fontes comerciais (MON-A e MON-B) sob a mesma dosagem de 25 mg/kg MS, em relação a um tratamento sem aditivo (C), sobre a fermentação ruminal de bovinos canulados consumindo dieta com 92% de concentrado, encontrou que animais que receberam MON-B apresentaram menor consumo de MS, MO, FDN, FDA, PB, ELg e NDT que o tratamento controle ($P \leq 0,05$), assim como aumentou a proporção molar do ácido propiônico, diminuindo a proporção do acético ($P \leq 0,05$); a MON-A em relação ao controle, não apresentou diferenças estatísticas, já a MON-B foi mais efetiva na regulação do CMS.

No Brasil, o levantamento de Silvestre e Millen (2021) reportou uma dosagem média recomendada de 24,6 ppm.

1.5 Virginiamicina e uso combinado com a monensina

Com relação a Virginiamicina (VM), a molécula é considerada um antibiótico não-ionóforo, das classes das estreptograminas, produzidas por uma linhagem de *Streptomyces virginiae*, compostas por dois químicos distintos (peptolídeos), denominados de fator M ($C_{28}H_{35}N_3O_7$) de peso molecular de 525 e fator S ($C_{43}H_{49}N_7O_{10}$) de peso molecular de 823, que apresentam um efeito sinérgico quando combinados à razão de 4:1, respectivamente M:S (Page, 2003 apud Van dijk et al., 1957).

A atividade da VM é contra bactérias Gram-positivas e não apresenta efeito sobre a maioria das Gram-negativas, devido a sua parede celular impermeável. Após penetrar na parede celular das bactérias, ambos os fatores se ligam especificamente e irreversivelmente a subunidades 50S dos ribossomos inibindo a formação de ligações peptídicas durante a síntese proteica bacteriana, o que rompe todos os processos metabólicos no interior da célula, que causa redução no crescimento (bacteriostase) ou morte da célula bacteriana (atividade bactericida) (Cocito, 1979).

A VM apresenta vantagens bem similares às da MON, com algumas funcionalidades que os diferenciam e devem ser melhor estudadas. Nagaraja et al. (1987), relatam que a capacidade da VM em controlar o pH ruminal é ainda superior à MON. Além disso, a mesma também poupa

proteína ruminal da desaminação e apresenta eficiência na redução de abscessos hepáticos devido a inibição do crescimento de *Fusobacterium necrophorum* e *Actinomyces pyogenes* no rúmen (Rogers et al. 1995).

Assim como a MON, a VM pode causar aumento da síntese de propionato e consequente redução no CMS e melhoria na EA. Parigi-Bini (1979), mostrou que em doses de 24 a 30 ppm o ganho de peso foi aumentado em novilhos com média de 250 kg entre 4,2 a 6% e melhorando a EA entre 1,5 a 4,9%.

Rogers et al. (1995) avaliaram o efeito de diferentes doses de VM (0;11;19,25 e 27,5 ppm) em dietas com 90% de concentrado, e observaram redução no CMS, aumento no GPD e maior EA quando as dosagens foram comparadas com o grupo controle. As doses de 19,5 e 27,5 ppm foram as que melhores obtiveram os resultados de GPD (1,35; 1,36; 1,39; 1,41 kg/d), EA (6,504; 6,400; 6,252; 6,256), e na eficiência de reduzir abscessos hepáticos (30,14; 30,46; 18,80; 18,53% dos fígados condenados)

Um compilado de estudos realizados por Gill e colaboradores (Gill et al., 1989,1990; Koevering et al., 1991a; Smith et al., 1989) também encontrou melhoras no GPD, EA e redução de abscessos hepáticos sob dosagem de VM variando de 7,5 até 50 ppm. Thorniley et al. (1998) avaliando a fermentação no rúmen e ceco de ovinos, indicou que com 20 ppm de VM foi suficiente para reduzir a produção de ácido láctico. Evidenciou-se que ovinos tratados com VM apresentaram menores ocorrências de diarreia que ovinos não tratados com o aditivo (Murray et al., 1992b; Rowe and Ferguson 1992; Godfrey et al., 1993). Entretanto, Coe et al (1999), observaram que a utilização de VM nas dosagens de 17,5 e 25 ppm para bovinos não afetou a concentração de lactato, porém, aumentou a proporção de propionato em relação ao acetato.

Zorrila-Rios et al., (1994) observou que com 20 ppm de VM pode ser suficiente para reduzir os riscos de acidose sem afetar o CMS. Já Murray et al (1992b) ao administrar VM intraruminalmente encontrou redução no CMS, excluindo possíveis justificativas de sabor ou palatabilidade do aditivo. Existem resultados contrastantes relacionados ao CMS, desempenho e CA de animais suplementados com VM. Alguns autores relatam que a suplementação com VM não altera o CMS de novilhos mestiços, bem como o GPD (Montano et al. 2014; Navarrete et al. 2017).

Gill et al., (1990), compararam a inclusão de 10 e 17,5 ppm de VM ou 25 ppm de MON em dietas para bovinos confinados. Tanto a VM quanto a MON reduziram o CMS, não afetaram o

GPD e melhoraram a EA. A VM na dose de 17,5 ppm melhorou em 4,7% a EA contra 2,7% dos animais tratados com MON em relação ao tratamento controle. Avaliando 2 doses de VM (0; 16 e 22,5 ppm) e MON (28 ppm) para bovinos Holandeses confinados, Salinas-Chavira et al., (2009), reportaram uma melhora linear na EA em relação as dosagens de VM, porém a resposta não foi a mesma para animais alimentados com MON (0,176; 0,180; 0,183; 0,178).

Recentemente, alguns estudos estão avaliando planos nutricionais com uso combinado de aditivos. De acordo com o levantamento de Silvestre e Millen (2021), 2,8% dos nutricionistas entrevistados utilizam alguma combinação de ionóforos com não-ionóforos em dietas de confinamento.

Sitta (2011), analisou o efeito de MON, VM e salinomicina associados ou isolados, em relação ao desempenho de tourinhos Nelore consumindo dieta altamente concentrada. A autora relatou que a combinação de 30 ppm de MON + 15 ppm de VM foi mais eficaz em melhorar o desempenho dos animais por meio da redução do CMS e aumento da EA. De forma similar, Camilo (2017) comparou dietas compostas isoladamente por MON (30 ppm), VM (34 ppm) ou combinadas MON:VM (30:15; 30:25; 30:34 ppm), entretanto, não foi possível diagnosticar efeito no CMS e GPD, além disso, a MON isolada pareceu ter melhor EA que quando combinada.

Nunes et al., (2013), avaliando dietas com alto teor de concentrado (73 e 91%) para bovinos Nelore confinados, observaram uma redução de 8,9% no CMS e 11,4% de melhoria na EA nos animais que consumiram os aditivos combinados (salinomicina: 13 ppm + VM: 15 ppm) ao invés de separadamente. Silva et al., (2004) concluíram um experimento com bovinos Nelore (peso inicial de 416 kg), confinados por 69 dias consumindo dieta com 77% de concentrado tratados com a associação de VM (8 ppm) + Salinomicina (10 ppm) em comparação com o tratamento controle e ambos os aditivos isolados (Salino: 15 ppm e VM: 16 ppm). A associação apresentou um GPD de 17,9% maior que o tratamento controle, com melhora de 8% na EA, mesmo não diferido estatisticamente; Neste caso, os animais ganharam mais peso, mas também apresentaram um maior CMS (11,3 kg MS, frente a SALINO: 10,1 kg e VM: 10,2 kg).

A combinação de aditivos relatada por Benatti et al., (2017) também foi positiva. Ao avaliar dietas contendo 25 ppm de VM combinada com doses de 0:10:20:30 de ppm de MON mostrou que a combinação dos aditivos apresentou uma redução linear no CMS com aumentos na EA ($P < 0,01$) e na energia líquida de manutenção e de ganho ($P < 0,01$), recomendando a dose

de VM:MON de 25:30 ppm, ainda que tenha percebido uma tendência ($P=0,06$) de aumento no PCQ em relação ao grupo controle, dos animais que consumiram 25:0 ppm de VM:MON.

Rigueiro et al (2021), avaliando protocolos para uso combinado de VM (25 ppm) e MON (30 ppm), durante adaptação e terminação de Nelore confinados, encontrou que a suplementação de MON e VM na fase de adaptação e somente VM na terminação foi o protocolo que aumentou o peso vivo final, o CMS em kg/MS e em %PV, o GPD, PQC, AOL final e ganho de AOL por dia, sem afetar os parâmetros de saúde ruminal e seletividade da dieta.

Já Sitta (2016) encontrou diferenças estatísticas para a área de superfície absorptiva ($P=0,09$) e altura média de papila ($P = 0,05$) quando 17 ppm de VM foram incluídos a dietas de terminação de bovinos confinados, contra uma dosagem de 25 ppm de VM, indicando que uma dose mais baixa pode ser mais eficiente em melhorar a saúde ruminal.

1.6 Propionato de Laidlomocina

A laidlomocina também é um ionóforo utilizado para ruminantes, sendo considerado um poliéter produzido por cepas de *Streptovorticillium eurocidicum* (Zinn et al. 1996). Seu mecanismo de ação é semelhante ao de outros ionóforos (MON), bem como sua estrutura, se diferenciando apenas por um grupo propionil no terceiro carbono em vez do grupo metoxi, na MON. Baseado no complexo com cátions monovalentes Na^+ , K^+ e bivalentes Ca^{2+} , Mg^{2+} os ionóforos se diferem entre si pela afinidade com esses íons e no caso da laidlomocina, este preferencialmente transporta mais K^+ do que Na^+ e tem pouquíssima afinidade com íons divalentes; já a MON tem preferência pelo transporte de Na^+ e não transporta os íons bivalentes. (Grafe, 1989; Gad et al. 1985). Grafe et al (1989), notificaram que esse composto parece ter menos efeito sobre a fermentação ruminal, independente do padrão de ingestão do que a MON. Dessa maneira, com uma menor produção de propionato, o consumo pode não ser tão afetado como ocorre com animais suplementados com monensina.

Segundo Wampler et al. (1998), um dos principais produtos da laidlomocina, chamado de propionato de laidlomocina (LP) inibe o crescimento da *Streptococcus bovis*, mas se mostrou menos eficiente do que a MON na inibição quando o pH se encontrava em 5,7 e 6,7. No entanto, Thompson et al., (2021) avaliando a inclusão de LP (10 ppm), bacitracina de zinco (70 mg/dia) e MON (30 ppm) em relação a fermentação ruminal, relatou que a LP foi mais

eficiente que a MON no controle de pH ($P < 0,05$) e numericamente reduziu a relação acetato:propionato ($P = 0,12$), porém a produção total de AGCC foi maior quando a MON foi utilizada ($P = 0,05$). Domesick e Martin (1999) também observou que a LP (11 ppm), assim como a MON, foi eficiente na redução da produção de metano e relação acetato: propionato durante a fermentação ruminal, em dietas com 80% de concentrado.

De acordo com Bauer et al (1995), ao avaliar a inclusão de 0, 6 e 12 ppm de LP em dietas para novilhos confinados, encontrou que a dosagem de 6 ppm foi suficiente para aumentar a produção dos AGCC e diminuir a produção de lactato. Em um experimento seguinte do mesmo autor (QUAL EXPERIMENTO, ANO), a suplementação de LP demonstrou um potencial efeito em mitigar os casos de acidose subclínica, uma vez que reduziu as flutuações de consumo durante a adaptação de novilhos a dietas ricas em concentrado e a dosagem de 12 ppm apresentou melhor GPD (1,57, 1,56, 1,63 kg/dia, $P = 0,05$), EA (0,160, 0,165, 0,169, $P = 0,003$) e espessura de gordura subcutânea (1,06, 1,19, 1,26, cm $P = 0,07$), respectivamente, sem apresentar efeitos no CMS.

A suplementação com LP (10 ppm) diminuiu a degradação ruminal da PB dietética em 8,1% ($P < 0,10$) e a taxa de passagem de N microbiano para o intestino delgado (7,4%, $P < 0,10$), assim como controlou o pH ruminal de bovinos Holandeses canulados. No estudo seguinte, avaliando o desempenho de novilhos com média de 255 kg, a suplementação com LP não afetou o CMS, mas aumentou o GPD em 6% ($P < 0,1$) e melhorou a EA em 5% ($P < 0,05$), diminuindo os requerimentos de energia de manutenção em relação a dieta sem o aditivo (Zinn et al., 2000).

Em meta-análise de Cernicchiaro et al. (2016), examinaram efeitos comparativos na inclusão de LP e MON em bovinos de corte, e concluíram que a LP apresentou melhores resultados relacionados ao CMS, GPD e PCQ quando comparado a monensina. A EA também apresentou melhorias e está corroborando com os dados de Bohnert et al. (2000). Alguns autores relatam similaridade no desempenho produtivo e características de carcaça com a utilização de ambos os aditivos (Thompson et al. 2016).

Spires et al. (1990), em uma meta-análise onde foi compilado seis experimentos que utilizaram LP com dosagens variando de 3 a 36 mg/kg, concluíram que uma suplementação entre 6 e 12 mg/kg de MS obteve melhores resultados de eficiência de ganho de peso, independente da dieta.

Outro ponto interessante a respeito da LP, é que se pode usar a mesma dose durante todo o período de confinamento. Sabe-se que alguns protocolos utilizam uma dosagem de MON ou

VM diferente durante a adaptação e terminação, justamente pela redução de CMS que ocorre com a adição desses ionóforos. Durante a adaptação, os animais estão se desenvolvendo e podem não consumir a quantidade necessária de nutrientes, fato que pode vir a comprometer seu desempenho ao longo do confinamento; e em relação a terminação, o CMS tende a diminuir ao longo dos dias, assim, a sobra de nutrientes para ganho é insuficiente para o máximo desempenho (Rigueiro et al., 2021).

Desse modo, a modulação do CMS e conseqüentemente de energia, através do uso de aditivos, pode levar a um melhor consumo e maior desempenho no final da terminação.

O propionato de laidlomina é um produto liberado para ruminantes, porém, no Brasil ainda não é comercializado, o que envolve o interesse pelo estudo em buscar alternativas que melhorem a eficiência alimentar e a redução de custos dentro da bovinocultura.

2. Referências Bibliográficas.

ABBAS W, KEEL B. N., KACHMAN S. D., FERNANDO S. C., WELLS JE, HALES KE, LINDHOLM-PERRY AK. Rumen epithelial transcriptome and microbiome profiles of rumen epithelium and contents of beef cattle with and without liver abscesses. *J Anim Sci.* 2020 Dec 1;98(12):skaa359. doi: 10.1093/jas/skaa359. PMID: 33170221; PMCID: PMC7846140.

ABIEC (2023) Perfil da pecuária no Brasil. <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-01/>; <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-02/>

AL JASSIM, R. A. M.; GORDON, G. L. R.; ROWE, J. B. The effect of basal diet on lactate-producing bacteria and the susceptibility of sheep to lactic acidosis. *Journal of Animal Science.* v. 77, p. 459-469, 2003.

ASCHENBACH JR, GABEL G., Effect and absorption of histamine in sheep rumen: Significance of acidotic epithelial damage. *Journal of Animal Science* 78:464-470, 2000

BAILE CA, MCLAUGHLIN CL, POTTER EL, CHALUPA W. Feeding behavior changes of cattle during introduction of monensin with roughage or concentrate diets. *J Anim Sci,* Jun;48(6):1501-8. doi: 10.2527/jas1979.4861501x. PMID: 479044, 1979

BALDWIN, R. L.; JESSE, B. W. Technical note: isolation and characterization of sheep ruminal epithelial cells. *Journal of Animal Science,* n. 69, p. 3603-3609, 1991

BALDWIN, R. L.; MCLEOD, K. R.; KLOTZ, J. L.; HEITMANN, R. N. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant *Journal of Dairy Science,* n. 87, p. E55-E65, 2004

BANKS, W. *Histologia Veterinária Aplicada*. São Paulo: Editora Manole. p. 629, 1991.
BERCHIELLI, T. T.; PIRES, Alexandre Vaz; OLIVEIRA, S. G. *Nutrição de ruminantes*. [S.l.;s.n.], 2006

Bauer ML, Herold DW, Britton RA, Stock RA, Klopfenstein TJ, Yates DA. Efficacy of laidlomycin propionate to reduce ruminal acidosis in cattle. *J Anim Sci*. 1995 Nov;73(11):3445-54. doi:10.2527/1995.73113445x. PMID: 8586605, 1995

BENATTI, J.M.B.; ALVES NETO, J.A.; OLIVEIRA, I.M.; RESENDE, F.D.; SIQUEIRA, G.R. Effect of increasing monensin sodium levels in diets with virginiamycin on the finishing of Nellore cattle. *Animal Science Journal*, v. 88, p. 1709- 1714, 2017

BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *Journal of Animal Science*, Champaign, n. 58, p. 1465-1483, 1984.

BERGEN, W.G., BATES, D.B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.*, 58:1465-1483. 1984

BRETSCHNEIDER, G., ELIZALDE, J.C. & PÉREZ, F.A., The effect of feeding antibiotic growth promoters on the performance of beef cattle consuming forage-based diets: A review. *J. Liv. Sci.* 114:135-149, 2008.

BRINK, D. R.; LOWRY, S. R.; STOCK, R. A. et al. Severity of liver abscesses and efficiency of feed utilization of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 68, p. 1201-1207, 1990.

CAMILO, F. R. Aditivos antimicrobianos e processamento de grão na terminação bovinos de corte confinados. 2017. 89 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

CEPEA/ESALQ– Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (org.). Queda acumulada do PIB do agronegócio chega a 4,28% de janeiro a setembro. 2022. Disponível em: [https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/PIB-DO-AGRO-20.12\(1\).pdf](https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/PIB-DO-AGRO-20.12(1).pdf). Acesso em: 15 fev. 2023.

CERNICCHIARO, N.; CORBIN, M.; QUINN, M.; PROUTY, F.; BRANINE, M.; RENTER, D. G. Meta-analysis of the effects of laidlomycin propionate, fed alone or in combination with chlortetracycline, compared with monensin sodium, fed alone or in combination with tylosin, on growth performance, health, and carcass outcomes in finishing steers in North America. *Journal of Animal Science*. v. 94, n. 4, p. 1662-1676, 2016.

CHURCH, D. C. *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition*. New Jersey: Prentice- Hall, 564p, 1988.

COCITO, C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 43, p. 145- 198, 1979.

COE, M. L.; NAGARAJA, T. G.; SUN, Y. D.; WALLACE, N.; TOWNE, E. G.; KEMP, K. E.; HUTCHESON, J. P. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *Journal of Animal Science*. v. 77, n. 8, p. 2259- 2268, 1999.

COOPRIDER, K. et al. Feedlot efficiency implications on greenhouse gas emissions and sustainability. *Journal of animal science*, v. 89, p. 2643-2656, 2011.

COSTA, S. F., M. N. PEREIRA, L. Q. MELO, J. C. RESENDE JÚNIOR, and M. L. CHAVES. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactate sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros-I Aspectos histológicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60:1-9, 2008.

CUNNINGHAM, J.G. Digestão: os processos fermentativos. In: *Fisiologia veterinária*. Quarta edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004.

DEPENBUSCH BE, DROUILLARD JS, LOE ER, HIGGINS JJ, CORRIGAN ME, QUINN MJ. Efficacy of monensin and tylosin in finishing diets based on steam-flaked corn with and without corn wet distillers grains with solubles. *J Anim Sci.* 2008 Sep;86(9):2270-6. doi: 10.2527/jas.2007-0017. Epub 2008May 9. PMID: 18469059.

DESWYSEN A.G., ELLIS W.C., POND K.R., JENKINS W.L., CONNELLY J. Effects of monensin on voluntary intake, eating and ruminating behavior and ruminal motility in heifers fed corn silage. *Journal of Animal Science* v.64, p. 827:834,1987.

DOMESCIK EJ, MARTIN SA. Effects of laidlomycin propionate and monensin on the in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J Anim Sci.* 77:2305–2312, 1999.

DUFFIELD, T. F.; MERRILL, J. K.; BAGG, R. N. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. *Journal of Animal Science*, v. 90, n. 12, p. 4583-4592, 2012.

DULPHY J.P., REMOND B., THERIEZ M. Ingestive behaviour and related activities in ruminants. In: Ruckebusch Y., Thivend P. (eds) *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Springer, Dordrecht, 1980. https://doi.org/10.1007/978-94-011-8067-2_5.

ERICKSON GE, MILTON CT, FANNING KC, COOPER RJ, SWINGLE RS, PARROTT JC, VOGEL G, KLOPFENSTEIN TJ. Interaction between bunk management and monensin concentration on finishing performance, feeding behavior, and ruminal metabolism during an acidosis challenge with feedlot cattle. *J Anim Sci.* 2003 Nov;81(11):2869-79. doi: 10.2527/2003.81112869x. PMID: 14601891.

GALYEAN, M. L.; MALCOLM, K. J.; DUFF, G. C. Performance of feedlot steers fed diets containing laidlomycin propionate or monensin plus tylosin, and effects of laidlomycin propionate concentration on intake patterns and ruminal fermentation in beef steers during adaptation to a high- concentrate diet. *Journal of Animal Science*. v. 70, n. 10, p. 2950-2958, 1992.

GALYEAN, M. L.; RIVERA, J. D. Nutritionally related disorders affecting feedlot cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 83, p. 13–20, 2003.

GIBB, D. J., MOUSTAFA, S. M. S., WIEDMEIER, R. D. ET MCALLISTER, T. A. Effect of salinomycin or monensin on performance and feeding behavior of cattle fed wheat- or barley-based diets. *Can. J. Anim. Sci.* 81:253–261, 2001.

GLADDEN LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol.* 2004 Jul 1;558(Pt 1):5-30. doi: 10.1113/jphysiol.2003.058701. Epub 2004 May 6. PMID: 15131240; PMCID: PMC1664920.

GOMES, C.T. Aditivos (monensina sódica, levedura e probióticos) para bovinos da raça Nelore terminados com rações com concentrado rico em co-produtos. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciências)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2009.

GOODLAD, R. A., Some effects of diet on the mitotic index and the cell cycle of the ruminal epithelium of sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 66(4):487-499, 1981.

GOODRICH, R. D.; GARRET, J. E.; GHAST, D. R.; KIRICH, M. A.; LARSON, D. A.; MEISKE, J. C. Influence of monensin on the performance of cattle. *Journal of Animal Science*, v. 58, p. 1484-1498, 1984.

GRAFER U., SCHLEGELC., STENGELW., IHNAND L. RADIC, Isolation and structure of 26-deoxytetracycline, a new polyether antibiotic from *Streptomyces tovicillium* of the livoret iculi, *J. Basic Microbiol.* 29, 3, 149-155, 1989

HANEY JR., M. E.; HOEHN, M. M. Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and isolation. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, Washington, v. 7, p. 349-352, 1967.

HINDERS RG AND OWEN FG 1965. Relation of ruminal parakeratosis development to volatile fatty acid absorption. *Journal of Dairy Science* 48, 1069–1073.

HUNGATE, R. E. *The rumen and its microbes*. New York: Ed: Academic Press. 465p. 1966.

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *Journal of Animal Science*, v.75, p. 852-867. 1997

JONES, C.; HEINRICHS, J. Early Weaning Strategies. 2007. (Disponível em: <http://www.extension.org/pages/10862/early-weaning-strategies> , acessado em: 15 Dezembro 2011)

LAVKER RM, MATOLTSY AG. Formation of horny cells: the fate of cell organelles and differentiation product in ruminal epithelium. *J Cell Biol.* 1970 Mar;44(3):501–512.

LEMOES B. J., F. G. CASTRO L. S. SANTOS B. P. MENDONÇA V. R. COUTO, AND FERNANDES J. J., Monensin, virginiamycin, and flavomycin in a no-roughage finishing diet fed to zebu cattle. *J. Anim. Sci.* 94:4307–4314, 2016, doi:10.2527/jas.2016-0504

LI, W., GELSINGER, S., EDWARDS, A. et al. Transcriptome analysis of rumen epithelium and meta-transcriptome analysis of rumen epimural microbial community in young calves with feed induced acidosis. *Sci Rep* 9, 4744, 2019, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40375-2>

LLIS JL, DIJKSTRA J, BANNINK A, KEBREAB E, HOOK SE, ARCHIBEQUE, ET AL. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain-fed beef cattle. *J Animal Sci.*, 2012, 90:2717–26. doi: 10.2527/jas.2011-3966

MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy cattle current status and future outlook. *Journal of Dairy Science*, v. 84, (E. Suppl.), p. 194-203, 2001.

MEISKE, J. C. Influence of monensin on the performance of cattle. *Journal of Animal Science*, v. 58, p. 1484-1498, 1984.

MEYER, N. F.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; GREENQUIST, M. A.; LUEBBE, M. K.; WILLIAMS, P. AND ENGSTROM, M. A. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. *Journal of Animal Science*, 87:2346-2354, 2009.

MOLINARI, M. Morfometria em rumen de cordeiros alimentados exclusivamente a pasto ou com concentrado. Dissertação (Mestrado), 48p. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, 2017

MONTGOMERY, S. P., J. S. DROUILLARD, J. J. SINDT, T. B. FARRAN, H. J. LABRUNE, AND R. D. HUNTER. Effects of monensin and tylosin concentrations in limit-fed, high-energy growing diets for beef cattle. *Prof. Anim. Sci.* 19:244–250, doi: 10.15232/S1080-7446(15)31412-1, 2003

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. Nutrição de ruminantes. Jaboticabal, Funep, 2006. p.539-563.

Murray, P.J., Rowe, J.B., Aitchson, E.M. and Winslow, S.G., Live weight gain and wool growth in sheep fed rations containing virginiamycin. *Aust. J. Exp. Agric.*, 32: 1037-1043, 1992b

NOCEK, J. E.; KESLER, E. M. Growth and rumen characteristics of Holstein steers fed pelleted or conventional diets. *Journal of Dairy Science*, v.63, p. 249– 254. 1980.

NOCEK, J. E.; KESLER, E. M. Growth and rumen characteristics of Holstein steers fed pelleted or conventional diets. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 63, n. 2, p. 249-254, Feb. 1980.

NUNEZ, A. J. C.; CAETANO, M.; BERNDT, A.; DEMARCHI, J. J. A.; LEME, P. R.; LANNA, D. P. D. Uso combinado de ionóforo e virginiamicina em Novilhos Nelore confinados com dietas de alto concentrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., Lavras. Anais... Lavras: Apor Softwerw, p. 1-68. 1 CDROM, 2008

OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; FREITAS, A. W. P. et al. Parâmetros ruminal, sanguíneo e urinário e digestibilidade de nutrientes em novilhas leiteiras recebendo diferentes níveis de monensina. *Rev.Bras. Zootec.*, v.34, n.6, p.2143-2154, 2005a.

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

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

PAGE, S. W. The role of enteric antibiotics in livestock production. Australia: Avcare Limited, 2003, p. 337.

PARIGI-BINI R.. Researches on virginiamycin supplementation of feeds used in intensive cattle management. In: Proc. Perform. Anim. Prod Milano, Italy p. 237–250., 1979

PAULA, MATHEUS FELIPE DE FREITAS VIANA DE: Uso de ionóforos na dieta de bovinos Nelore: Fementação ruminal e digestibilidade dos nutrientes, 67, Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassuninga/SP, 2021

PEREIRA MURILLO C. S., CARRARA TÁSSIA V. B., DA SILVA JULIANA, PINTO ANACAROLINA J., VICARI DANIEL V. F., PEREIRA FLAVIA T. V., ARRIGONIMÁRIO D. B., MILLEN DANILO D. (2014) Effects of different doses of sodium monensin on rumen papillae and tissue histology of feedlot Nelore cattle. *Animal Production Science* 54, 1830-1833.

PEREIRA, I. C. Estudo meta-analítico da flutuação da ingestão de massa seca no desempenho, comportamento ingestivo e saúde ruminal de bovinos confinados com dietas de alto concentrado. 79f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2016.

PEREIRA, M. C. S. Desempenho produtivo, comportamento ingestivo, características de carcaça, morfometria ruminal e cecal em bovinos Nelore confinados submetidos a restrição nutricional ou consumo de ingredientes concentrados antes do período de adaptação. 107 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

PERRY, T. W.; BEESON, W. M.; MOHLER, M. T. et al. Effect of monensin on beef cattle performance. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 42, p. 761-765, 1976.

PINTO, ANA C. J.; MILLEN, DANILO D.. Nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists: The 2016 Brazilian survey. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 99, n. 2, p. 392-407, 2019. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/190379>>.

POOS MI, HANSON T. L., KLOPFENSTEIN TJ. MONENSIN effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. *J Anim Sci Jun*;48(6):1516-24., 1979 doi: 10.2527/jas1979.4861516x. PMID: 479045.

RAUN, A.P., COOLEY, C.O., POTTER, E.L. et al. 1976. Effect of monensin on feed efficiency of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.*, 43(3):670-677.

RIGUEIRO A. L. N., PEREIRA M. C. S., SILVESTRE A. M., PINTO A. C. J., F. L. D., DIAS

E. F.F., DEMARTINI B. L., ESTEVAM D. D., DELLAQUA J. V. T., SOUZA K. L. R., SILVA L. A. F., NUNES A. B. P. C., SOUZA, M., MILLEN D. D. Withdrawal of sodium monensin when associated with virginiamycin during adaptation and finishing periods on feedlot performance, feeding behavior, carcass, rumen, and cecum morphometrics characteristics of Nelore cattle, *Frontiers in Veterinary Science* 10, 2023, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2023.1067434>

RIGUEIRO, A. L.N. et al. Different combinations of sodium monensin and virginiamycin during feedlot finishing of Nelore cattle. *Animal Production Science*, v. 60, n. 8, p. 1061-1072, 2020. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/201595>>.

ROGERS, J. A.; BRANINE, M. E.; MILLER, C. R.; WRAY, M. I.; BARTLE, S. J.; PRESTON, R. L.; GILL, D. R.; PRITCHARD, R. H.; STILBORN, R. P.; BECHTOL, D.T. Effects of dietary virginiamycin on performance and liver abscess incidence in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, Albany, v. 73, p. 9-2, 1995.

RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

S.C. GAD, C. REILLY, K. SIINO AND F.A. GAVIGAN AND G. WITZ, thirteen cationic ionophores: their acute toxicity, neurobehavioral and membrane effects, *Drug and chemical toxicology*, 8(6) , 451-468, 1985

SAKATA, T.; HIKOSAKA, K.; YOKO SHIOMURA; TAMATE, H. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. *The British journal of nutrition*, v. 44, n. 3, p. 325-31, nov.1980.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. *Journal of Dairy Science*, v.61, p.1109–1113, 1978

SANDER, E. G.; WARNER, R. G.; HARRISON, H. N.; LOOSLI, J. K. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosa in the young calf. *Journal of Dairy Science*, v.42, p.1600-1605. 1959.

SILVA, A. P. S. Efeito da monensina, da virginiamicina e dos óleos funcionais de mamona e caju em bovinos Nelore submetidos a mudança abrupta para dietas com elevado teor de concentrado 103 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

SILVA, D.J., A. C. QUEIROZ. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, p.235, 2002.

SILVA, S. L.; ALMEIDA, R.; SCHWAHOFER, D. et al. Effects of salinomycin and virginiamycin on performance and carcass traits of feedlot steers. *J. Anim. Sci.*, v.82, suppl.1, p.41-42, 2004.

SILVESTRE, A. M. and MILLEN, D. D. 2021. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. *Revista Brasileira de Zootecnia* 50: e20200189. <https://doi.org/10.37496/rbz5020200189>

SITTA C., Additives (ionophore and no ionophore), corn grain processing and level of neutral detergent fiber from corn silage on finishing cattle diets. PhD Dissertation. Brazil:University of São Paulo;pp. 121, 2016

SITTA, C. Aditivos (ionóforos, antibióticos não ionóforos e probióticos) em dietas com altos teores de concentrado para tourinhos da raça Nelore em terminação. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SMITH, B. P. Diseases of the Alimentary Tract: Ruminant Alimentary Disease E. m B. P. Smith, Large Animal: Internal Medicine (5th ed., pp. 739-842). St. Louis Missouri: Elsevier HealthSciences, 2015.

SPIRES, H. R.; OLMSTED, A.; BERGER, L. L.; FONTENOT, J. P.; GILL, D. R.; RILEY, J.G.; WRAY, M. I.; ZINN, R. A. Efficacy of laidlomycin propionate for increasing rate and efficiency of gain by feedlot cattle. Journal of animal science, n. 68, p. 3382, 1990.

STOCK, R. A.; SINDT, M. H.; PARROTT, J. C.; GOEDEKEN, F. K.,. Effects of grain type, roughage level and monensin level on finishing cattle performance. J. Anim. Sci., 68 (10): 3441, 1990.

SUN D, YIN Y, GUO C, LIU L, MAO S, ZHU W, LIU J. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of rumen wall morphological and functional development induced by different solid diet introduction in a lamb model, Journal of Animal Science and Biotechnology 10;12(1):33, 2021, doi.org/10.1186/s40104-021-00556-4.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. Journal of Environmental Quality, v. 32, p. 1591- 1602, 2003.

THOMPSON, G. B. Some Effects of Physical Forms of Rations on Feed Utilization by Lambs. Ph.D.thesis, University of Missouri, Columbia, 1958.

THORNILEY, G.R., ROWE, J.B., COWCHER, P.C. e BOYCE, M.D., 1998. A single drench of virginiamycin to increase safety of feeding grain to sheep. Aust. J. Agric. Res. 49, 899-906.

THORNTON, J.H., OWENS, F.N. 1. Monensin supplementation and in vivo methane production by steers. J. Anim. Sci., 52(3):628-634, 1981

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 476p, 1994.

WALDO, D. R.; JORGENSEN, N. A. Forages for high animal production: nutritional factors and effects of conservation. Journal of Dairy Science, 64:1207-1229, 1981.

WANG, T. L.; BOGRACHEVA, T. Y. A.; HEDLEY, C. F. L. Starch: as simple as A, B, C? Journal of Experimental Botany, v. 49, n. 320, pp. 481–502. 1998.

WARNER, R.G. Nutritional factors affecting the development of a functional ruminant – a historical perspective. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE, 1991, Ithaca. Proceedings... Ithaca: Cornell University, p.1-12. 1991.

WASEEM ABBAS AND OTHERS, Rumen epithelial transcriptome and microbiome profiles of rumen epithelium and contents of beef cattle with and without liver abscesses, *Journal of Animal Science*, Volume 98, Issue 12, December, skaa359, 2020, <https://doi.org/10.1093/jas/skaa359>.

WELCH, J. G.; HOOPER, A. P. Ingestion of feed and water. In: CHURCH, D. C. (Ed). *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition*. Englewood Cliffs: Reston, p.108-116, 1988.

ZINN, R. A.; OWENS, F. N.; WARE, R. A. Flaking corn: processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 80, 1145-1156, 2002.

ZITNAN, R.; KUHLA, S.; SANFTLEBEN, P.; BILSKA, A.; SCHNEIDER, F.; M. ZUPCANOVA; VOIGT, J. Diet induced ruminal papillae development in neonatal calves not correlating with rumenbutyrate. *Veterinari Medicini*, 50, 11, 472–479. 2005.

ZORRILLA-RIOS, JOSE & HORN, G & MC NEW, R. Nutritive value of ammoniated wheat straw fed to cattle. *Journal of animal science*. 69. 283-94, 1991, 10.2527/1991.691283x.

CAPÍTULO 2 – Uso de Propionato de Laidlomocina para bovinos confinados em dietas de alto concentrado

RESUMO - O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do propionato de laidlomocina em relação à monensina sódica e a combinação da mesma com virginiamicina em relação ao consumo de matéria seca, desempenho produtivo, comportamento ingestivo, parâmetros sanguíneos e saúde ruminal de bovinos Nelore confinados consumindo dieta com alto teor de concentrado. Foram utilizados 96 bovinos machos não castrados da raça Nelore alocados no confinamento experimental da FMVZ-UNESP, campus de Botucatu, com peso inicial médio de 332 ± 28 kg e 24 meses de idade. Os animais foram divididos em três tratamentos de acordo com a associação ou não dos aditivos: Tratamento 1: Monensina sódica (T1: MON); Tratamento 2: MON + Virginiamicina (T2: MON+VM) e tratamento 3: Propionato de laidlomocina (T3: LP), caracterizando um delineamento em blocos casualizados, com 8 repetições por tratamento (4 animais/baia). O período experimental teve duração de 118 dias, sendo 24 dias de fase de adaptação e a dieta final foi composta por uma proporção de concentrado: volumoso de 90:10. No abate, coletou-se o peso de carcaça quente e fragmentos de epitélio ruminal e cecal. Utilizou-se o procedimento PROC MIXED do SAS 9.4, considerando um nível de significância de $P \geq 0,05$ para avaliação estatística dos dados. O programa R foi utilizado para elaboração do gráfico de regressão não linear do consumo de matéria seca. Durante a adaptação, houve efeito de tratamento para o CMS ($P < 0,001$), onde bovinos suplementados com LP apresentaram uma maior ingestão, chegando a estabilizar o consumo mais rapidamente. Este fato acarretou em um maior consumo de FDN ($P = 0,019$), o que pode ter contribuído para um maior tempo de ruminação ($P = 0,035$). Para as análises histológicas, reportou-se que bovinos que consumiram LP apresentaram papilas com maior espessura de queratina em relação a bovinos suplementados com MON ($P = 0,0009$), mas foram similares em relação a largura de papila, onde a combinação de MON + VM obteve os maiores valores ($P = 0,0299$). O ionóforo LP apresentou resultados similares em relação aos outros aditivos avaliados, podendo ser fornecido para bovinos de corte confinados consumindo dietas altamente energéticas.

PALAVRA CHAVE: aditivos, ionóforo, virginiamicina, Nelore, confinamento

ABSTRACT- The objective of the study was to evaluate the effect of laidlomycin propionate in relation to sodium monensin and its combination with virginiamycin in relation to dry matter intake, performance, ingestive behavior, blood parameters and ruminal health of feedlot Nellore cattle consuming a diet with high concentrate content. Ninety-six non-castrated Nellore male cattle was allocated in the experimental feedlot at FMVZ-UNESP, Botucatu campus, with an average initial weight of 332 ± 28 kg and 24 months of age were used. The animals were divided into three treatments according to the association or not of the additives: Treatment 1: Monensin sodium (T1: MON); Treatment 2: MON + Virginiamycin (T2: MON+VM) and treatment 3: laidlomycin propionate (T3: LP), randomly as a block design, with 8 replications per treatment (4 animals/pen). The experimental period lasted 118 days, with 24 days of adaptation phase and the final diet consisted of a concentrate: roughage ratio of 90:10. At slaughter, hot carcass weight and fragments of ruminal and cecal epithelium were collected. The PROC MIXED procedure of SAS 9.4 was used, considering a significance level of $P \geq 0.05$ for the statistical evaluation of the data. The R program was used to create the non-linear regression graph of dry matter intake. During adaptation, there was a treatment effect for DMI ($P < 0.001$), where cattle supplemented with LP had a highest intake, stabilizing consumption more quickly. This fact led to a higher NDF intake ($P = 0.019$), which may have contributed to a longer rumination time ($P = 0.035$). For histological analyses, cattle from LP had thicker keratin papillae in relation to cattle fed MON ($P = 0.0009$), but they were similar in relation to papilla width, where the combination of MON + VM obtained the highest values ($P = 0.0299$). The LP ionophore showed similar results in relation to the other evaluated additives, and can be used for feedlot cattle at high energy diets.

KEYWORD: ionophore, monensin, virginiamycin, laidlomycin propionate, Nellore, feedlot.

2.1 Introdução e Justificativa

Assumindo uma posição de protagonismo, estima-se que, em torno de 25% do PIB brasileiro seja representado pelo setor do agronegócio (CEPEA, 2022). Em 2022, O país atingiu recorde de exportação de carne bovina, totalizando 2,26 milhões de toneladas vendidas para mais de 150 países, com crescimento de 22,6%, resultando em um faturamento histórico de 40,8% maior que 2021, na ordem de USD 12,97 bilhões (ABIEC, 2023).

Nesse cenário, se faz necessário a busca por estratégias nutricionais e de manejo que visem atender o mercado consumidor e garantir um produto de qualidade. A produção de bovinos em confinamento é uma das ferramentas utilizadas e estima-se que atualmente, o sistema forneça 18,1% do total de animais abatidos (ABIEC, 2023). Tipicamente, a dieta utilizada é composta principalmente por grão altamente fermentescíveis, visando aumento do aporte energético e melhora no desempenho produtivo. De 2009 a 2019, aumentou-se 12% da inclusão média de concentrado nas dietas de bovinos confinados (71,2% vs 83,3%) sendo que atualmente, 97,2% dos nutricionistas recomendam um nível de concentrado entre 71 a 90% (Silvestre e Millen, 2021).

Sendo assim, a utilização de aditivos alimentares é outra prática que vêm sendo cada vez mais usual nos confinamentos brasileiros, afim de controlar a fermentação ruminal e evitar distúrbios metabólicos, além de melhorar a eficiência alimentar dos animais.

Silvestre e Millen (2021) reportaram que 99,78% dos confinamentos brasileiros utilizam aditivos em dietas de terminação, sendo a Monensina Sódica (MON) a primeira opção (86,1%), seguida da virginiamicina (VM) (5,6%) e a combinação de ambos (2,8%) (MON+VM).

Um das razões de utilizar aditivo como a Monensina, é pelo controle do consumo de matéria seca (CMS) e melhoria na eficiência alimentar (Goodrich et al., 1984; Duffield et al., 2002). Contudo, para estratégias nutricionais que almejem altos desempenhos durante o confinamento, talvez essa pode não ser a melhor opção, visto que no final do período de terminação, o consumo tende a cair naturalmente, possivelmente em função da produção de leptina (Ingvarsen L K e Boisclair R. Y, 2001) e conjuntamente com um aditivo limitador de CMS, pode implicar na estagnação do ganho de peso.

Nesse sentido, o ionóforo propionato de laidlomina (LP) têm mostrado resultados positivos com animais taurinos, pois sua inclusão aumentou o CMS, ganho de peso diário e o rendimento de carcaça em comparação ao tratamento com MON (Cernicchiaro et al., 2016;

Galyean et al. 1992). Spires et al. (1990), recomendou a dose de 6 e 12 mg/kg de MS para otimizar o ganho de peso, muito abaixo da média recomendada de ionóforos e não-ionóforos no Brasil que está em 24,6 e 23,0 mg/kg MS, respectivamente (Silvestre e Millen, 2021).

Entretanto, ainda não há informações sobre esse ionóforo para bovinos Nelore, podendo ser mais uma alternativa de uso em confinamento.

2.2 Objetivos e hipótese

A hipótese do estudo foi que o propionato de laidlomocina não reduziria o consumo de matéria seca e melhoraria o desempenho produtivo e a saúde ruminal de bovinos Nelore confinados em relação a Monensina sódica e Monensina combinada com Virginiamicina.

Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito do propionato de laidlomocina em comparação com Monensina e com o uso combinado de Monensina e Virginiamicina em relação ao consumo de matéria seca, desempenho produtivo, comportamento ingestivo, parâmetros sanguíneos e saúde ruminal de bovinos Nelore confinados em períodos de terminação, submetidos à dieta de alto concentrado.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Animais e local do experimento

O estudo foi conduzido no Confinamento Experimental do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Foram utilizados 96 bovinos, machos não castrados, da raça Nelore, com peso inicial médio de 332 ± 28 kg durante 118 dias.

Todos os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram seguidos pelos Princípios Éticos para Experimentação Animal regulamentada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” do Campus de Botucatu/SP (Protocolo CEUA 0113/2019).

Os animais vieram de um sistema de pastejo e permaneceram por cinco dias em seis baias coletivas abertas para aclimação ao ambiente, recebendo feno tifton, farelo de soja e mineral.

Na sequência, os animais passaram por um período de jejum alimentar de 16 horas para pesagem inicial, vacinação, vermifugação e adição do brinco de identificação para então, serem distribuídos em dois blocos de acordo com o peso (Leve e Pesado) e direcionados aos seguintes tratamentos: T1 (Monensina (MON); T2 (Monensina + Virginiamicina (MON+VM)) e T3 (Propionato de Laidlomicina (LP)).

O delineamento foi caracterizado como blocos casualizados, com 8 repetições por tratamento, sendo 4 animais por baía, totalizando 24 baias experimentais cobertas (5x6 m), com piso de concreto e um bebedouro tipo concha por baía.



Figura1: Instalações do confinamento experimental da FMVZ/UNESP-Botucatu onde ocorreu o experimento

2.3.2. Dieta e ingredientes

A dieta foi formulada segundo o software RLM 3.2 (Rações de Lucro Máximo) e os animais foram alimentados duas vezes ao dia (10h:00 e 16h:00), com água *ad libitum*, sendo 50% do fornecido total em cada horário de trato, com uma dieta composta por bagaço de cana, caroço de algodão, farelo de soja, milho moído e núcleo mineral.

Os aditivos utilizados estavam contidos no núcleo mineral nas devidas proporções: MON (715mg), MON+VM (715 mg + 429 mg) e LP (343 mg) ou MON (25 ppm), MON+VM (25+15ppm) e LP

(12 ppm); semanalmente, era realizada a produção da pré mistura (milho + núcleo) na fábrica de ração da FMVZ-UNESP. A peneira utilizada pra processamento do milho foi a de 3mm em um moinho do tipo faca.

O protocolo de adaptação utilizado foi o de escada (*step up*) por 24 dias, sendo 9 dias de uma dieta de adaptação, na proporção de 60:40 de concentrado: volumoso (C:V) e 3 dietas por 5 dias cada (STEP 1, STEP 2 e STEP 3) onde a proporção de concentrado foi aumentada em média de 8% em cada dieta, até atingir a final (terminação) com uma proporção de 90:10 C:V (Tabela 1).

Tabela 1: Ingredientes e composição química das dietas experimentais de bovinos Nelore consumindo dietas de alto concentrado com diferentes aditivos durante o período de adaptação e terminação.

Itens	Períodos				
	Adaptação	Step 1	Step 2	Step 3	Terminação
Dias de alimentação	9	5	5	5	94
Ingredientes (% de MS)					
Milho moído	37,24	44,76	52,63	60,50	66,59
Farelo de Soja	12,00	9,74	9,00	7,94	7,93
Caroço de Algodão	9,00	10,00	10,50	11,00	12,00
Bagaço de cana <i>in natura</i>	8,26	8,76	8,76	9,00	9,74
Feno de Cynodon médio	30,00	23,24	15,61	8,06	-
Núcleo Mineral	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Cloreto de potássio	-	-	-	-	0,24
Conteúdo Nutricional (% de MS)					
PB	14,44	13,85	13,82	13,65	13,89
FDN	39,54	35,94	31,36	26,96	22,69
FDNfe	31,33	27,21	22,05	17,11	12,29
NDT	68,40	70,88	73,85	76,68	79,15
Elm	1,68	1,76	1,85	1,94	2,01
Elg	1,07	1,13	1,22	1,3	1,35

PB: Proteína Bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDNfe: Fibra em detergente neutro fisicamente efetiva; NDT: Nutrientes digestíveis totais.

O fornecimento da dieta foi estabelecido pela exigência do animal baseados nos NRC em

função da porcentagem do peso vivo, iniciando com 1,8% e o ajuste do fornecido diário e CMS foram feitos baseados nas pesagens das sobras do dia subsequente, no qual foi realizado às 6h da manhã, antes do primeiro trato dos animais.

Pra avaliação do peso vivo final (PVF), foi dado o jejum de sólidos de 16 horas para a realização da pesagem e nas pesagens intermediárias (realizadas nos dias das coletas de sangue), não foi considerado o jejum, sendo descontado 4% do peso vivo (Stock et al, 1983).

O ganho de peso diário (GPD) foi determinado pela diferença entre o PVF e o peso vivo inicial (PVI) dividido pelo número de dias do período. A eficiência alimentar, através do GPD dividido pelo CMS. No abate, o peso de carcaça quente (PQC) foi mensurado e utilizado para cálculo do rendimento (REND, %), dividindo-se o peso da carcaça (soma das duas meias carcaças resultantes do abate) pelo peso vivo do animal e multiplicando-se o resultado por 100, para expressar em porcentagem. O Ganho em carcaça foi contabilizado por meio do PCQ final – PCQ inicial (considerando 50% de rendimento inicial) / dias de confinamento.

Os dados referentes a flutuação de consumo (%) se basearam na equação de Bevans et al. (2005) que propõe a subtração do CMS do dia pelo CMS do dia anterior dividido pelo CMS do dia anterior multiplicado por 100, sendo este valor calculado em módulo, apresentando sempre valores positivos.

As análises de amostra das dietas e sobras foram realizadas de acordo com a AOAC (2005) para determinar matéria seca (MS), (método 976.05), proteína bruta (método 97605) (PB), extrato etéreo (EE) (método 920.39), cinzas (MM) (método 942.05) e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) seguindo a metodologia de Van Soest, (1991) no Laboratório de Nutrição Animal da FMVZ-UNESP.

2.3.3. Comportamento ingestivo

Os animais foram submetidos à observação visual nos dias 24, 66 e 117 do período experimental, para avaliação do comportamento ingestivo, sendo observados a cada cinco minutos durante um período de 24 horas. Durante as observações, foram coletados dados para determinação do tempo despendido em alimentação, ruminação e ócio, expressos em minutos, conforme descrito por Johnson e Combs (1991). Em cada período de observação foram coletadas amostras das rações fornecidas e das sobras, para posterior análise de MS (Silva e

Queiroz, 2002) e FDN (adaptado de Van Soest, 1994) para determinar a eficiência de alimentação da MS; eficiência de alimentação da FDN; eficiência de ruminação da MS; eficiência de ruminação da FDN; tempo de alimentação por refeição e ingestão de MS por refeição, de acordo com as equações descritas por Carvalho et al. (2006) e representadas abaixo:

$$EALMS = TAL/CMS$$

$$EALFDN = TAL/IFDN$$

Em que: EALMS = Eficiência de alimentação da matéria seca (min/kg de massa seca); TAL = tempo despendido em alimentação (min); CMS = Consumo de matéria seca no dia da observação (kg); EALFDN= Eficiência de alimentação da FDN (min/kg da FDN); IFDN = Ingestão de FDN no dia da observação (kg).

$$ERUMS = TR/CMS$$

$$ERUFDN = TR/IFDN$$

Em que: ERUMS = Eficiência de ruminação da matéria (min/kg de matéria seca); TR = Tempo despendido em ruminação (min); CMS = Consumo de matéria seca no dia da observação (kg); ERUFDN= Eficiência de ruminação da FDN (min/kg de FDN); IFDN = Ingestão de FDN no dia da observação (kg).

$$TALREF = TAL/REF$$

$$IMSREF = CMS/REF$$

Em que: TALREF = Tempo de alimentação despendido em cada refeição (min); TAL = Tempo despendido em alimentação (min); REF = Número de refeições por dia; IMSREF = Ingestão de matériaseca por refeição (kg); CMS = Consumo de matéria seca no dia da observação (kg).

2.3.3.1 Avaliação do Índice de Seleção de Ingredientes

Foi realizada por meio da coleta de amostras das dietas e das sobras das baias nos dias das observações comportamentais, a análise de distribuição do tamanho das partículas para então determinar um índice de seleção usando-se o *Penn State Particle Separator (PSPS)* (Nasco,

Fort Atkinson, WI, EUA), como descrito por Heinrichs (1996).

O índice de seleção foi calculado para cada porção retida em cada peneira, individualmente, por meio da equação:

$$\text{Índice de seleção} = \text{Ingestão atual} / \text{Ingestão esperada}$$

$$\text{Ingestão atual} = \text{QRO} * \text{DTPDT} - (\text{QS} * \text{DTPS})$$

Em que: QRO = Quantidade de ração oferecida (kg); DTPDT = Distribuição do tamanho de partículas da dieta total (%); QS = Quantidade de sobras (kg); DTPS = Distribuição do tamanho de partículas das sobras (%).

$$\text{Ingestão esperada} = \text{DTPDT} * \text{IAMN}$$

Em que: DTPDT = Distribuição do tamanho de partícula da dieta total (base na matéria natural), (%); IAMN = Ingestão atual de matéria natural (kg).

Os índices de seleção foram definidos de acordo com a metodologia de Leonardi e Armentano (2003) onde valor 1, indica que não houve seleção, menor que 1, que houve seleção contra a peneira e maior que 1 à favor da peneira.

2.3.3.2. Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA) e de cluster foi realizada utilizando as variáveis de comportamento ingestivo pelo software estatístico R (pacote FactoMiner (Husson et al., 2017) e pacote factoextra (Kassambra e Mundt, 2017, versão 3.3.3)).

Os biplots gerados na PCA foram interpretados visualizando quadrantes inversamente correlacionados [vetores (linhas) em direções opostas].

Correlações positivas entre as variáveis são representadas por linhas com ângulos próximos a 0°, e variáveis negativamente correlacionadas são representadas por linhas com ângulos próximos a 180°. Ângulos de 90° entre as linhas representam variáveis não

correlacionadas.

Quanto maior o tamanho das linhas, maior é a variação nos dados, e quanto mais próximas as setas, maior é a relação entre elas. Os dados foram padronizados dividindo-se a diferença entre cada ponto de dados e a média aritmética da variável de interesse pelo desvio padrão da variável para que os resultados não fossem influenciados pela magnitude das unidades da variável.

2.3.4. Perfil metabólico do sangue

Foram coletadas amostras de sangue da veia jugular de três animais por baia nos dias 25, 67 e 118 do período experimental para análise de Albumina, Glicose, Lactato total, Potássio e Proteínas totais, a ser realizado no laboratório de bioquímica da unidade de pesquisa experimental (UNIPLEX) da faculdade de medicina de Botucatu (FMB).

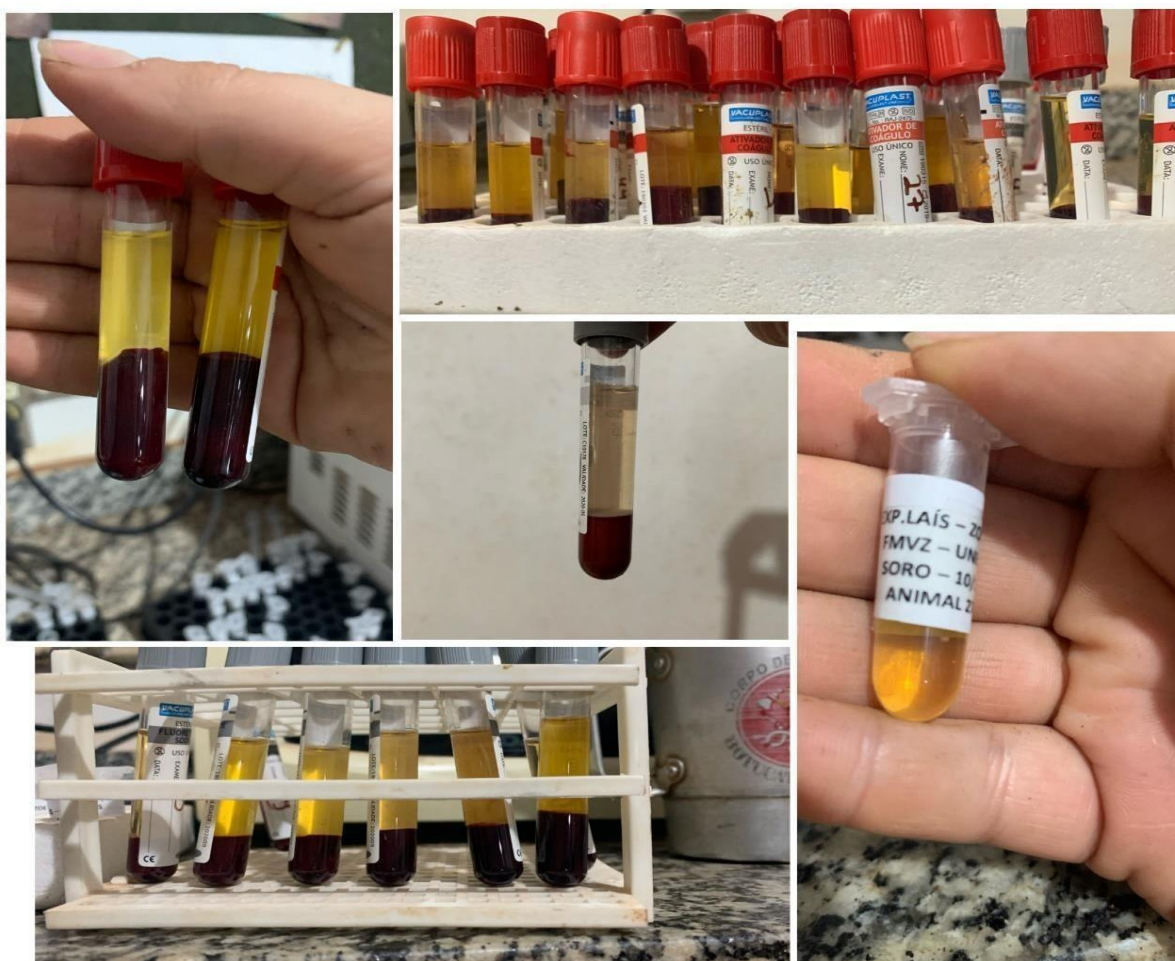


Figura 2. Amostras de sangue após centrifugação para coleta de soro e plasma bovino.

2.3.5 Histomorfometria do epitélio ruminal

Fragmentos de epitélio ruminal foram coletados para determinação de morfologia e histologia, de papilas ruminais

Após o abate, houve a remoção do excesso de tecido conjuntivo circundante e os compartimentos foram abertos, esvaziados e lavados em água corrente. Um fragmento para a morfologia de aproximadamente 1 cm² foi coletado da região do saco cranial do rúmen. Essas amostras foram imediatamente colocadas em frascos contendo solução de álcool a 70%. As amostras foram refrigeradas até a realização das mensurações macroscópicas da parede ruminal.

As variáveis morfológicas macroscópicas avaliadas foram: número médio de papilas por cm² de parede (NMP), área média das papilas (AMP), área total de superfície absorptiva por cm² de parede (ASA) e representatividade das papilas ruminais na área total de superfície absorptiva (RPSA). O NMP em todo fragmento foi mensurado por três avaliadores e o dado final foi o valor médio das três contagens. AMP foi mensurada através de imagens digitalizadas das papilas por meio do programa de análise de imagens UTHSCSA Image Tool (Resende júnior et al., 2006).

Em cada fragmento foram analisadas a área média de doze papilas seccionadas aleatoriamente da base. O dado final para AMP foi a média das doze papilas. A ASA foi calculada pela seguinte fórmula: $1 + (NMP * AMP) - (NMP * 0,002)$, aonde o número 1 representa o fragmento de 1 cm² coletado, e o 0,002 é a área basal estimada de cada papila ruminal (Daniel et al, 2006). A RPSA foi calculada segundo a equação $(NMP * AMP / ASA) * 100$.

Para avaliação histológica das papilas, fragmentos de parede do saco ventral do rúmen foram coletados para confecção de lâminas que foram produzidas por meio da desidratação das mesmas e por fim, confeccionados os blocos.

Foram realizados cortes do material no micrótomo em secções de 5µm, desparafinizados com xilol hidratados em concentrações decrescentes de álcoois, corados em Hematoxilina de Harris e Eosina, desidratados em concentrações crescentes de álcoois, clarificados com xilol e por fim selados. As mensurações foram realizadas em 10% do número médio de papilas, utilizando-se o Analisador de Imagens Leica Qwin, contido no microscópio eletrônico de luz Leica.

As imagens foram captadas por lentes objetivas em aumentos de 5x e 10x e digitalizadas

por câmara para as análises de: altura, largura, área das papilas ruminais e mensurações da espessura da camada de queratina no epitélio, de acordo com Costa et al. (2008).



Figura 3: Amostra de papilas ruminais armazenadas, separadas e prontas para serem escaneadas para realização da análise morfométrica

2.3.6. Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, tendo o peso como fator de blocagem, a baía como unidade experimental e as fases de adaptação e terminação, que quando analisadas separadamente, foram incluídas como efeito fixo, de acordo com o modelo abaixo. Os dados parciais foram analisados utilizando-se o PROC MIXED do SAS, versão 9.4. As médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey, considerando $P \leq 0,05$ para obter diferença estatística e $P < 0,1$ para tendência.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + e_{ijk};$$

Em que: Y_{ijk} = observação relativa; μ = média geral; T_i = efeito tratamento, sendo i (MON, MONVM, LP); B_j = efeito de bloco; e_{ijk} = erro experimental.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + F_{ij} + e_{ijk};$$

Em que: Y_{ijk} = observação relativa; μ = média geral; T_i = efeito tratamento, sendo i (MON, MONVM, LP); B_j = efeito de bloco; F_{ij} (Fase de adaptação e terminação) + e_{ijk} = erro experimental.

Foi realizada uma análise de medida repetida no tempo para a variável de CMS, considerando os dias de adaptação como o fator longitudinal, a fim de avaliar a padrão de consumo entre os tratamentos e suas interações. Além disso, um gráfico de regressão não linear foi realizado entre o consumo de matéria seca diário pelos dias de adaptação para estimar o tempo de estabilização do consumo por meio do programa R.

2.4 Resultados

2.4.1. Desempenho Produtivo

O consumo de matéria seca dos animais não foi diferente durante todo o período experimental; porém, durante o período de adaptação, animais tratados com lisdomicina apresentaram maior consumo ($P < 0,01$) em relação aos demais tratamentos (Figura 4).

Foram estimados os valores de flutuação de CMS (Figura 5) assim como a quantidade de sobra diária por animal e tratamento durante as fases de adaptação e terminação (tabela 2). Como as dietas eram diferentes entre os períodos, já era de se esperar um efeito de fase ($P < 0,01$), porém não foi possível evidenciar diferenças estatísticas entre fase e tratamento ($P > 0,05$).

Além disso, através do gráfico de *broken-line* (Figura 6) foi possível identificar que a LP colaborou para uma estabilização de consumo mais rápida, reportando nove dias para atingir um platô, por outro lado, para MON e MON+VM, o CMS foi estabilizado com aproximadamente 11 dias. Ao final de 118 dias de período experimental, não houve efeito dos tratamentos sobre o desempenho produtivo (Tabela 3).

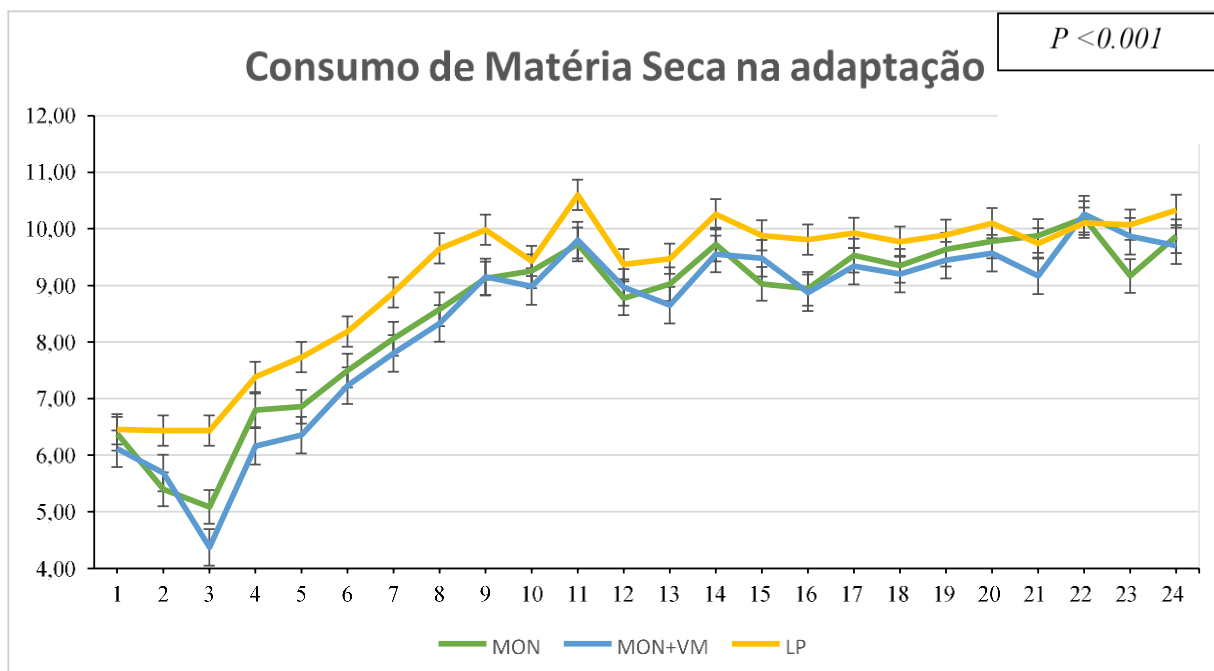


Figura 4: Consumo de matéria seca (kg/dia) durante a adaptação de bovinos Nelore suplementados com monensina e/ou Virginiamicina e Propionato de Laidlomocina

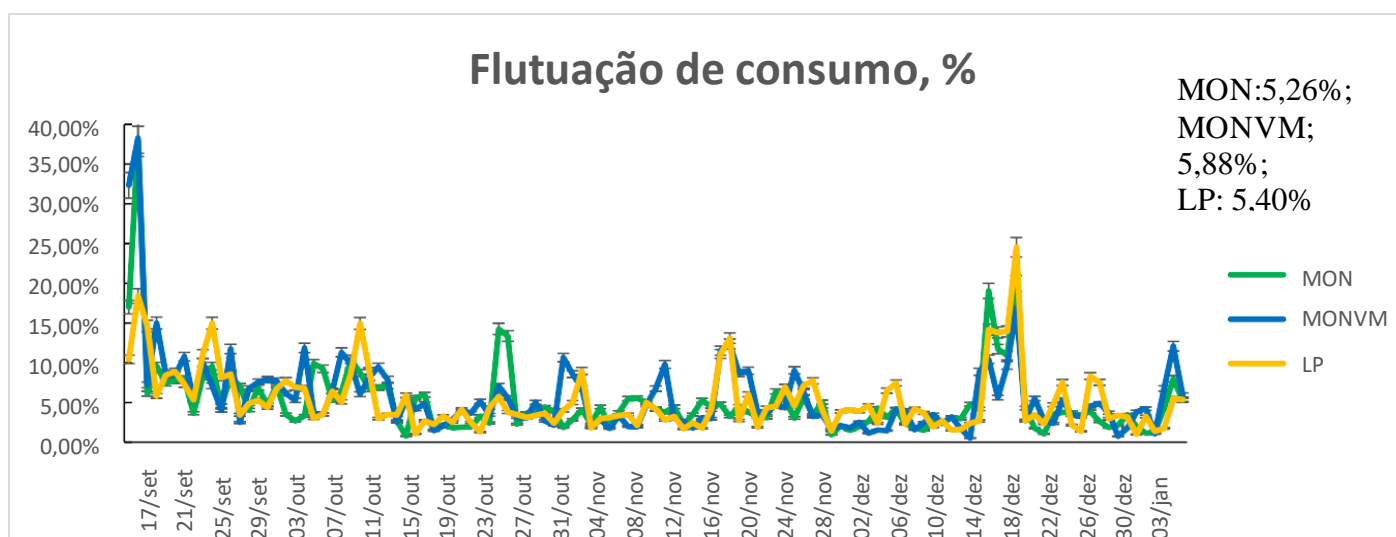


Figura 5: Flutuação do consumo de matéria seca em %, de bovinos Nelore suplementados com Monensina e/ou Virginiamicina e Propionato de Laidlomocina.

Tabela 2: Consumo de matéria seca (kg/dia), Flutuação de consumo (%) e quantidade de sobra de bovinos Nelore confinados consumindo dietas com diferentes aditivos.

Item	----- Adaptação -----			----- Terminação -----			EPM ⁴	----- Valor de P -----		
	MON ¹	MON+VM ²	LP ³	MON ¹	MON+VM ²	LP ³		Trat ⁵	Fase	T x F ⁶
Consumo de Matéria seca, kg	8,61	8,46	9,14	10,12	10,24	10,40	0,432	0,076	<0,01	0,475
Flutuação de CMS, %	8,62	10,33	8,22	4,37	4,73	4,64	0,005	0,083	< 0,01	0,173
Quantidade de sobra, kg	0,64	0,73	0,65	0,42	0,44	0,49	0,038	0,305	<0,01	0,292

¹Monensina; ²Monensina+ Virginiamicina; ³Propionato de lisdomicina, ⁴Erro Padrão Médio, ⁵Tratamento; ⁶interação tratamento x fase (adaptação x terminação)

Tabela 3: Desempenho produtivo de bovinos Nelore confinados consumindo dietas altamente energéticas compostas por diferentes aditivos

Item	Tratamentos				Valor de P
	MON ¹	MON+VM ²	LP ³	EPM ⁴	
Peso vivo inicial, kg	333,00	332,68	333,05	2,513	0,693
Peso vivo final, kg	534,37	536,89	535,58	5,249	0,959
Consumo de matéria seca kg/d	9,79	9,86	10,14	0,359	0,434
Flutuação de matéria seca, %	5,26	5,88	5,40	0,004	0,397
Quantidade de sobras, kg	1,86	2,02	2,11	0,080	0,179
Ganho de peso diário, kg/d	1,73	1,75	1,74	0,031	0,959
Eficiência alimentar, kg/kg	0,17	0,17	0,17	0,001	0,371
Rendimento de carcaça, %	54,74	55,25	55,34	0,194	0,431
Peso de carcaça quente, kg	292,58	296,33	296,56	2,957	0,964
Ganho de carcaça, kg	1,068	1,097	1,102	0,0549	0,939
Rendimento do ganho, %	61,72	63,29	63,17	0,0879	0,3847

¹Monensina; ²Monensina+Virginiamicina; ³Propionato de laidlomocina, ⁴Erro Padrão Médio, ⁵Tratamento; ⁶interação tratamento x fase (adaptação x terminação)

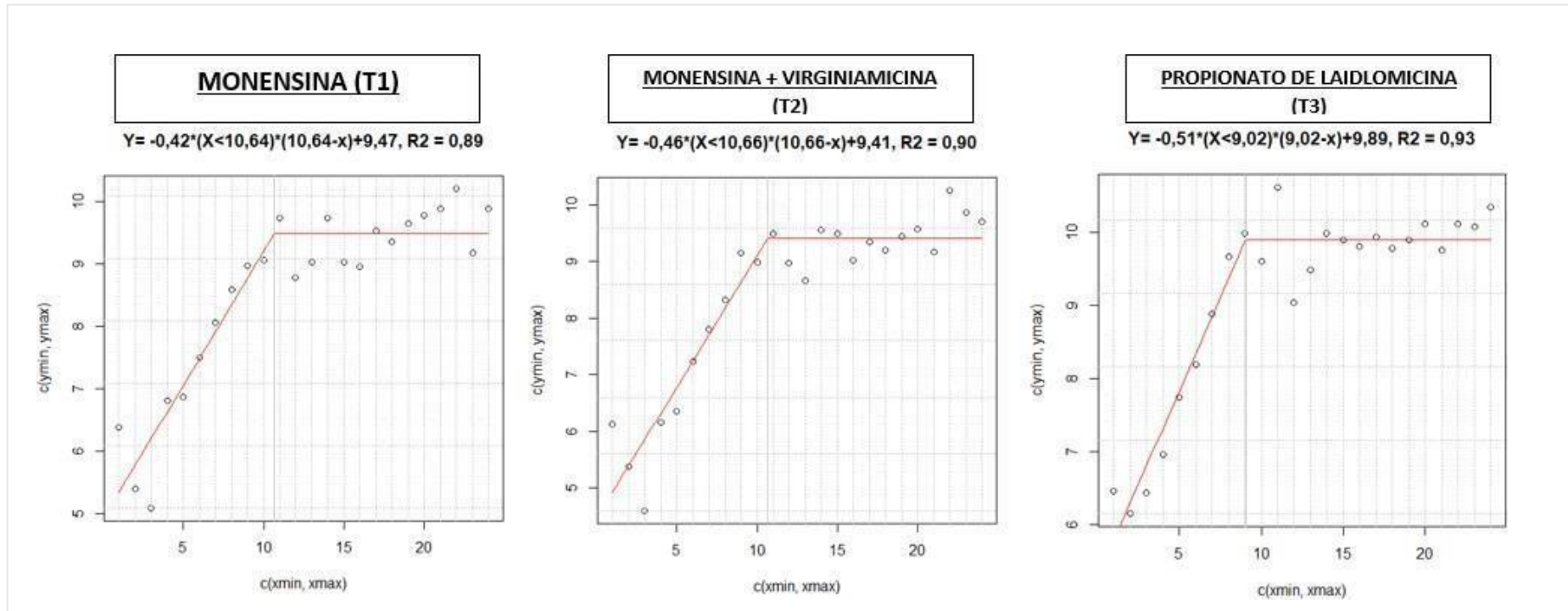


Figura 6: Representação da estabilização de CMS dos animais de cada tratamento durante o período de adaptação através do gráfico de Broken-line.

2.4.2. Comportamento ingestivo

As observações comportamentais foram realizadas durante o período de adaptação (fase 1) e de terminação (fase 2). O CMS descrito se refere ao consumo nos dias das avaliações, onde os animais que consumiram LP apresentaram um CMS mais elevado durante a terminação, sem diferir dos animais do tratamento que continha MON+VM, mas superior em relação aos animais MON. Estes animais que consumiram a MON apresentaram um consumo similar em relação aos animais que consumiram LP na adaptação, que também foi mais elevado em relação aos outros tratamentos neste período.

O tempo despendido em ruminção (min/d) reportou efeito de interação ($P=0,035$), onde os bovinos passaram mais tempo ruminando na adaptação do que na terminação, fato este que está atrelado ao maior consumo de FDN na fase 1 ($P=0,019$). Em relação aos tratamentos, foi evidenciado que animais LP, tanto na adaptação quanto na terminação, apresentaram uma ingestão mais elevada de FDN em comparação a MON e MON+VM (2,79; 2,66 e 2,61 kg e 2,45; 2,35 e 2,42 respectivamente), o que ocasionou uma menor eficiência de ruminção desta porção fibrosa na fase de adaptação, porém, foi estabilizada em relação aos outros tratamentos durante a terminação ($P_{trxf}=0,001$).

Da mesma forma, uma menor eficiência de ruminção da MS foi reportada para os bovinos LP na adaptação, que não diferiu estatisticamente em relação a MON, mas foi inferior ao tratamento MON+VM ($P < 0,01$). Entretanto, na terminação, não foi possível reportar diferença estatística entre os tratamentos.

O maior consumo de FDN para a fase de adaptação pode ter contribuído para uma maior ingestão de matéria seca por refeição nos animais que consumiram LP em relação aos demais animais que consumiram os outros tratamentos ($P=0,008$) durante a adaptação, já no período de terminação, a diferença numérica entre os valores dessa variável foi diminuída, indicando que a MON foi o aditivo que mais influenciou nesse aumento do tempo de ingestão por refeição.

A monensina foi o único aditivo que influenciou no número de idas ao cocho ($P=0,002$), pois apresentou o maior número de vezes em relação aos outros tratamentos na adaptação, (13,44; 11,30 e 11,33 para MON, MON+VM e LP, respectivamente) em contrapartida, apresentaram o menor número de vezes na terminação (10,76; 11,51 e 11,25, respectivamente para MON, MON+VM e LP).

Uma tendência foi reportada nesta avaliação, onde os animais passaram mais tempo em ruminção na adaptação do que na terminação ($P=0,06$); Todos os dados de comportamento ingestivo

podem ser visualizados na tabela 4.

Em relação a seletividade de partículas, foi apresentada uma tendência ($P=0,096$) na bandeja de 4,0 mm, onde na fase de terminação, animais MON e LP na terminação, selecionaram contra a peneira, do que animais LP na fase de adaptação (tabela 4).

Com as análises de comportamento na fase 1 e comportamento com as variáveis de desempenho na terminação, elaborou-se uma análise componentes principais que resultou nos gráficos dispostos na figura 4. O gráfico na adaptação conseguiu explicar 50,6% na adaptação e 53,4% na terminação.

Tabela 4: Comportamento ingestivo e seletividade de partículas de bovinos Nelore confinados consumindo dieta com Monensina e/ou combinada com Virginimamicina e Propionato de Laidlomocina

	Adaptação			Terminação			EPM ⁴	Valores de <i>P</i>		
	MON ¹	MON+VM ²	LP ³	MON ¹	MON+VM ²	LP ³		Trat ⁵	Fase	TrxF ⁶
<u>Comportamento alimentar</u>										
Consumo de matéria seca, kg/dia	9,89 ^c	9,71 ^c	10,37 ^b	10,35 ^b	10,67 ^{ab}	10,80 ^a	0,302	0,001	<.0001	0,042
Tempo em Ócio, min/dia	901,41 ^a	878,67 ^a	901,01 ^a	1081,64 ^b	1064,58 ^b	1053,33 ^b	10,137	0,305	<.0001	0,069
Tempo de Alimentação, min/dia	176,55	173,50	174,67	130,230	135,750	136,75	5,102	0,857	<.0001	0,263
Tempo de Ruminação, min/dia	344,78 ^a	374,50 ^a	349,00 ^a	213,52 ^b	223,25 ^b	237,08 ^b	10,229	0,256	<.0001	0,035
Idas ao cocho, média	13,44 ^a	11,30 ^{ab}	11,33 ^{ab}	10,76 ^b	11,51 ^{ab}	11,25 ^{ab}	0,795	0,466	0,178	0,002
Idas ao bebedouro, média	4,29	5,20	3,88	3,98	4,21	3,60	0,379	0,165	0,018	0,403
Ingestão de Massa seca por Refeição, kg	0,78 ^c	0,89 ^{bc}	0,94 ^{abc}	1,06 ^a	1,00 ^{ab}	1,02 ^{ab}	0,050	0,392	<.0001	0,008
Consumo de FDN ⁷ , kg	2,66 ^b	2,61 ^b	2,79 ^a	2,35 ^d	2,42 ^{cd}	2,45 ^c	0,075	0,005	<.0001	0,019
Tempo Médio por Refeição, min/dia min/kg	13,84	15,29	16,42	16,53	16,65	16,91	0,961	0,164	0,007	0,157
Ef. ⁸ Ruminação de MS ⁹ , min/kg	35,03 ^{ab}	38,80 ^a	33,92 ^b	20,68 ^c	20,87 ^c	21,89 ^c	0,989	0,204	<.0001	0,010
Ef. Ruminação de FDN, min/kg	129,72 ^{ab}	143,17 ^a	125,83 ^b	91,11 ^c	91,95 ^c	97,15 ^c	3,913	0,264	<.0001	0,001
Ef. Alimentação de FDN, min/kg	66,16	66,28	62,87	55,58	56,26	55,89	3,037	0,691	<.0001	0,550
Ef. Alimentação de MS, min/kg	17,83	17,28	16,95	12,61	12,70	12,72	0,692	0,914	<.0001	0,478

<i>Seletividade de Partículas¹⁰</i>										
Longa (19 mm)	1,01	1,02	1,02	1,03	1,02	1,01	0,007	0,912	0,431	0,249
Média (8 mm)	1,02	1,02	1,03	1,04	1,01	1,01	0,007	0,291	0,442	0,447
Finas (4 mm)	0,99 ^{ab}	0,99 ^{ab}	1,02 ^b	0,95 ^a	0,99 ^{ab}	0,98 ^a	0,008	0,013	0,001	0,096
Fundo	0,99	1,00	0,98	0,98	1,00	0,99	0,005	0,009	0,122	0,100

Monensina; ²Monensina+Virginiamicina; ³Propionato de Laidlomocina; ⁴Erro Padrão da Média; ⁵Tratamento; ⁶Interação Tratamento x Fase; ⁷Fibra em detergente Neutro; ⁸Eficiência; ⁹Matéria Seca, ¹⁰ Índice de seletividade =1: Não houve seleção, <1 = seleção contra a peneira, >1 = seleção a favor d

2.4.3. Saúde Ruminal

As mensurações histológicas avaliadas podem ser visualizadas na figura 5, que representa as medições referentes à altura (a), largura (l) e espessura de queratina (e), expressas em cm., como também ilustra como é realizada a mensuração de área das papilas (cm^2).

Com relação às características histológicas do epitélio ruminal dos animais, não houve efeito dos tratamentos para altura das papilas ($P=0,9568$) e área de papila ($P=0,5733$) (Tabela 5). Entretanto, a combinação de MON+VM aumentou a largura de papilas em relação ao tratamento com MON ($P=0,029$), porém não diferiu do tratamento LP. Em relação a espessura de queratina, o tratamento LP e a combinação de MON+VM apresentaram valores superiores em relação a MON ($P < 0,001$).

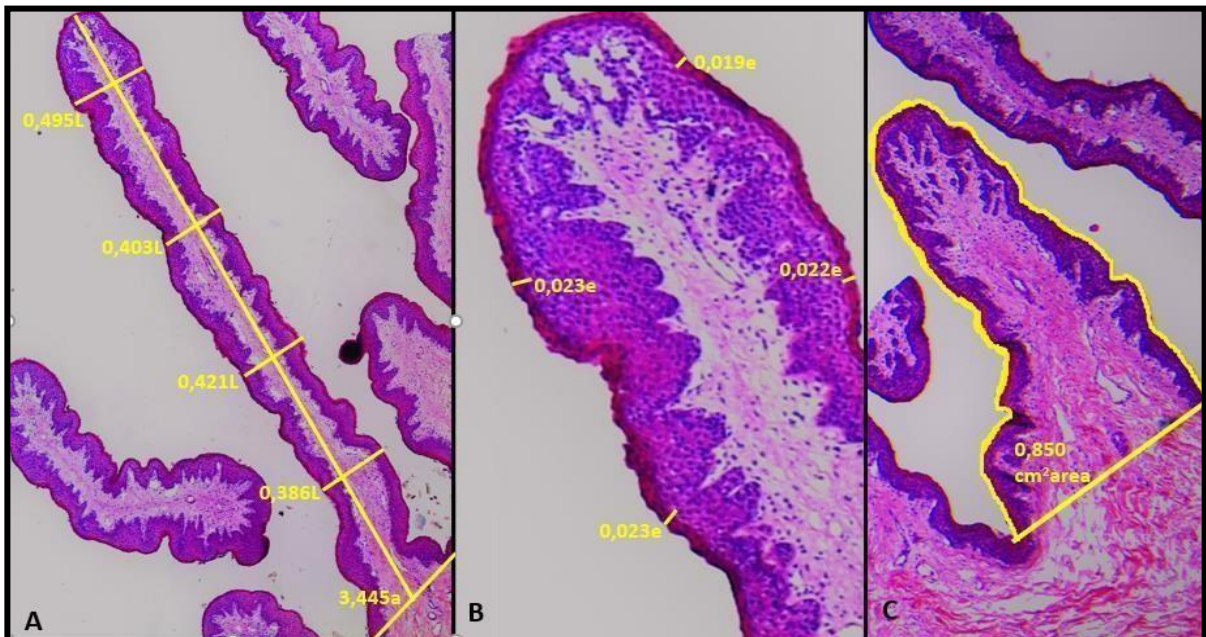


Figura 7: Representações das mensurações de altura (a) e largura (l), na imagem A, espessura de queratina (e) na imagem B, ambas expressas em cm. e área de papilas ruminais, na imagem C, expressas em cm^2 , de bovinos Nelore

Com relação à morfologia do epitélio ruminal, não foram constatados efeitos dos tratamentos ($P > 0,10$) para nenhuma das variáveis avaliadas (número médio de papilas, área média de papila, superfície absorviva e área da papila em % da superfície absorviva) (Tabela 6).

Tabela 5: Morfometria de papilas ruminais de bovinos Nelore alimentados com diferentes fontes de ionóforos em confinamento.

Itens	Tratamentos			EPM	Valor de P
	MON	MON+VM	LP		
<i>Morfologia de papila</i>					
Área média de papilas, cm ²	0,347	0,383	0,341	0,0202	0,2855
Número médio de papilas, n	61,303	62,232	58,181	2,5135	0,4454
Área de Superfície Absortiva, cm ²	22,687	22,732	20,968	1,3126	0,4823
Representatividade das papilas na área absortiva, %	96,226	95,965	95,447	0,2379	0,1096
<i>Histologia Ruminal</i>					
Altura de Papila, cm	2,648	2,609	2,598	0,127	0,956
Largura de papilas, cm	0,446 ^b	0,504 ^a	0,495 ^{ab}	0,017	0,029
Área de papila, cm ²	1,114	1,228	1,179	0,075	0,573
Espessura de queratina, cm	0,019 ^b	0,021 ^a	0,022 ^a	0,001	0,001

¹Monensina; ²Monensina+Virginiamicina; ³Propionato de Laidlomocina; ⁴Erro Padrão da Média;

2.4.4. Parâmetros Sanguíneos

No que se refere ao perfil metabólico sanguíneo dos animais, não foram observados nenhum efeitos significativos dos tratamentos para as variáveis analisadas durante o período experimental (Tabela 6).

Tabela 6: Parâmetros sanguíneos de bovinos Nelore alimentados com diferentes fontes de ionóforos em confinamento

Itens (mg/dl)	Tratamentos			EPM ⁴	Valor de P
	MON ¹	MON+VM ²	LP ³		
Glicose	91,72	88,03	88,62	2,002	0,297
Proteínas totais	6,18	6,37	6,34	0,075	0,154
Lactato	20,70	19,31	18,96	1,320	0,586
Albumina	3,28	3,23	3,24	0,039	0,645
Potássio	4,79	4,78	4,90	0,051	0,211

¹Monensina, ²Monensina+Virginiamicina, ³Propionato de Laidlomocina; ⁴Erro padrão médio

2.5 Discussão

A suplementação com os ionóforos monensina sódica, propionato de laidlomocina e a combinação de monensina com virginiamicina para bovinos Nelore terminados em confinamento recebendo dietas com alto teor de concentrado apresentaram resultados similares, não sendo possível evidenciar diferenças estatísticas em relação as variáveis de desempenho produtivo: ($P>0,05$).Esses dados estão de acordo com a literatura revisada dos trabalhos de Gibb et al., (2001); Meyer et al., (2009); Montgomery et al., (2009) e Gomes et al., (2001), onde foi mostrado que ionóforos apresentam resultados equivalentes para bovinos Nelore terminados em confinamento.

De acordo com o levantamento de Silvestre e Millen (2021), o nível de concentrado nas dietas de terminação em confinamentos brasileiros se encontra na faixa de 81 a 90% da MS, sendo imprescindível um programa de adaptação adequado para preparar o ambiente ruminal à receber toda essa carga energética sem ocasionar distúrbios nutricionais e prejuízos no sistema de produção.

O período de adaptação transiciona uma dieta com maior proporção de forragem para uma rica em grãos altamente fermentescíveis, o que propiciará uma maior disponibilidade de glicose, aumentando a produção de AGCC, diminuindo o pH ruminal e alterando boa parte da população de microrganismos, afetando os padrões de motilidade, taxa de passagem, digestibilidade e velocidade de absorção de nutrientes (Berchielli et al., 2006).

Uma transição abrupta ou inadequada pode levar a quadros de desordens metabólicas que comprometem o desempenho e resultam em significativas perdas econômicas (Owens et al., 1998). Além disso, seria interessante que esse período de adaptação não ultrapassasse 20% do tempo total de alimentação, pois isso pode impactar negativamente a produção, já que os animais ingeririam a dieta final por um menor intervalo de tempo ou permaneceriam mais tempo confinados para atingir o peso final almejado.

Sendo assim, uma adaptação correta em confinamento por períodos menores pode ser mais eficiente e isso pode ser observado através do consumo de matéria seca. No presente estudo, animais LP apresentaram um maior CMS durante a adaptação o que provavelmente possibilitou uma adaptação segura e mais rápida, visto que, de acordo com os gráficos de *Broken-line*, os bovinos deste tratamento estabilizaram o consumo no nono dia de adaptação, já os animais suplementados com MON ou MON+VM, a estabilização aconteceu a partir do décimo primeiro dia do período experimental. Isso mostra que a utilização de LP pode

contribuir para a redução do período de adaptação e conseqüentemente da permanência dos animais no confinamento, acarretando em uma redução de custos ao sistema de produção.

Mesmo com um CMS superior na adaptação, animais LP tendenciaram a apresentar uma menor flutuação de CMS ($P = 0,083$), se diferenciando dos animais consumindo MONVM cerca de 20,42%. De modo geral, os valores estão dentro do aceitável, não indicando problemas de acidose, que seriam preocupantes com um índice acima de 10% (Schwartzkopf-Genswein et al., 2004). Possivelmente, uma menor flutuação de consumo pode ter contribuído para um melhor ambiente ruminal, culminando em um maior CMS.

A presença de duas fontes de volumosos na adaptação fez com que os animais despendessem mais tempo ruminando conseqüentemente promovessem um menor tempo em ócio e apresentassem um menor CMS, certamente pelo maior consumo de FDN. Mesmo assim, animais LP mantiveram uma ingestão mais elevada em ambas as fases, fato este que pode ser explicado pela menor flutuação de consumo, que provavelmente tenha promovido um pH mais controlado, mantendo populações de bactérias celulolíticas ativas no meio, aumentando digestibilidade da fibra e acelerando a taxa de passagem do conteúdo ruminal. Sabe-se que os carboidratos estruturais, como a fibra, são degradados principalmente por grupos de bactérias celulolíticas e hemicelulolíticas (Cunningham e Klein 2008).

O maior CMS para LP, sem afetar o tempo de ruminação ($P_{trat} > 0,1$), refletiu em uma melhor eficiência de ruminação da MS e da FDN, ($P = 0,010$ e $< 0,01$, respectivamente), ao contrário de animais MONVM, que apresentaram menor eficiência nesses parâmetros, corroborando com os dados de Rigueiro et al., (2016) que mostrou bovinos Nelore confinados que receberam MONVM menos eficientes na alimentação e ruminação de FDN e MS durante todo o período experimental em relação a bovinos que receberam dietas contendo estes mesmos aditivos separadamente.

Ademais, pela análise de componentes principais, nós podemos concluir que durante a adaptação, o tempo de ruminação foi negativamente correlacionado com o tempo de alimentação e positivamente correlacionado com a eficiência de ruminação da MS e FDN (Figura 4, $P < 0,01$).

Provavelmente o maior consumo de FDN influenciou a taxa de passagem do conteúdo ruminal e contribuiu para melhorar a eficiência de ruminação da MS e FDN nos animais LP. Além disso, Allen e Harrison (1979) indicam que em dieta com maior quantidade de volumoso, a MON pode causar diminuição na taxa de *turnover* de sólidos e líquidos aumentando assim, o

enchimento ruminal e Deswysen et al. (1987) afirmaram que a diminuição do *turnover* é causada pela diminuição da motilidade, dessa forma, quando mais tempo o substrato permanece no rúmen, menor é a eficiência de ruminação, que foi demonstrado no tratamento MON e MONVM durante a adaptação

Além disso, os dados de seletividade da dieta concluíram que a LP na adaptação realmente teve preferência por partículas mais grosseiras, justificado pelo índice de seleção na peneira de 4mm, apresentando um valor >1 , ou seja, selecionou a favor de partículas maiores de 4mm, contrariando os outros tratamentos que reportaram um índice de seleção menor que 1, preferindo partículas menores.

Entretanto, esse efeito não permaneceu na terminação, pois mesmo que MON tenha permanecido na sua preferência por partículas mais finas, animais LP também apresentaram índice <1 . Talvez esse feito tenha contribuído para que a eficiência de ruminação da MS e FDN não apresentasse diferença estatística na terminação.

A preferência por partículas mais finas faz com que o preenchimento ruminal seja reduzido e dessa forma, possibilite o animal de aumentar o CMS por refeição, que foi perceptível nos bovinos durante a terminação; mais especificamente, o tratamento MON refletiu em um maior CMS por refeição, fazendo com que os animais visitassem o cocho em uma menor frequência

As informações trazidas pelas análises de componentes principais reforçam tal ideia, onde o CMS por refeição durante o período de terminação, foi positivamente correlacionado com a granulometria de partículas mais finas e com o número de refeições por dia, o que realmente pode ter aumentado o tempo de retenção no rúmen, que influenciou negativamente a correlação com o CMS e consumo de FDN

Mariani (2010), encontrou dados similares, reportando que o tempo de refeição de bovinos que consumiram MON foi menor, devido ao aumento da retenção do alimento no rúmen; entretanto, apesar de um efeito numérico, não foi possível imprimir resultado significativo

Esperava-se que animais LP apresentassem maior número médio de papilas e maior superfície absorptiva que aqueles submetidos aos demais tratamentos, uma vez que foram os que apresentaram maior CMS durante a adaptação, entretanto, esse efeito de CMS não permaneceu durante todo o período experimental, contribuindo para também não encontrássemos efeitos significativos nos parâmetros morfológicos das papilas

Nos resultados do presente estudo, observou-se que animais LP e MON+VM apresentaram um maior crescimento papilar em largura, cm²e aumento da espessura de queratina, cm²(EQ) das mesmas em relação as papilas dos animais que consumiram MON. Vale lembrar que estas alterações epiteliais geralmente não são diagnosticadas como um problema até então, pois o epitélio ruminal é naturalmente paraqueratótico em dietas de alto concentrado em decorrência da maior proliferação celular ocasionada pela produção de AGCC (Smith, 2015).

Quanto maior a produção desses ácidos, maior será o estímulo as papilas em se desenvolver, aumentando assim, a área de superfície absorptiva, impedindo acúmulo de ácido indesejados que podem gerar lesões na parede do epitélio, favorecendo quadros de acidose (Banks, 1991).

Costa et al (2008a), conduziram um estudo para avaliar o efeito dos AGCC sobre a morfologia da mucosa ruminal de bezerros e constataram que o propionato foi o AGCC responsável pelo crescimento fisiológico das papilas metabolicamente ativas. Em outro estudo, Costa et al (2008b) analisaram o efeito do butirato, propionato e lactato sobre integridade dos tecidos epiteliais estratificados queratinizados de bezerros e concluíram que o butirato e lactato foram os maiores responsáveis pelas modificações patológicas no epitélio ruminal, propiciando um crescimento anormal das papilas, além de um efeito queratinizante.

Corroborando com os dados de Costa et al. (2008a), Thompson et al., (1958) e Nocek e Kesler(1980), concluíram que a fermentação dos concentrados fornece o butirato necessário para estimular o desenvolvimento das papilas e que esses alimentos podem promover a queratinização das mesmas em bezerros e cordeiros.

Avaliando o efeito da adição de MON e LP na fermentação ruminal *in vitro* utilizando dietas à base de milho, Domescik e Martin (1999) não observaram diferenças em relação a concentração de lactato, porém, foi reportada uma concentração mais elevada de butirato nas amostras suplementadas com LP, apresentando valores de 15,6 mm para uma dosagem de 2 ppm e 13,3 mm com inclusão de 5 ppm contra 8,5 mm para uma inclusão de MON à 5 ppm. Entretanto, a concentração de propionato foi superior nas amostras tratadas com MON em relação às que continham LP nas dosagens de 2 e 5 ppm (28,5 vs 22,5 e 25,2, respectivamente).

Em um estudo realizado por Zinn et al., (2000) avaliando a utilização de LP e MON em relação a resistência de bactérias em meio de cultivo com pH 5,7 e 6,7, a MON se mostrou como um ionóforo mais potente ($P < 0,05$) em relação a LP para inibir o desenvolvimento de bactérias

gram positivas, ou seja, no meio que continha LP, teve maior predominância desse microrganismo, que não são tão eficientes na produção de propionato e na retirada de lactato do rúmen, como as *gram*-negativas.

O fato do aumento da produção de AGCC, principalmente o propionato, estar relacionado a limitação química de consumo (Van soest, 1994), e que aparentemente o LP não otimiza a sua produção como a MON, podemos concluir que este pode ter sido o fator que contribuiu para que bovinos alimentados com LP apresentassem um consumo mais elevado, porém, sem afetar significativamente o desenvolvimento das papilas, embora propiciando uma menor circulação de lactato sanguíneo, apesar de ter sido observado apenas uma diferença numérica

O perfil metabólico em ruminantes pode ser usado para monitorar a adaptação metabólica, diagnosticar, prognosticar distúrbios fisiológicos e servir para avaliar a efetividade de um tratamento. Os níveis alterados de albumina e proteínas totais podem indicar sinais de desidratação, desnutrição e inflamações ocasionadas por fatores nutricionais. Além disso, a albumina e a glicose fornecem informações sobre o funcionamento hepático e incidências de desbalanço energético negativo pela concentração glicolítica (Payne e Payne, 1987).

Em relação ao lactato, seu aumento no rúmen pode exceder 300 mmol/L e resultar em alta concentração sanguínea de aproximadamente 25 mmol/l, o que pode também ser um indicativo de acidose metabólica sistema (Maruta e Ortolani, 2002a).

Silva (2014) avaliou o uso de MON, VM, MON+VM e óleos funcionais na dieta de bovinos confinados sem adaptação consumindo dieta com 92% de concentrado e não reportou diferenças entre os tratamentos aplicados, mostrando que os ionóforos são efetivos na prevenção de acidose metabólica.

Em uma dieta típica de terminação de bovinos em confinamento, a hidrólise destes carboidratos leva ao aumento da concentração de glicose ruminal, a qual normalmente é muito baixa, até o ponto em que esta excede a concentração de glicose sanguínea (Galyean e Rivera, 2003) causando um aumento da osmolaridade (quantidade de sólidos dissolvidos no fluido ruminal), da qual colabora como processo de acidificação ruminal por inibir a absorção de AGCC pelo rúmen (Owens et al., 1998) e então, possivelmente os animais entrariam em quadros acidóticos, com alteração nos metabólitos do sangue.

No entanto, todos os parâmetros estavam dentro da faixa aceitável indicando ausência de distúrbios metabólicos que comprometessem seu desempenho final.

2.6 Conclusão

Pode-se afirmar que o propionato de laidlomocina não limitou o consumo de matéria seca de bovinos confinados, apresentando resultados similares aos animais que consumiram Monensina e seu uso combinado com Virginiamicina. Todavia, o aditivo pode ser uma alternativa de uso em confinamento com dietas ricas em concentrado para bovinos Nelore

2.7 Referência

ABIEC (2023) Perfil da pecuária no Brasil. <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-01/>; <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-02/>

AL JASSIM, R. A. M.; GORDON, G. L. R.; ROWE, J. B. The effect of basal diet on lactate-producing bacteria and the susceptibility of sheep to lactic acidosis. **Journal of Animal Science**. v. 77, p. 459-469, 2003.

ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.7, p.1598-1624, 2000.

BANKS, W. Histologia **Veterinária Aplicada**. São Paulo: Editora Manole. p. 629, 1991.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, Alexandre Vaz; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. [S.l:s.n.], 2006.

BERGEN, W.G., BATES, D.B. 1984. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.*, 58:1465-1483.

BEVANS, D. W. et al. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 1116-1132, 2005.

CARVALHO, S. et al. Comportamento ingestivo de cabras Alpinas em lactação alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de fibra em detergente neutro proveniente da forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p. 562-568, 2006.

CEPEA/ESALQ— Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (org.). Queda acumulada do PIB do agronegócio chega a 4,28% de janeiro a setembro. 2022. Disponível em: [https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/PIB-DO-AGRO-20.12\(1\).pdf](https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/PIB-DO-AGRO-20.12(1).pdf). Acesso em: 15 fev. 2023.

CERNICCHIARO, N.; CORBIN, M.; QUINN, M.; PROUTY, F.; BRANINE, M.; RENTER, D. G. Meta-analysis of the effects of laidlomycin propionate, fed alone or in combination with chlortetracycline, compared with monensin sodium, fed alone or in combination with tylosin, on

growth performance, health, and carcass outcomes in finishing steers in North America. **Journal of Animal Science**. v. 94, n. 4, p. 1662-1676, 2016.

COE, M. L.; NAGARAJA, T. G.; SUN, Y. D.; WALLACE, N.; TOWNE, E. G.; KEMP, K. E.; HUTCHESON, J. P. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. **Journal of Animal Science**. v. 77, n. 8, p. 2259- 2268, 1999.

COSTA, S. F., M. N. PEREIRA, L. Q. MELO, J. C. RESENDE JÚNIOR, and M. L. CHAVES. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactate sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerros-I Aspectos histológicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 60:1-9, 2008.

CUNNINGHAM JG, KLEIN BG. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2008. 710p.

DANIEL JLP, RESENDE JÚNIOR JC, CRUZ FJ. Participação do ruminotriclo e omaso na superfície absorptiva total do proventrículo de bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 43, 688—694, 2006.

DESWYSEN A.G., ELLIS W.C., POND K.R., JENKINS W.L., CONNELLY J. Effects of monensin on voluntary intake, eating and ruminating behavior and ruminal motility in heifers fed corn silage. **Journal of Animal Science** v.64, p. 827:834,1987.

DOMESCIK EJ, MARTIN SA. Effects of laidlomycin propionate and monensin on the in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal of Animal Science**. 77:2305–2312, 1999.

DUFFIELD, T. F.; MERRILL, J. K.; BAGG, R. N. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. **Journal of Animal Science**, v. 90, n.12, p. 4583-4592, 2012.

DULPHY J.P., REMOND B., THERIEZ M. Ingestive behaviour and related activities in ruminants. In: Ruckebusch Y., Thivend P. (eds) *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Springer, Dordrecht, 1980. https://doi.org/10.1007/978-94-011-8067-2_5

ELLIS, J. L.; DIJKSTRA, J.; BANNINK, A.; KEBREAB, E.; HOOK, S. E.; ARCHIBEQUE, S.; FRANCE, J. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain-fed beef cattle. **Journal of Animal Science**, p. 90, v. 2717-2726, 2012.

G.; WRAY, M. I.; ZINN, R. A. Efficacy of laidlomycin propionate for increasing rate and efficiency of gain by feedlot cattle. **Journal of animal science**, n. 68, p. 3382, 1990.

GALYEAN, M. L.; MALCOLM, K. J.; DUFF, G. C. Performance of feedlot steers fed diets containing laidlomycin propionate or monensin plus tylosin, and effects of laidlomycin propionate concentration on intake patterns and ruminal fermentation in beef steers during adaptation to a high-concentrate diet. **Journal of Animal Science**. v. 70, n. 10, p. 2950-2958, 1992.

GALYEAN, M. L.; RIVERA, J. D. Nutritionally related disorders affecting feedlot cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 83, p. 13–20, 2003.

GIBB, D. J., MOUSTAFA, S. M. S., WIEDMEIER, R. D. ET MCALLISTER, T. A. Effect of monensin on voluntary intake, eating and ruminating behavior and ruminal motility in heifers fed cornsilage. *Journal of Animal Science* v.64, p. 827:834,1987.

GOMES, C.T. Aditivos (monensina sódica, levedura e probióticos) para bovinos da raça Nelore terminados com rações com concentrado rico em co-produtos.110p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2009.

GOODRICH, R. D.; GARRET, J. E.; GHAZAL, D. R.; KIRICH, M. A.; LARSON, D. A.; MEISKE, J. C. Influence of monensin on the performance of cattle. *Journal of Animal Science*, v. 58,p.1484-1498, 1984

HEINRICHS J. Evaluating particle size of forages and TMRs using the Penn State Forage Particle Separator. In ‘Coll. Agric. Sci. Coop. Ext.’ The Pennsylvania State University, University Park,1–14,1996.

INGVARTSEN KL, BOISCLAIR YR. Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis an immunity with special focus on periparturient ruminants. **Domest Animal Endocrinol.** (2001) 21:215–50. doi: 10.1016/S0739-7240(02)00119-4

JOHNSON, T.R.; COMBS, D.K. Effects of prepartum diet, inert rumen bulk, and dietary polyethyleneglycol on dry matter intake of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science.* v. 74, n. 3, p. 933-944,1991.

LEONARDI, C., ARMENTANO, L. E., 2003. Effect of quantity, quality and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86(2):557-564.

M. K.; WILLIAMS, P. AND ENGSTROM, M. A. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. *Journal of Animal Science*, 87:2346-2354, 2009.

MARUTA, C. A.; ORTOLANI, E. L. Susceptibilidade De Bovinos Das Raças Jersey E Gir à Acidose Láctica Ruminal: Ii - Acidose Metabólica e Metabolização Do Lactato-L. *Ciência Rural*, v.32,n. 1, p. 61–65, 2002b

MEYER, N. F.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; GREENQUIST, M. A.; LUEBBE, MOLINARI, M. Morfometria em rumen de cordeiros alimentados exclusivamente a pasto ou com concentrado. *Dissertação* (Mestrado), 48p. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de CiênciasRurais, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, 2017

MONTGOMERY, S. P., J. S. DROUILLARD, J. J. SINDT, T. B. FARRAN, H. J. LABRUNE, NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; Van NEVEL, C.J. et al. Manipulation of

ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.) The rumen microbial ecosystem. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 523-632.

NOCEK, J. E.; KESLER, E. M. Growth and rumen characteristics of Holstein steers fed pelleted conventional diets. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 63, n. 2, p. 249-254, Feb. 1980.

OLIVEIRA EC, MELO LQ. Effect of the feeding pattern on rumen wall morphology of cows and sheep Brazilian **Journal of Veterinary Research and Animal Science** 43, 526—536, 2006.

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

PAYNE, J. M.; SALLY, M.; DEW, M.; MANSTON, R.; FAULKS, M. The use of metabolic profiles test in dairy herds. *Veterinary Record*, London, v. 87, p. 150-158, 1970.

PERRY, T. W.; BEESON, W. M.; MOHLER, M. T. et al. Effect of monensin on beef cattle performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 42, p. 761-765, 1976 Ph.D. thesis, University of Missouri, Columbia, 1958.

PIRES, H. R.; OLMSTED, A.; BERGER, L. L.; FONTENOT, J. P.; GILL, D. R.; RILEY, J. AND R. D. HUNTER. Effects of monensin and tylosin concentrations in limit-fed, high-energy growing diets for beef cattle. **Journal of Animal Science**. 19:244–250, 2003.

PRESTON, R. L. Management of high concentrate diets in feedlot. In: simpósio sobre produção intensiva de gado de corte, 1998, Campinas. Anais... Campinas: CBNA, p. 89-91, 1998

RESENDE JÚNIOR JC, ALONSO LS, PEREIRA MN, MAGALLANES MGR, DUBOC MG, salinomycin or monensin on performance and feeding behavior of cattle fed wheat- or barley-based diets **Journal of Animal Science**. 81:253–261, 2001.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN K. S., BEAUCHEMIN K. A., MCALLISTER T. A., GIBB D. J., STREETER M., AND KENNEDY A. D. Effect of feed delivery fluctuations and feeding time on ruminal acidosis, growth performance, and feeding behavior of feedlot cattle **Journal of Animal Science** 82, 3357 -3365, 2004.

SILVA, A. P. S. Efeito da monensina, da virginiamicina e dos óleos funcionais de mamona e caju em bovinos Nelore submetidos a mudança abrupta para dietas com elevado teor de concentrado 103 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

SLVA, D.J., A. C. QUEIROZ. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3.ed Viçosa, MG: Editora UFV, p.235, 2002.

SILVESTRE, A. M. and MILLEN, D. D. 2021. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. **Revista Brasileira de Zootecnia** 50:e20200189. <https://doi.org/10.37496/rbz5020200189>

SMITH, B. P. Diseases of the Alimentary Tract: Ruminant Alimentary Disease. Em B. P. Smith, Large Animal: Internal Medicine (5th ed., pp. 739-842). St. Louis Missouri: Elsevier Health Sciences, 2015

STOCK, R.; KLOPFENSTEIN, T.; SHAIN, D. Feed intake variation. In: Symposium feed intake by feedlot cattle, Proceedings.... Stillwater: Oklahoma State University, p.56-59, 1983.

TAMATE, H., KIKUCHI, T. Electron microscopy study on parakeratotic ruminal epithelium in beef cattle. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Hokkaido, v. 40, p. 21, 1978.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 476p, 1994.

ZINN R.A, ALVAREZ E.G, MONTAÑO M.F, RAMIREZ J.E. Interaction of protein nutrition and laidlomycin on feedlot growth performance and digestive function in Holstein steers. **Journal of Animal Science**, Jul;78(7):1768-78, 2000.

CAPÍTULO 3: Perfil transcriptômico do epitélio ruminal de bovinos confinados submetidos a dieta com alta inclusão de concentrado com Monensina sódica ou uso combinado de Monensina e Virginiamicina.

RESUMO - O consumo de alimento e o ganho de peso dos animais são características economicamente importantes na produção de carne bovina. A parede do rúmen interage com os alimentos, as populações microbianas e os produtos de fermentação, sendo um componente de estudo fundamental para avaliar a capacidade de aproveitamento dos nutrientes com o desempenho produtivo. Quando utilizado aditivo nutricional em bovinos confinados, essa interação é alterada visando maximização da eficiência alimentar dos animais, por meio da modulação da fermentação ruminal. Entretanto, não se tem relatos sobre como o mecanismo gênico interfere nesse processo. Para isso, ferramentas moleculares estão sendo utilizadas visando compreender esses mecanismos. Sendo assim, o objetivo do estudo foi investigar a regulação genética no epitélio ruminal de bovinos Nelore confinados, submetidos a dieta com alto concentrado, com inclusão de Monensina Sódica (CONT) ou Monensina associada a Virginiamicina (TRAT), por meio da análise do perfil transcriptômico das papilas ruminais utilizando a técnica de sequenciamento de RNA. Utilizou-se 16 amostras (8 amostras/tratamento) de papilas ruminais. Destas, seis amostras de cada tratamento foram escolhidas para gerar bibliotecas individuais de RNA-Seq. Foram avaliados os genes diferencialmente expressos (DEGs) entre animais CONT x TRAT. Um total de 26805 genes foram expressos nas análises dos de grupos individuais, destes, setenta e três foram genes foram expressos diferencialmente entre animais CONT e TRAT, sendo 32 super expressos para o CONT e 41 para o TRAT. Vários dos genes identificados pertencem às vias enriquecidas relacionadas à proliferação celular (PRLR, CLDN3, E2F1, FADD) desenvolvimento do epitélio (TAGLN3, THRB, TCAP) e transporte ativo de proteínas transmembrana (CYSRT1, BLC2A1, TPM2) e regulam funções relacionadas ao sistema imune, contração muscular, e aproveitamento de glicose. Pelos resultados apresentados, parece que a Monensina atua de maneira mais protetiva em relação a manutenção do epitélio ruminal.

PALAVA-CHAVE: ionóforos, monensina, virginiamicina, sequenciamento de DNA, transcriptoma

ABSTRACT Dry matter intake and weight gain are economically important characteristics in beef cattle production. The rumen wall interacts with food, microbial populations and end-products fermentation, being a fundamental component of study to evaluate the ability to use nutrients with performance. When a feed additive is used at feedlot, this interaction is altered in order to maximize the animals' feed efficiency, by modulation of ruminal fermentation. However, there are no reports on how the genetic mechanism acts in this process. For this, genomic tools are being used to understand it. Therefore, the objective of the study was to investigate the genetic regulation in the ruminal epithelium of feedlot Nellore cattle, submitted to a high-concentrate diet, with the inclusion of Sodium Monensin (CONT) or Monensin associated to Virginiamycin (TRAT), through ruminal papillae transcriptomic analysis by RNA sequencing. Sixteen samples (8 samples/treatment) were used and six samples from each treatment were chosen to generate individual RNA-Seq libraries. The differentially expressed genes (DEGs) between CONT x TRAT animals were evaluated. A total of 26805 genes were expressed in the analyzes of individual groups, of these, seventy-three were genes that were differentially expressed between CONT and TRAT animals, with 32 overexpressed for CONT and 41 for TRAT. Several of the identified genes belong to pathways related to cell proliferation (PRLR, CLDN3, E2F1, FADD) epithelial development (TAGLN3, THRB, TCAP) and active transport of transmembrane proteins (CYSRT1, BLC2A1, TPM2) responsible by system-related to immune responses, muscle contraction, and glucose utilization. From the results presented, it seems that Monensin is more protective in relation to the ruminal epithelium maintenance.

KEYWORDS: ionophores, monensin, virginiamycin, DNA sequencing, transcriptome

3.1 Introdução

Tecnologias avançadas em biologia molecular têm permitido a identificação de genes, marcadores e vias metabólicas expressas que afetam determinadas características de interesse econômico dentro da bovinocultura de corte. Uma abordagem que contribui muito para o desenvolvimento do conhecimento e suas aplicações dentro do setor é a análise de transcriptoma (REECY et al., 2006).

O transcriptoma pode ser definido como o conjunto completo de transcritos de uma célula em forma de moléculas de RNA (RNAm, RNAr, RNAt e os microRNAs) em um estágio ou determinada condição fisiológica específica (JARAMILLO, 2016). A população destes transcritos participa da modulação de suas atividades metabólicas em diferentes momentos da vida, ou seja, o transcriptoma de cada animal é dinâmico e está sob constante mudança, mediante seu ambiente, que afeta diretamente a fisiologia animal.

O sequenciamento de RNA (RNA-seq) é uma técnica de sequenciamento em larga escala que se apresenta como o método mais eficaz em mapear e quantificar os transcriptomas e assim, possibilitar entender as interações moleculares que fundamentam alterações fenotípicas.

Neste sentido, há uma constante busca pelo entendimento da modulação da fermentação no rúmen, que levou a intensas pesquisas na área de microbiologia ruminal (Rangel et al., 2008, Morais et al., 2011) para garantir um ambiente com menores oscilações de pH e evitar distúrbios metabólicos, possibilitando ao animal um melhor aproveitamento dos nutrientes. A inclusão de aditivos que mantenham o equilíbrio ruminal e melhorem o desempenho estão sendo extensivamente utilizadas. Com 86,1% de utilização, a Monensina sódica é o principal aditivo utilizado em dietas para bovinos confinados no Brasil, seguida da Virginiamicina na segunda colocação com 65,7% (Silvestre e Millen, 2020).

Recentemente, o uso combinado desses aditivos pode ser uma opção interessante, visando melhorias na eficiência alimentar sem redução no consumo de matéria seca, efeito este que é característico da Monensina; dessa forma, o aumento do CMS pode impactar na saúde ruminal e no desenvolvimento de papilas ruminais (Goodrich et al., 1984; Duffield et al., 2002; Salivas-Chavira et al., 2009).

No entanto, se faz necessário uma melhor compreensão de como a regulação genética acontece quando se usa aditivos nutricionais e até o momento, este é o primeiro estudo

comparando Monensina e Monensina combinada com Virginiamicina para bovinos Nelore confinados em relação ao perfil transcriptômico de papilas ruminais.

3.2 Objetivo e Hipótese

A hipótese do estudo foi que o tratamento monensina combinado com virginiamicina induziria a manutenção da integridade do epitélio ruminal de bovinos Nelore consumindo dieta de alto concentrado.

Assim, objetiva-se nessa proposta investigar através de uma abordagem de sequenciamento de RNA, o efeito da monensina e da associação da mesma com virginiamicina, sobre a regulação de genes em papilas ruminais de bovinos Nelore submetidos a uma dieta com alto concentrado em confinamento.

3.3 Material e Métodos

Foram extraídas amostras de papilas ruminais dos animais utilizados no experimento descrito no capítulo 2 e analisadas as amostras pertencentes ao tratamento com monensina (CONT) e do tratamento de monensina combinada com virginiamicina (TRAT), sendo 32 animais de cada tratamento, onde foram agrupados em baias com 4 animais, formando então uma amostra composta por baia (8 baias por tratamento).

3.3.1 Extração do RNA, preparação da biblioteca e sequenciamento

Foram maceradas aproximadamente 20 mg de amostra do epitélio ruminal de cada animal (n= 64) e em seguida reunido em uma amostra composta por baia (n = 16 baias com 4 animais cada), portanto, cada *pool* continha em torno de 80 mg de tecido epitelial. Posteriormente, a extração do RNA total foi realizada por meio de kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

Adicionalmente, foi avaliado a quantidade e qualidade do RNA por meio de Fluorômetro Qubit 3 (ThermoFisher Scientific, EUA) e Bioanalyzer 2100® (RNA 6000 Nano Kit, Agilent, EUA), respectivamente, ao qual a integridade do RNA é demonstrada na Tabela Suplementar 1.

A síntese e purificação do cDNA durante o preparo da biblioteca foi realizada através do Kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina, EUA), a partir de 500 ng de RNA total, conforme

protocolo. Em resumo a cauda poly-A do mRNA foi capturada por meio de oligos Poly-T aderidos à *beads* magnéticas (AMPure XP Beads – Beckman Coulter), e posteriormente fragmentados e submetidos a síntese de cDNA dupla fita, ligada por adaptadores duplamente indexados. Foi realizada PCR para enriquecimento, seguido de purificação das bibliotecas. A concentração e o perfil das bibliotecas foram determinados por meio do Fluorômetro Qubit dsDNA Assay Kit High Sensitivity (ThermoFisher Scientific, EUA) e Bioanalyzer 2100® (High Sensitivity DNA Kit, Agilent, EUA), respectivamente.

Finalmente, as bibliotecas foram agrupadas e a concentração ajustada para 4 nM para então ser sequenciada em equipamento NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 ciclos), considerando leituras de 1x75 pb. Toda a análise de sequenciamento foi realizada no Laboratório de Genética e Biotecnologia localizado no Departamento de Genética e Evolução pertencente a UFSCar – São Carlos, SP, Brasil.

3.3.2. Mapeamento das sequências no genoma de referência

Adaptadores de sequenciamento e leituras de baixa complexidade foram removidas em passo inicial de filtragem por meio do *software* Trim Galore 0.6.5. Somente as leituras com tamanho acima de 70 nucleotídeos e um *score* Phred menor que 33 foram mantidas após o corte. O controle de qualidade e a estatística das leituras foram estimadas com *software* FASTQC versão 0.11.8 (www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/). As *reads* foram mapeadas ao genoma bovino referência (*Bos taurus* – ARS-UCD.1.2.1), disponível em: www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index/.

A abundância (contagem de leituras) de mRNAs de todos os genes anotados foram calculados por meio de featureCounts pertencente ao pacote Rsubread (Liao et al., 2019).

3.3.3. Identificação de genes diferencialmente expressos

Genes diferencialmente expressos (DE) foram analisados com auxílio do DESeq2 disponível no pacote *Bioconductor do software R*, utilizando um design de multifator (Love et al., 2014). Anteriormente a análise estatística, as contagens das leituras dos dados foram filtradas da seguinte forma: (i) genes com zero contagem para todas as amostras, eram genes não expressos; (ii) genes com menos que uma leitura por amostra na média foram removidas

(expressão muito baixa); (iii) genes que não estavam presentes ao menos em 50% das amostras foram removidos (raramente expressos).

A abordagem de corte realizada para identificar os genes DE foi controlar o p-valor ajustado pelo método de Benjamini-Hochberg a 10% e cujos valores de log₂ fold change fossem maiores em módulo que a 0.60 ($0.50 > \log_2 FC < -0.50$), de acordo com estudos anteriores e recomendações DESeq2 (Benjamini e Hochberg, 1995; Love et al., 2014; Cesar et al., 2016).

Análise de enriquecimento funcional com anotações obtidas utilizando genoma de *Bos taurus* como background e agrupadas por processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares foram desenvolvidas, em que termos do gene ontology (GO) foram obtidos por meio da plataforma Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID).

3.4. Resultados

Realizou-se análise histo-morfológica de bovinos Nelore confinados submetidos a dietas contendo Monensina e Monensina associada a Virginiamicina (Tabela 6, cap 2), onde animais que receberam os aditivos MON+VM apresentaram maior largura de papila (0,530 vs 0,453, $P=0,0054$) e espessura da camada de queratina (0,021 vs 0,0199, $P=0,001$) em relação a animais tratados com Monensina (gráfico 1, $P < 0,05$).

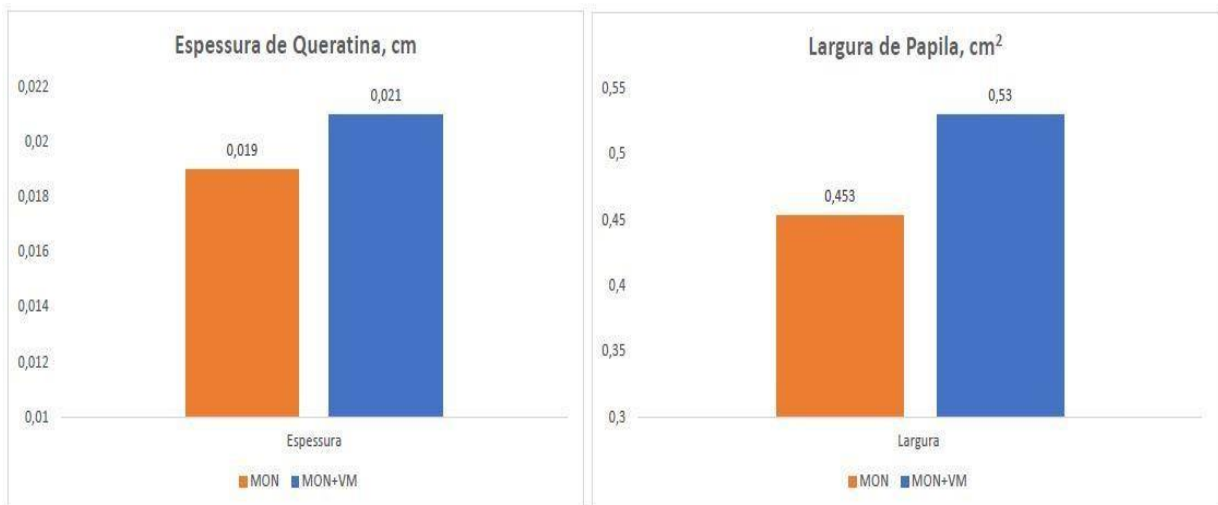


Figura 8: Espessura de queratina, cm e largura de papila de bovinos Nelore confinados, consumindo dieta altamente energética com Monensina e Monensina associada com Virginiamicina; Valor de $P < 0,01$ para ambas variáveis.

3.4.1. Avaliação geral do transcriptoma

O número médio total de *reads* obtidas no sequenciamento foi mais de 17 milhões por amostra, o que resultou na identificação de 26.805 genes expressos, utilizado para análise de genes diferencialmente expressos (DEG).

Foram identificados 73 genes diferencialmente expressos (P ajustado $< 0,10$), ao qual 41 foram super expressos para o tratamento de MON+VM e 32 foram super expressos para o tratamento MON (Figura 1 e Tabela S2). Dentre os DEG, podemos citar importantes genes como CLDN3, CNN1, CLCF1, E2F1, FADD, S100A11 e PRLR envolvidos na via de proliferação celular; TAGLN3, CLDN3, TCAP, THRB E PRLR expressos na via de desenvolvimento do epitélio, na via de atividade de proteínas transmembranas reportou-se os genes CYSRT1, DES, CLND3, BCL2A1, TPM2, FADD, ADGRV1, SCL35D1, LOC100337076 e TOX3 e FAAH e CROT como genes regulatórios dos processos catabólicos de ácido graxo.

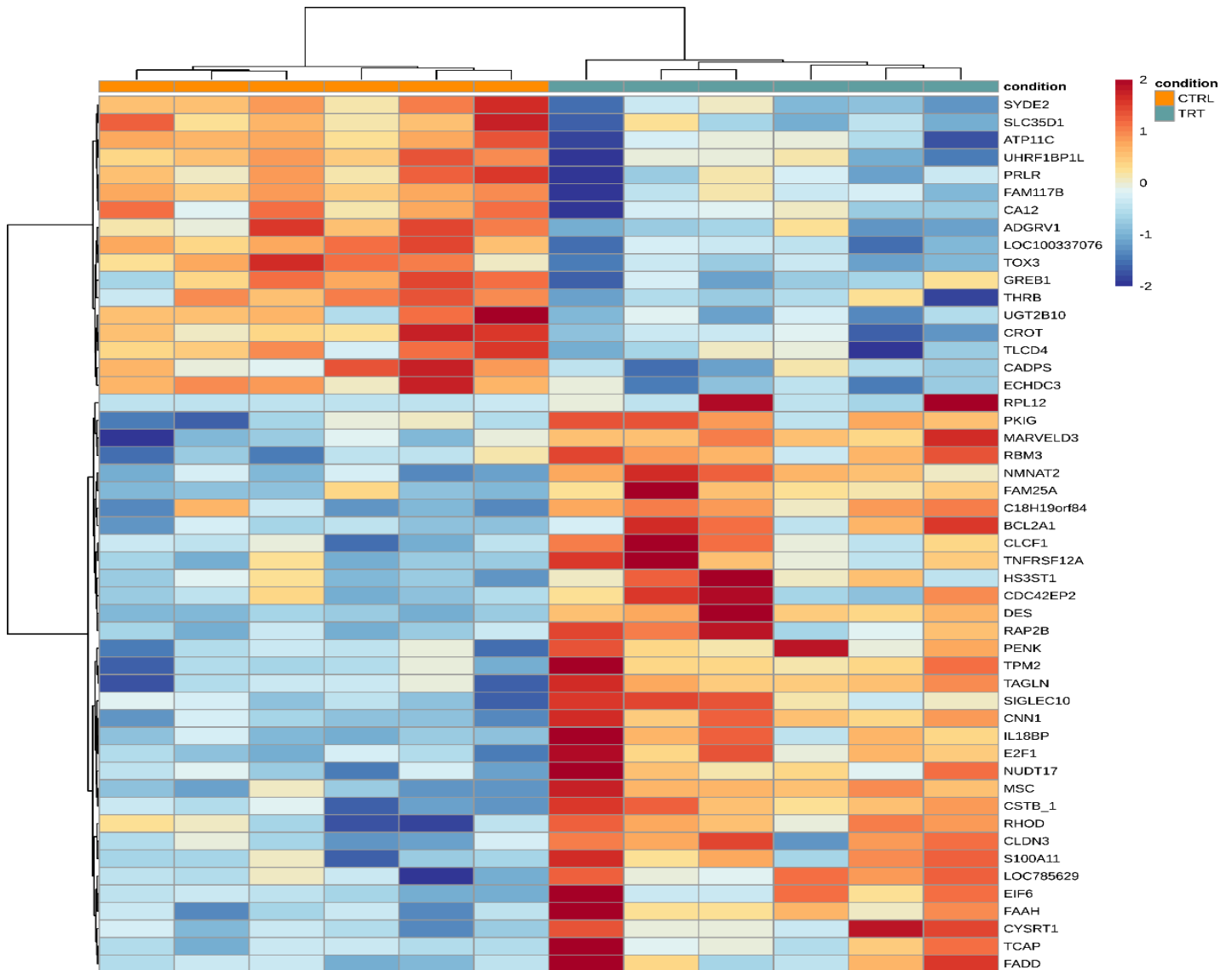


Figura 9: Heatmap com os genes diferencialmente expressos nas papilas ruminais de bovinos Nelore alimentados com Monensina (CTRL) e Monensina combinada com Virginiamicina (TRAT).

Dessa forma, a Análise de enriquecimento funcional foi realizada com todos os DEG, na Tabela 1 são demonstradas os principais termos e vias significativas ($P < 0,10$) em processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares do banco de dados *Gene Ontology* (GO). Vias como desenvolvimento do epitélio (GO:0060429), proliferação celular (GO:0042127), processo catálitos de ácido graxo (GO:0009062), atividade de transporte de proteínas transmembranas (GO: 0022804) foram enriquecidas e influenciadas pelos tratamentos.

Tabela 1: Vias significativas para genes obtidos por análise das DEGS em comparação de dietas com Monensina ou Monensina combinada com Virginiamicina.

CódigoVia	Descrição	N.genes	Valorde P	Genes
<i>Processo biológico</i>				
GO:0030036	Organização do citoesqueleto deactina	9	0,001	CNN1, CLDN3, TPM2, CASS4, CDC42EP2, ZYX, TCAP, IQGAP2, RHOD
GO:0006732	Processos metabólicos de coenzimas	5	0,016	EIF6, ME1, NUDT17, CROT, NMNAT2
GO:0007165	Sinal de transdução	24	0,027	TLE4, ADGRV1, THRB, RAB4B, BCL2A1, TNFRSF12A, MAOA, SIGLEC10, FAM13A, ASB11, IQGAP2, PRLR, RHOD, ROBO1, SYDE2, RAP2B, CLCF1, PENK, E2F1, CASS4, ZYX, CDC42EP2, TXNIP, FADD
GO:0060429	Desenvolvimento do epitélio	8	0,035	TAGLN, CPT1A, THRB, CLDN3, TXNIP, TCAP, PRLR, ROBO1
GO:0007010	Organização do citoesqueleto	10	0,030	CNN1, DES, CLDN3, TPM2, CASS4, CDC42EP2, ZYX, TCAP, IQGAP2, RHOD
GO:0050790	Regulação da atividade catalítica	11	0,036	SERPINB10, ADGRV1, RAP2B, CLDN3, TPM2, CDC42EP2, FADD, IQGAP2, PKIG, PRLR, ROBO1
GO:0070997	Morte de neurônios	4	0,038	TOX3, THRB, CLCF1, FADD
GO:0009062	Processos catabólicos de ácido graxos	3	0,041	CPT1A, FAAH, CROT
GO:0009437	Processos catabólicos da carnitina	2	0,041	CPT1A, CROT

GO:0007154	Comunicação celular	25	0,042	THRB, BCL2A1, MAOA, FAM13A, ASB11, IQGAP2, ROBO1, SYDE2, PENK, E2F1, FADD, TLE4, ADGRV1, RAB4B, TNFRSF12A, SIGLEC10, CADPS, PRLR, RHOD, RAP2B, CLCF1, CASS4, ZYX, CDC42EP2, TXNIP
GO:0042127	Regulação da proliferação celular	9	0,055	CNN1, CLDN3, CLCF1, SIGLEC10, E2F1, FADD, PRLR, S100A11, ROBO1
<i>Função Molecular</i>				
GO:0001515	Atividade peptídica de opioides	2	0,012	PENK, CDC42EP2
GO:0016406	Atividade da carnitina O-aciltransferase	2	0,018	CPT1A, CROT
GO:0005515	Proteína de ligação	28	0,020	TAGLN, THRB, BCL2A1, CLTB, IQGAP2, ROBO1, IL18BP, MBTD1, CNN1, CYSRT1, PENK, E2F1, ME1, FADD, MSC, S100A11, TPM2, PRLR, RHOD, RAB32, TOX3, RAP2B, DES, CLDN3, CLCF1, CDC42EP2, TXNIP, TCAP
GO:0005127	Ligação do receptor do fator neurotrófico ciliar	2	0,030	CLCF1, PRLR
GO:0005488	Ligação	44	0,040	TAGLN, THRB, BCL2A1, MAOA, RPL12, CLTB, IQGAP2, ROBO1, IL18BP, RBM3, MBTD1, CNN1, CYSRT1, PENK, E2F1, ME1, NUDT17, FADD, MSC, LOC100337076, S100A11, TMEM184A, CA12, ADGRV1, RAB4B, TPM2, SIGLEC10, CADPS, ATP11C, NMNAT2, PRLR, RHOD, RAB32, TOX3, RAP2B, DES, CLDN3, EIF6, CLCF1, ZYX, CDC42EP2, TXNIP, TCAP, ZNF436

GO:0019955	Ligação das citocinas	3	0,057	TCAP, PRLR, IL18BP
GO:0022804	Transporte ativo transmembrana	4	0,087	ADGRV1, SLC16A1, SLC35D1, LOC100337076
GO:0042802	Ligação de proteínas idênticas	9	0,095	TOX3, CYSRT1, DES, CLDN3, BCL2A1, TPM2, ME1, FADD, ROBO1
<i>Componente Celular</i>				
GO:0005741	Membrana mitocondrial externa	4	0,011	RAB32, CPT1A, BCL2A1, MAOA
GO:0005802	Rede trans-Golgi	4	0,020	RAB32, CLTB, ATP11C, NMNAT2
GO:0045335	Vesícula fagocítica	3	0,030	RAB32, CDC42EP2, ZYX
GO:0005768	Endossomos	6	0,073	RAB32, TMEM184A, RAB4B, RAP2B, ATP11C, NMNAT2
GO:0045202	Sinapse	7	0,083	ADGRV1, DES, RPL12, CADPS, PENK, CLTB, NMNAT2

3.5. Discussão

3.5.1. Regulação da proliferação celular

A via de regulação da proliferação celular foi identificada como uma das vias mais significativas em relação a utilização de aditivos, pois apresentou sete genes regulando-a positivamente no tratamento com MON+VM e apenas um gene foi regulado positivamente em animais consumindo MON.

O gene CLDN3 (claudina-3) super expresso no tratamento MON+VM é reportado na literatura como uma proteína com atuação de barreira celular ou junção aderente, aumentando três vezes a resistência elétrica transepitelial, mediante indução do fator de crescimento epidermal (EGF). Este fator de crescimento também é relatado como ativador da cascata de ciclo e motilidade celular, contribuindo para a proliferação celular. Corroborando com os dados do presente estudo, em que a associação da MON com VM aumentou a largura das papilas ruminais. (Wang et al., 2020; Badwin, 1999; Hashimoto et al. 2008).

Adicionalmente, a liberação de hormônios como EGF aumenta, de forma dependente da dose, a concentração de butirato no rúmen, o que também possui relação com a proliferação de células epiteliais. Possivelmente, os animais que receberam MON+VM tiveram maior produção de butirato, pois o uso de VM proporciona a presença, de forma prolongada, de cepas de *Megasphaera elsdenii*, que controlam o pH do ambiente ruminal ao consumir lactato e produzir butirato (Schulzke e Fromm, 2009; Turner, 2009; John et al., 2011).

Enquanto, a menor expressão de CLDN3 no tratamento MON possivelmente está atrelada a sua fosforilação, haja vista que sua inativação ocasiona afrouxamento celular, aumentando a permeabilidade da membrana, o que levou a uma menor camada de queratina nas papilas ruminais. Além disso, a MON é o ionóforo que mais prioriza a produção de propionato em relação aos outros aditivos, que colabora para aumentar a área de superfície absorviva do epitélio, sem necessariamente aumentar a espessura de queratina, (Costa et al., 2008) possivelmente por manter uma membrana mais permeável.

No presente estudo, animais que consumiram MON apresentaram uma menor espessura de queratina, que pode estar relacionada ao maior controle de proliferação celular pelo aumento da expressão do gene PRLR.

O gene PRLR codificador do receptor de prolactina pertence à família dos receptores de

citocinas, cuja ativação é mediante sua própria autofosforilação promovendo uma série de ativação em cascata sinalização e transcrição gênica. De forma geral, o PRL pode modular a proliferação celular via sinalização do JAK/STAT, e pela via MAPK/JNK pode influenciar a proliferação e apoptose celular.

De acordo com o estudo de Varghese (2010) em células humanas epiteliais mamárias, o PRLR pode induzir uma proliferação celular mais acelerada que células controle. O autor justificou que o aumento na proliferação é resultante de um maior aproveitamento dos nutrientes em um menor período de tempo, resultando em um processo mais eficiente, visto que outras células sem a incorporação do gene em questão, apresentaram um maior crescimento, porém, continham resíduos celulares que acabou resultando na acidificação do meio de cultura e pode ter impedido uma proliferação mais eficiente.

Além disso, este gene está associado à regulação de glicose por meio da insulina. Camundongos deficientes em PRLR tiveram reduções de 26 a 42% na densidade das ilhotas e na massa celular (Freemark M et al., (2002) assim como a deleção do PRLR reduziu os estoques de gordura abdominal em camundongos fêmeas.

Adicionalmente, Yu et al. (2013) descobriram que PRLR pode ser regulado pela via GCN2- Mtor/S6K1, mediante disponibilidade de aminoácidos (leucina), mas a principal via reguladora de insulina por PRLR é a STAT5.

Um ponto interessante é que uma das formas de ativar a STAT5 é por meio da leptina. Dados da literatura indicaram que a leptina promoveu a fosforilação e ativação da STAT5 em células hipotalâmicas conhecidas por regular o consumo de alimento e o balanço energético do hospedeiro (Lee et al., 2008).

A Monensina é muito conhecida por regular o consumo de matéria seca em bovinos, o que pode estar relacionada a regulação de leptina e ativação da via STAT5 por PRLR, justificando sua maior expressão gênica para o respectivo tratamento.

Estudos de polimorfismo revelaram que em vacas Holandesas, a adição do gene PRLR foi claramente associada à maior produção de leite, com maior concentração de proteína e gordura (Zhang et al. 2007). Em bovinos de corte da raça Nanyang, os animais que carregavam o gene mutacional PRLR apresentaram maior peso final e ganho de peso diário que animais não tratados geneticamente, confirmando a associação do gene com características de crescimento (Lu A. et al., 2010).

Dentre os demais genes expressos no tratamento MON+VM, o gene CNN1 é pertencente

da família das calponinas e é uma proteína expressa no músculo liso e em vários tipos de células não musculares que atuam na estabilização do citoesqueleto de actina, também afetando muitas atividades celulares, como proliferação, adesão, migração, diferenciação, fagocitose e fusão (Takahashi et al., 1986; Winder e Walsh, 1990). A CNN1 desempenha um papel importante na contratilidade muscular, porém, a maioria dos estudos foram realizados com animais não ruminantes (Jin et al., 1996).

Já o gene FADD (Fas-associated death domain) é uma proteína associada a família Fas e faz parte do complexo de sinalização de morte celular, transmitindo desde sinais apoptóticos como também de proliferação (Tourneur e Chiocchia, 2010).

Observou-se maior expressão deste gene em queratinócitos de células inflamadas, onde foi relacionada com sinais de transmissão iniciais que culminaram ao maior desenvolvimento destas células (Bonnet et al., 2011). Estes dados corroboram com os achados do presente estudo, onde aumentou-se a expressão de FADD no tratamento MONVM, juntamente com a espessura de queratina do epitélio ruminal, possivelmente pela realização de processos não-apoptóticos.

Sabe-se que os queratinócitos fornecem uma barreira estrutural e imunológica contra microrganismos patogênicos, afim de regular a homeostase. Neste sentido, avaliando células com dermatites e células saudáveis em queratinócitos, a expressão do gene S100A11 foi significativamente menor nas células que apresentaram a infecção, indicando que sua deficiência pode ter comprometido a integridade das barreiras e consequentemente prejudicando a resposta imune (Howell MD et al., 2008).

As proteínas S100 se ligam a vias de sinalização formadas por Ca^{2+} e desempenham funções de crescimento e diferenciação celular e de forma geral, são significativamente diminuídas na presença das citocinas IL-4 e IL-13. (Weinberg e Denning, 2002; Sakaguchi et al., 2005). Pertencente as famílias das citocinas, o gene CLCF1 também foi mais expresso nos animais alimentados com MON+VM.

O gene se liga ao receptor do fator neurotrófico ciliar (CNTFR) e ativa a cascata de sinalização Jak- STAT e recentemente, apresentou importante papel na regulação da hematopoiese e na diferenciação de células mieloides. Considerado um fator de transcrição, o E2F1 aumenta a fosforilação do RNA pol II, o que promove o recrutamento das enzimas sintéticas metil cap que são necessárias para a maturação, expressão e estabilidade do mRNA. (Chen et al., 2021)

O caminho tomado pela rota Rb/E2F (retinoblastoma/fator de transcrição E2F1) é

determinante para proliferação celular ou apoptose celular. Sua interação com a via de sinalização PI3K/Akt leva à proliferação celular, enquanto sua interação com a via AMPKa2 resulta em apoptose celular. Breanne et al. (2020) evidenciaram a interação em células da granulosa em bovinos. Onde, a inibição do E2F1 reduziu a proliferação das células da granulosa, indicando atuação no desenvolvimento folicular de bovinos.

De maneira similar, a super expressão de E2F1 em células ovarianas de hamsters, aumentou a proliferação e densidade de células viáveis (Major et al., 2008). Indicando, portanto, que no tratamento MON+VM a maior expressão do gene E2F1 é um indicativo de maior proliferação de células epiteliais no rúmen.

Corroborando com nosso estudo, Lin et al. (2020) avaliaram o perfil transcriptômico de células primárias do epitélio ruminal em bezerros Holandeses com duas semanas de vida, após infusão de butirato e o fator E2F1 foi identificado como um potencial regulador do desenvolvimento do rúmen, atuando em diversas vias de sinalização (WNT, MAPK, Jnk, NFκB, ERK e PI3K).

Sabe-se que a diferenciação das células epiteliais antes do desmame é fundamental para que seja possível a absorção e metabolismo de AGCC. Nesse sentido, o butirato desempenha um papel central na diferenciação celular e no desenvolvimento do epitélio; isso porque o este ácido é considerado um regulador epigenético ao inibir as histonas desacetilases (HDAC), que afetam diretamente as ativações gênicas (Baldwin R et al., 2018; Donohoe D et al., 2012).

Os dados se associam com os resultados do presente estudo, reforçando a hipótese que realmente animais tratados com MON+VM produziram mais butirato no meio, contribuindo para um maior desenvolvimento de células epiteliais.

Por fim, essas relações podem nos indicar que E2F1 pode ter influenciado dois genes que também foram expressos no tratamento MON+VM, onde o gene FAAH foi reportado dentro da via dos processos catabólicos de ácido graxo, pois atua na β-oxidação e o gene RAP2B é reconhecido como gene central da regulação das proteínas p53, e pelo estudo de Li et al (2020) o fator E2F1 que induz a oncoproteína p53. O Heatmap desta via pode ser visualizado na figura 3.

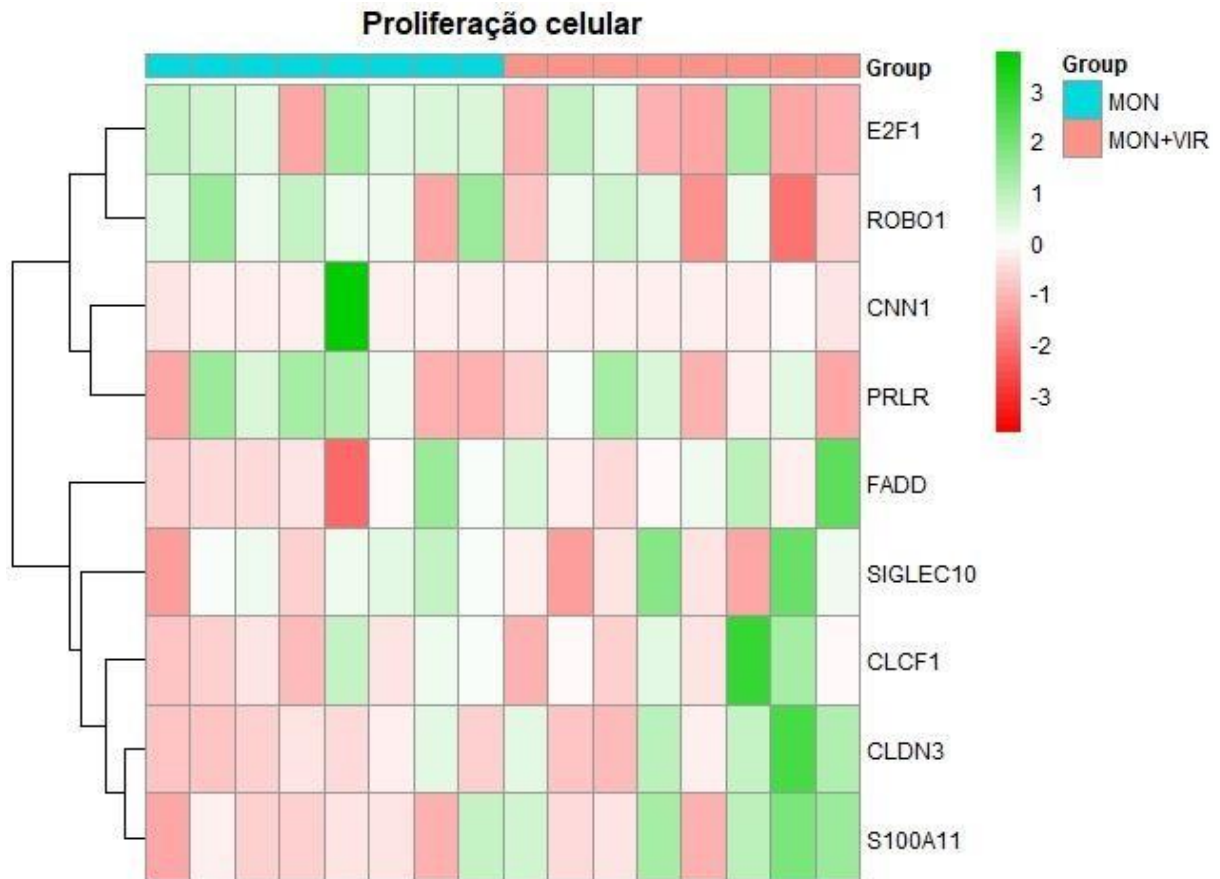


Figura 10: Heatmap de genes diferencialmente expressos para MON e MON+VM pela vida de proliferação celular

3.5.2. Desenvolvimento do epitélio ruminal

Após identificar alguns genes relacionados a proliferação celular do epitélio ruminal, estes desempenham importante função de desenvolvimento celular, que é formado por diversas camadas, se iniciando na camada basal, passando pela camada do estrato granuloso, que apresenta abundância em células juncionais até atingir o estrato córneo, que pode ser altamente queratinizado (Lavker e Matoltsy, 1970)

Conhecido como TAGLN ou também p27, WS3-10 ou SM22, o gene pertencente à família das transgelinas pode ser encontrado nas células musculares cardíacas e esqueléticas durante a embriogênese, assim como nas células lisas epiteliais, endoteliais, nos fibroblastos e células do sistema imune; está envolvido em funções como angiogênese, morfogênese, migração, contração e motilidade celular (Tsuji- Tamura K et al., 2021).

Estudos comprovam que o TAGLN é importante para a progressão da diferenciação de células troncoatravés da distribuição de filamentos de actina e organização do citoesqueleto, entretanto, os fatores de crescimento como TGF β 1, PI3K-Akt ou mTORC1, parecem suprimir essa proliferação e dessa forma, o citoesqueleto é alterado, assim como a diferenciação destas células. A fosforilação e degradação de TAGLN é um fator fundamental na ativação da NADH oxidase mitocondrial, que é a principal fonte de ROS intracelulares, possivelmente por conta de desregulações de enzimas mitocondriais (Dvorakova M. et al. 2020).

No estudo de Elsafadi et al (2016), a expressão de TAGLN induziu o TGFB1 (fator de crescimento transformador B1) e aumentou a diferenciação dos osteoblastos, conforme evidenciado pelo aumento da formação de matriz extracelular mineralizada e dos adipócitos pela maior expressão de marcadores como: PPARG2 (receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama), LPL (lipoproteína lipase) e adiponectina (ADIPOQ).

Com ovinos, o gene em questão foi diferencialmente expresso em animais resistentes à nematóides gastrointestinais. O autor relacionou esse achado com o aumento das camadas intestinais associadas a uma maior contrabilidade do músculo (Diez-Tascón et al. 2005). Collins, (1996) justificou que uma maior contrabilidade pode promover uma rápida expulsão dos vermes.

Ao que se parece, o sistema imune dos animais regula a motilidade dos órgãos e a diferenciação celular para controlar possíveis agentes infecciosos que possam vir a prejudicar o meio. Dessa forma, a camada mais espessa do epitélio ruminal de bovinos alimentados com MON+VM no presente estudo, pode ser uma resposta do sistema imune para regular a homeostase do meio.

O gene TCAP codificador da proteína teletonina possui relação próxima com qualidade da carne, uma vez que é importante para a montagem dos sarcômeros. No presente estudo, sua expressão pode estar relacionada ao diferente perfil de ácidos graxos de cadeia curta conferidos pelos aditivos. Uma vez que o uso de MON na dieta de bovinos reduz a razão acetato:propionato no rúmen. (Warris, 2000; Hopkins e Taylor, 2004).

Portanto, a menor expressão do gene TCAP no tratamento MON, pode ser atribuída a produção de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen, onde possivelmente aumentou a produção de propionato nos animais tratados com MON, alterando a A:P e inibiu TCAP; Similarmente, a fermentação ruminal advinda desses compostos, pode ter estimulado o desenvolvimento de células na camada queratinizada a fim de proteger o hospedeiro da acidificação

A motilidade ruminal foi associada a ovinos que receberam infusão do hormônio

tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) pela glândula tireóide. Os autores observaram que o T3 pode ser um dos fatores envolvidos no mecanismo de controle do tempo de retenção da digesta no rúmen, pois ao submeter ovinos a infusão destes hormônios, o tempo de retenção diminuiu, assim como a digestibilidade aparente (Kennedy M, Young BA, Christopherson RJ, 1977).

No presente estudo, os hormônios da tireóide tem relação direta com o gene altamente expresso nos animais que consumiram apenas MON, o THRB (receptor do hormônio tireoidiano beta).

Um dos fatores que a Monensina reduz CMS é pelo aumento do tempo de retenção no rúmen (Roger e Davis, 1982); E isto poder ser confirmado ao observarmos os dados de comportamento ingestivo dos animais do presente estudo (tabela 5, capítulo 2), onde o número de idas ao cocho de bovinos alimentados com MON durante a terminação foi menor em relação a animais MON+VM e os que receberam propionato de laidlomocina (LP) corroborando com a alta regulação de THRB.

Entretanto, não foi possível observar diferença estatística para o CMS durante todo o período experimental; além disso, o mecanismo genético de contração do epitélio envolvendo o tempo de retenção da digesta requer mais investigações.

O THRB parece interagir com o TGF-B, um potente regulador do crescimento celular e proliferação. O TGF-B demonstrou bloquear o crescimento de numerosos tipos de células, incluindo células de hepatoma. (Barker et al., 1988; Velásquez et al., 1997), o que pode justificar uma largura menor de papilas ruminais em animais MON.

No desenvolvimento ruminal, o impacto do hormônio tireoidiano pode ser por meio de vários processos como o ciclo celular, apoptose, transporte de glicose e regulação do esqueleto de actina, entre outras que podem ser advindas da sua interação com outros hormônios (IGF-1, EGF, GH, TSH, PRLR), gerando uma dificuldade de entender como esses processos podem ser regulados por meio do THRB, pois são amplamente utilizados e possuem receptores na maior parte dos tecidos (Wilson e Gorewit, 1980; Guyton e Hall, 2002).

Estudos mostram que T3 e T4 regulam síntese proteica, bem como a lipogênese e a lipólise, incrementam a absorção de carboidratos pelo intestino, entre outras funções, por meio da ativação das vias e seus receptores (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARA, PPARY e PPARG) (Achmadi e Terashima, 1995; Guyton e hall, 2002);

O lobo anterior da hipófise produz e libera seis hormônios principais, dentre eles, o hormônio estimulante de tireóide (TSH) e o da prolactina (PRLR). Ambos com seus receptores

sendo expressos no tratamento com MON, indicando forte relação com desenvolvimento do epitélio ruminal.

Estudos apontam relação positiva de desenvolvimento de papilas ruminais com produção de IGF-1 (Galfi, Neogrady e S. Sakata, 1989; Baldwin et al. 1999), que também está positivamente relacionado a regulação de PRLR. O aumento de carboidrato no rúmen, leva a uma produção maior de propionato, que é intensificada em dietas altamente energéticas contendo MON, estimula o metabolismo energético, ativando vias de sinalização de hormônios relacionados ao desenvolvimento epitelial, inclusive PRLR.

A prolactina também promove o crescimento do fígado (Moreno-Carranza et al., 2018), aumentando a sensibilidade à insulina (Kelly et al., 2013) e protegendo do acúmulo hepático de triacilglicerol e carcinogênese (Zhang et al., 2018). Foi documentado que a prolactina tem mais de 300 funções biológicas (Bole-Feysot et al., 1998). O heatmap desta via pode ser visualizado na figura 4.

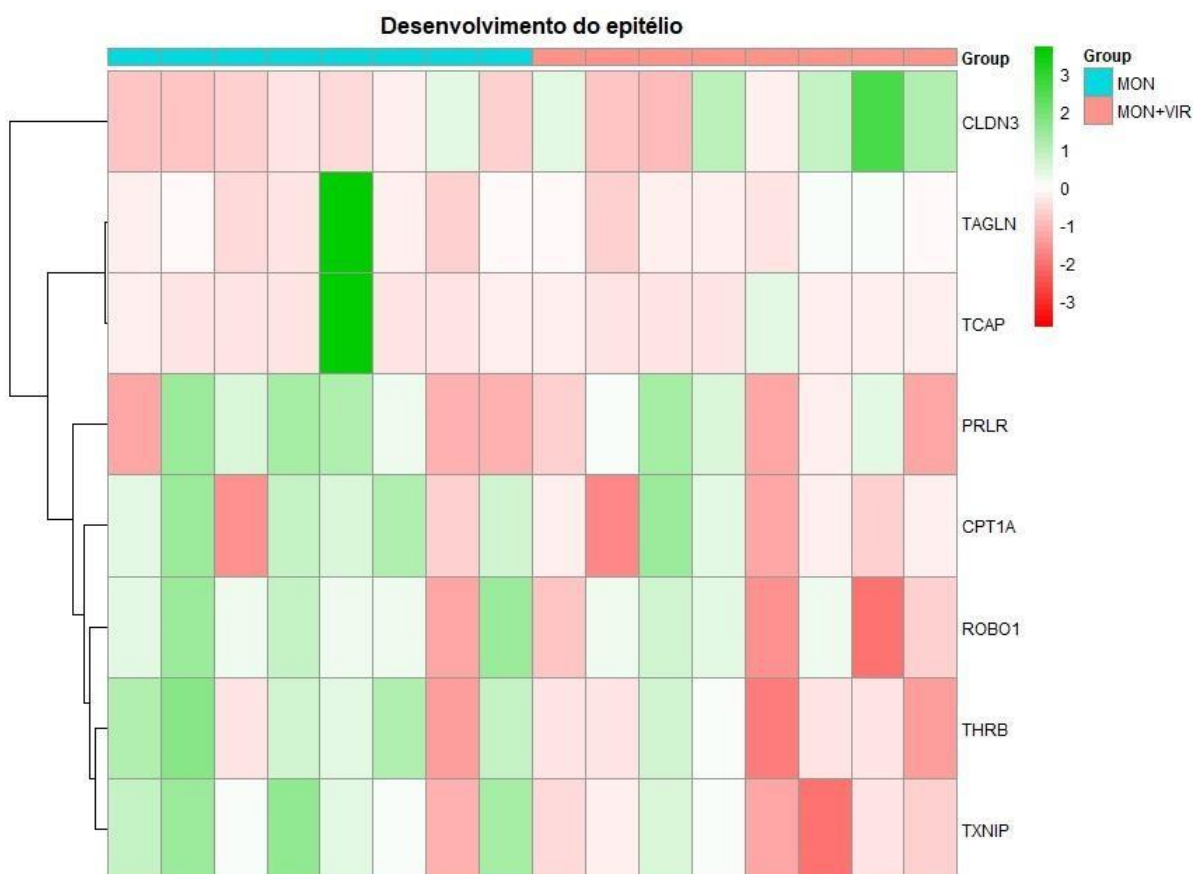


Figura 11: Heatmap dos genes diferencialmente expressos para MON e MON+VM pela via do desenvolvimento do epitélio ruminal

3.5.3. Atividade de transporte ativo transmembrana

Conforme as modulações estruturais acontecem, as proteínas transportadoras também se alteram conforme a dieta em questão.

O TPM2 (β -tropomiosina) atua na ligação da actina e miosina e nos tecidos não musculares e auxilianos processos de motilidade, adesão, sinalização e transporte de vesículas (Gunning et al, 2015; Hiiberg et al, 2006). Similarmente, o gene DES pode ser encontrado na linha Z do músculo esquelético e cardíaco, auxiliando a manter a estrutura dos sarcômeros e também conectar as miofibrilas ao núcleo, mitocôndriase sarcolema, facilitando a transmissão de força no momento da contração muscular (Huang YS, Xing YL, Li HW, 2021).

O gene BLC2A1 também se mostrou mais enriquecido no tratamento MON+VM, que pode estar correlacionado com o aumento da espessura de queratina no epitélio ruminal dos animais deste tratamento. Isso se deve ao fato de que, quando queratinizado, o epitélio forma complexos de adesão para assegurar a conexão dos queratinócitos, formando os desmossomos, que são formados por proteínas que se dividem em dois grupos: Proteínas de adesão transmembrânicas e as proteínas citoplasmáticas de ancoragem (Alberts et al., 2002; Presland e Jurevic, 2002).

A epiderme quando queratinizada, forma as LEPs (late envelope proteins) ou síntese de proteínas de envelope (Kalinin et al., 2001). Nesta etapa, elas dependem da ativação das células de Notch, uma família de proteínas transmembrânicas que atua na sinalização celular e induzem a ativação de genes de diferenciação (Okuyama et al., 2008).

Diante desta informação, o gene CYSRT1 (*Cysteine-rich tail protein 1*), ou proteína de cauda rica em cisteína 1, interage com a família das LEPs nas camadas de queratina do tecido. A regulação da transcrição do gene CYSRT1 contribui para a defesa do organismo, em função de sua atividade antimicrobiana epidérmica. (Niehues et al, 2023). O autor reportou efeito do CYSRT1 contra as *Pseudomonas aeruginosa* na epiderme e concluiu que a expressão de CYSRT1 é fortemente induzida pela ruptura da barreira cutânea e conseqüentemente, processos inflamatórios.

Sendo assim, animais que consumiram MON+VM, apresentaram uma maior quantidade de queratinócitos, provavelmente induziram a formação das LEPs, dependentes das *Notch*, que estimula a ativação do CYSRT1, intensificando o organismo a produzir maiores agentes defensivos, possivelmente da acidificação ruminal.

Um dos fatores que contribuem para o aumento dos queratinócitos é a regulação da apoptose celular, dessa maneira, dois genes estão relacionados a este processo e também foram expressos nesta via pelo tratamento MON+VM: BCL2A1 e FADD.

A regulação da maquinaria apoptótica que os membros da família Fas, como o FADD fazem parte, é regulada principalmente por membros da família Bcl-2 (Borner, 2003). Atuando por meio do controle da permeabilidade da membrana mitocondrial, os membros Bcl-2 podem ser divididos em pró- (Bid, Bik, Bim, Bmf, Bok, Puma, Noxa, Bak, Bad e Bax) e anti-apoptóticos (A1, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, e Bcl-w). Nesse sentido, a proteína A1, que ligada ao gene BCL2 forma o BCL2A1, é uma das interações mais bem caracterizadas em regular processos apoptóticos e sugere-se uma função citoprotetora essencial para a ativação dos linfócitos como resposta aos processos inflamatórios (Gasparotto L.E.P, 2009).

No estudo de Mandal et al. (2005), foi caracterizada a via de sinalização envolvida na indução de A1, onde sua expressão pode induzir a sobrevivência de células pré-T (células do linfócito T) inibindo a ativação da caspase-3, regulando assim a apoptose. Li et al. (2022), confirmou que o gene BCL2A1 foi significativamente aumentado em pacientes com septicemia.

Durante um ensaio com vacas holandesas no período seco, avaliou-se por 28 dias pré-parto, a suplementação (SUP) e a não suplementação (CON), em relação à genes relacionados a apoptose; foi observado aumento nas concentrações de propionato e butirato em animais SUP no meio ruminal, e uma tendência a menor expressão de BCL2 em SUP, indicando aumento da taxa de apoptose (Dieho et al., 2017).

Os dados são condizentes com os da literatura, que indicam que, de modo geral, a maior produção de AGCC reflete em uma taxa mais acelerada de mitose e apoptose, dessa forma, o gene BCL2 é menos expresso, como reportado no tratamento com MON.

Nesse sentido, os mecanismos de defesa dos animais consumindo MON+VM podem ter sido mais solicitados, o que contribuiu para controlar a apoptose e favorecer a queratinização do epitélio atuando como barreira dos agentes indesejáveis, aumentando a expressão de BCL2A1 em relação a animais tratados com MON.

De qualquer forma, é importante entender que o nível de apoptose é diferente de acordo com o tipo de AGCC. Mentschel J. et al (2001) avaliou o desenvolvimento do rúmen por infusões de propionato e butirato. No grupo do ácido butírico, o índice mitótico foi o mesmo que no grupo do ácido propiônico, mas eles revelaram um processo de apoptose muito menor, o que explica as diferenças no comprimento das papilas entre os dois grupos de ácidos graxos,

onde dobrou-se as espessuras das mesmas no tratamento com butirato e quadruplicou em relação aos animais do grupo controle.

Dessa forma, considerando que a maior parte das células apoptóticas está concentrada nas camadas superficiais, a espessura de papila foi consideravelmente aumentada no tratamento com butirato.

Esses fatores de crescimento também podem estar envolvidos na regulação da apoptose, devido à sua possível função como fator de sobrevivência que retardam este mecanismo (Hague et al, 1997; Raabet al., 1998). Jass (1985), considerou que em células tumorais, presume-se que elas tenham um defeito no metabolismo do butirato, resultando em acúmulo deste ácido e controle de apoptose.

No presente estudo, é então possível associar uma maior produção de butirato no tratamento com MON+VM e a maior largura e espessura de queratina, pelo fato do maior estímulo de genes relacionados ao controle do sistema imune do animal. Além disso, o estudo de Mentschel J. et al (2001), demonstrou que se referindo a altura das papilas, o propionato apresentou os maiores valores, corroborando com os dados do estudo de Costa et al. (2008), concluindo então, que para um desenvolvimento completo de papilas, o propionato também é muito importante, pois aumenta a área de superfície absorviva.

Sendo assim, tanto o FADD quando o BCL2A1 expressos, influenciam direta ou indiretamente no transporte de AGCC e demais substâncias envolvidas nesta via.

A superfamília de genes de transportes de soluto (SLC) compreende cerca de 400 proteínas que transportam uma ampla variedade de substâncias através das membranas celulares.

Dentro desse grupo, a família SLC35 são proteínas transmembrana que funcionam como transportadores de açúcar-nucleotídeos (NSTs), do citosol para dentro da célula, e se dividem em sete subfamílias (SLC25A-G) que são diferenciadas de acordo com o substrato transportado, totalizando até o momento, cerca de 31 membros. No caso, o gene SLC35D1 codifica o NST e uma proteína do tipo fosfatase de polifosfato de Inositol (INPPL1). (Hadley et al., 2019).

A proteína codificada por esse gene SLC35D1, reside no retículo endoplasmático exclusivamente, e transporta tanto o ácido UDP-glucurônico (UDP-GlcA) quanto o UDP-N-acetilgalactosamina (UDP- GalNAc) e participa da glucuronidação (eliminação de toxinas) e biossíntese do sulfato de condroitina, que é importante para a formação da matriz extracelular da cartilagem e desenvolvimento esquelético normal (Hadley et al., 2019).

A glucuronidação é um mecanismo importante para desintoxicação celular mediada por enzimas transferases e que consiste na transferência de uma molécula de ácido glucurônico, altamente solúvel em água, para uma ampla variedade de compostos tóxicos, a fim de facilitar sua eliminação, e quando mais rápida a saída, mais eficiente o processo (Patricio, C.B. 2020).

Além deste processo de eliminação de toxinas, este ácido carboxílico também atua em todo o organismo na distribuição de metabólitos de sinalização, sendo essencial para a manutenção da homeostase celular. Podemos afirmar que nesse sentido, animais tratados com MON, carregaram uma maior quantidade de açúcar por meio da SLC35D1 pro Reticulo endoplasmático e intensificaram o processo de glucuronidação, conseguindo então, eliminar uma quantidade maior de compostos e evitar acúmulos nas papilas ruminais o que possivelmente resultou em uma camada de queratina menos espessa. Em relação a bovinos de corte, diversos genes pertencentes da família SLC mostraram-se relevantes.

Avaliando a inclusão de MON em animais com alta e baixa eficiência alimentar, diversos genes foram envolvidos no desempenho desses animais como: SLC4A, SLC16A, SLC21A, SLC22A e SLC26A. Entretanto, não foi possível encontrar estudos envolvendo este gene especificamente pois diversos membros da subfamília SLC35 foram rotulados como transportadores órfãos, sendo desconhecida ainda sua especificidade de substrato e funções fisiológicas.

Sanjeeb et al., (2016) mostrou que a inibição da sinalização Notch (*knockdown* de TOX3), em células-tronco neurais, atrasa a transição de fases de diferenciação e reduz a atividade proliferativa, fato que pode ter ocorrido no tratamento MON+VM. O heatmap desta via pode ser visualizado na figura 5



Figura 12: Heatmap dos genes diferencialmente expressos para MON e MON+VM pela via de atividade de proteinastransmembrana.

3.5.4. Processos catabólicos de ácidos graxos

Correlacionados ao transporte de solutos também, dois genes foram identificados nesta via: Para MON, o gene enriquecido foi o CROT e para a MON+VM, o FAAH.

A carnitina O-octanoil transferase (CROT) codifica um dos membros da família carnitina/colina acetiltransferase. Locada nos peroxissomos, A CROT atua na conversão dos acil-CoAs em acilcarnitina no citosol, liberando uma molécula de CoA para então, entrar na mitocôndria, onde serão metabolizados pela β -oxidação (Okui et al., 2021).

O aumento de CoA livre estimula o metabolismo lipídico, pois este CoA se liga aodown acetil-CoA e posteriormente entrará no ciclo de Krebs, onde acontece o processo de produção de energia pro organismo (Okui et al., 2021).

Dessa forma, espera-se que com o aumento da expressividade de CROT no tratamento

com MON, aumentou-se o transporte de compostos para a mitocôndria, intensificando o processo de B -oxidação.

Okui et al., (2021) identificou que o aumento da expressão de CROT aumentou a calcificação em células vasculares humanas e correlacionou com a produção excessiva de AG e uma certa disfunção mitocondrial. Após a inativação deste gene, a calcificação foi atenuada, possivelmente pela diminuição da produção de AG.

Almeida Santana et al. (2016) ao avaliar bovinos Nelore com alto e baixo consumo alimentar residual (CAR), Schlegel G et al (2012), quando suplementou vacas com ácido linolênico conjugado e Alaedin, M (2021) com carnitina, não reportaram efeito significativo para a expressão de CROT. Jogl G, Hsiao YS, Tong L. (2004) relatou que o gene possui uma desordem funcional que pode afetar sua expressão.

Já o gene FAAH, ou amida hidrolase de ácido graxo, é uma proteína de membrana integral que atua na síntese de AG, além de hidrolisar palmitoiletanolamida (PEA), oleamida e oleoiletanolamida, hidrolisa também anandamida (N-araquidonoil etanolamina (AEA)) e 2-araquidonoil glicerol (2-AG), formando o ácido araquidônico e etanolamina. Estes compostos, juntamente com seus receptores e outras enzimas constituem o sistema endocanabinóide.

O primeiro receptor canabinóide (CB1), é um receptor de membrana acoplado à proteína G (GPCR), sendo mais abundante no cérebro e o receptor canabinóide 2, (CB2), nas células imunes. As anandamidas e 2-AG não só produzem como também são derivados do ácido araquidônico, importante AG atuante no sistema imune. Portanto, se FAAH hidrolisa endocanabinóide, tais compostos podem ser aumentados por inibidores desta proteína (Mc Kinney e Cravatt, 2005)

A degradação de endocanabinóides (AEA e 2-AG) por meio dos receptores CB1 parece desempenhar um papel considerável na regulação da motilidade intestinal dependente da FAAH (Izzo et al., 2001; Di Marzo V. et al., 2008; Capasso R. et al., 2005).

Os receptores CB1 estão localizados nas vias eferentes do nervo vago, onde modulam a liberação de neurotransmissores, reduzindo a contratilidade do músculo liso no trato gastrointestinal, possivelmente por meio da inibição de alguns compostos como o próprio ácido gástrico, acetilcolina, adenosina e histamina (Izzo et al., 2001).

Camundongos deficientes de FAAH não demonstraram inibição de motilidade e a proteção significativa contra inflamação colônica induzida por ácido dinitrobenzeno sulfônico se manteve (Mascolo et al., 2002). A regulação negativa em FAAH aumentou risco de

obesidade em humanos. (Conzelmann A et al., 2012).

Sendo assim, assumindo que essas rotas metabólicas acometam o meio ruminal, animais que consumiram MON+VM, provavelmente apresentaram maior motilidade pela ativação de FAAH e conseqüentemente aumentou a taxa de passagem, diminuindo sua taxa de retenção. Da mesma forma, menor expressão de FAAH no tratamento MON confirma mais uma hipótese que este aditivo aumenta o tempo de retenção do substrato no meio.

Bloqueio de CB1 aumentou o gasto energético, ao passo que o consumo de oxigênio e glicose aumentou e a lipogênese foi diminuída (Di Marzo et al., 2008).

Outro ponto interessante, foi que Bensaidet et al., (2013), identificou maior concentração de adiponectina, conforme inibição de CB1. Esta proteína é produzida nos adipócitos e é caracterizada por proteger o endotélio pela produção de moléculas de adesão e inibir proliferação e migração celular, o que pode ser correlacionado com o tratamento MON+VM.

Além disso, inibidores de FAAH e NAAA (N-aciletanolamida hidrolase acida amidase), reduziram a expressão de mediadores inflamatórios induzidos por LPS (Alhouayek et al., 2017).

Mostrando que os efeitos em bovinos não são tão significativos quanto para camundongos. Kumar V. et al (2018), dividiram os touros em três grupos de acordo com sua taxa de concepção (baixa, média e alta fertilidade) e encontrou que a expressão do gene CB1 foi 21,07 e 4,23 vezes maior em touros de alta e média fertilidade, respectivamente em comparação com touros de baixa fertilidade, mas não encontrou efeito na expressão de FAAH. Wei et al., (2006) e Dirandeh Ghaffari J, (2018) ao analisar bovinos e vaca, respectivamente, não encontrou diferenças significativas.

De qualquer forma, a via enriquecida no presente estudo coerentemente expressou genes significativos que atuam de maneira oposta no metabolismo lipídico; Enquanto FAAH atua na síntese de AG (ácido araquidônico e glicerol) em animais MON+VM, o CROT está mais envolvido na oxidação dos AG, ao quebrar acilcarnitina e liberar uma molécula de CoA para adentrar no ciclo de Krebs.

Além disso, os achados sobre a motilidade e contração muscular merecem mais atenção uma vez que influencia diretamente o consumo de matéria seca e pode compor as outras ideias que justifiquem essa regulação. O heatmap desta via pode ser visualizado na figura 6.

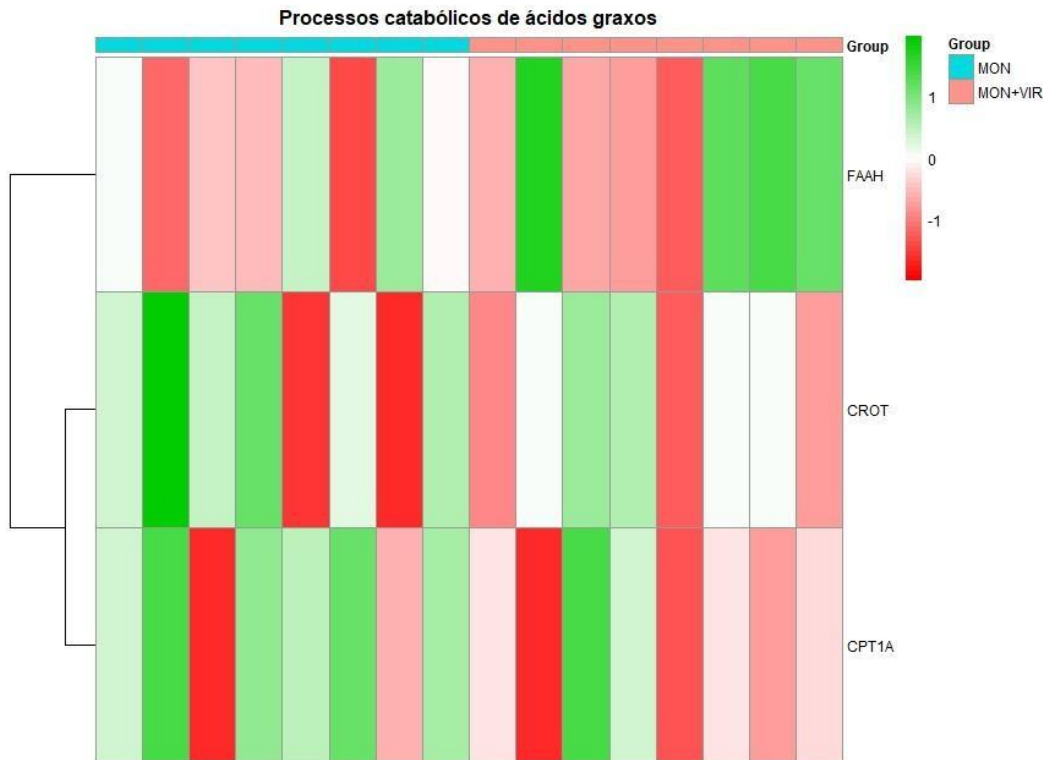


Figura 13: Heatmap dos genes diferencialmente expressos para MON e MON+VM pela via de processos catabólicos de ácidos graxos.

3.5.5..Considerações finais

Tais considerações indicam que a maquinaria necessária para desenvolver e metabolizar os processos do epitélio ruminal de bovinos alimentados com MON+VM foi mais demandada em relação ao tratamento com MON, devido ao maior número de proteínas que atuaram nos processos de proliferação celular e proteínas transmembranas, co-relacionadas com o sistema imune.

O custo energético de montar uma resposta imune é alto, podendo chegar a aumento do gasto energético diário de 15% (Cutrera et al., 2010); da mesma maneira, uma redução nas respostas imunes e inflamatórias pode permitir que mais energia seja dedicada ao crescimento celular e desenvolvimento das papilas ruminiais.

Podemos dizer que animais que consumiram MON apresentaram um epitélio ruminal

mais permeável que animais tratados com MON+VM, por apresentarem um menor número de genes regulados na via de proliferação celular, o que pode ter absorvido mais propionato e então, diminuído o requerimento energético de manutenção desse sistema, disponibilizado mais energia para ganho; já animais tratados com MON+VM, nossos relatos indicam que possivelmente, a produção de butirato foi maior, contribuindo para um maior desenvolvimento do epitélio.

Sendo assim, os genes mais expressos identificados em nosso estudo podem fornecer um novo recurso para colaborar na escolha do aditivo utilizado na dieta de bovinos confinados, a fim de garantir melhor desempenho produtivo em decorrência de uma melhor saúde ruminal.

3.6 Conclusão

Dietas altamente energéticas para bovinos Nelore confinados, em relação aos dados de transcriptoma de papila ruminal, indicou que a monensina sódica foi mais eficiente em manter a saúde ruminal, contrariando a hipótese do estudo.

3.7. Referências bibliográficas

ABIEC (2023) Perfil da pecuária no Brasil. <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-01/>

ACHMADI J, TERASHIMA Y. The effect of propylthiouracyl-induced low thyroid function on secretion response and action of insulin in sheep. **Domest anim endocrinol** , apr;12(2):157-66, 1995

ALAEDIN, MOHAMADTAHER: Effect of an inflammatory stimulus on mitochondrial functionality in liver cells of dairy cows. - Bonn, 2021. - **dissertation**, <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5-62348>.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WALTER, P. Molecular biology of the cell. 4th edn. Garland science t. Feb;91(3):401. 2003.

BALDWIN RL. Use of isolated ruminal epithelial cells in the study of rumen metabolism. **J nutr.** Feb;128(2 suppl): 293s-296s, 1998.

BALDWIN RL The proliferative actions of insulin, insulin-like growth factor-i, epidermal growth factor, butyrate and propionate on ruminal epithelial cells in vitro. **Small ruminant res;** 32:261–8. 1999.

BEATRIZ CALADO PATRÍCIO, Farmacogenómica aplicada ao tratamento antirretroviral em Portugal, faculdade de ciências e tecnologia, universidade do algarve (dissertação), faro, 2020.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **j. r. stat. soc. ser.**,57, 289–300. 1995.

BORNER, C. The bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **mol Immunol oxford**,.39, 11, p.615 –647,2003.

BREANNE C.M., CHIARA M. P., EXCELL-RIOS R S M. ; LINGNA Z., LUIS F S., LEON J S., Regulation of the transcription factor *E2F1* mRNA in ovarian granulosa cells of cattle, **Journal of Animal Science**, v 98, i 1,2020,

CARRANZA M., BRAVO-M.M., BAEZ A., MARIA G. LEDESMA C. , XARUBET R.H., REYES- P. O. LOS RÍOS E. A., MACOTELA Y. DE LA ESCALERA M. G., CLAPP C., Prolactin regulates liver growth during postnatal development in mice, journal article, **American journal of physiology-regulatory**, integrative and comparative physiology, 902-908,314,6, 2018.

CAPASSO R, MATIAS I, LUTZ B, BORRELLI F, CAPASSO F, MARSICANO G, MASCOLO N, PETROSINO S, MONORY K, VALENTI M, DI MARZO V, IZZO AA. Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo. **gastroenterology**. sep;129(3):941-51, 2005.

CESAR, A.S.M.; REGITANO, L.C.A.; POLETI, M.D.; ANDRADE, S.C.S.; TIZIOTO, P.C.; OLIVEIRA, CHEN X, HAUSMAN BS, LUO G, ZHOU G, MURAKAMI S, RUBIN J, em. protein kinase inhibitor γ reciprocally regulates osteoblast and adipocyte differentiation by downregulating leukemia inhibitory factor. **stem cells**. Greenfield, dec;31(12):2789-99. 2003.

CLEVENGER CV, FURTH PA, HANKINSON SE, SCHULER LA. The role of prolactin in mammary carcinoma. **endocr rev.** feb;24(1):1-27, 2003.

COLLINS SM. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. **gastroenterology** 111: 1683–1699, 1996.

CONZELMANN A, REIF A, JACOB C, WEYERS P, LESCH KP, LUTZ B, PAULI P. A polymorphism in the gene of the endocannabinoid-degrading enzyme faah (faah c385a) is associated with emotional-motivational reactivity. **psychopharmacology (berl)** dec; 224, 4, 573-579, 2012

COSTA SF, PEREIRA MN, MELO LQ, CALIARI MV, CHAVES ML. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerros. ii. aspectos ultra- estruturais. **arq. bras. med. vet. zootec.**60, 1: 10-18, 2008.

CUTRERA, A.P., ZENUTO, R.R., LUNA, F., ANTENUCCI, C.D., Mounting a specific immune response increases energy expenditure of the subterranean rodent *ctenomys talarum* (tuco-tuco): implications for intraspecific and interspecific variation in immunological traits. **j. exp. biol.** 213, 715–724. 2010.

DI MARZO, V., CAPASSO, R., MATIAS, I., AVIELLO, G., PETROSINO, S., BORRELLI, F., ROMANO, B., ORLANDO, P., CAPASSO, F. AND IZZO, Aa., The role of endocannabinoids in the regulation of gastric emptying: alterations in mice fed a high-fat diet. **British journal of pharmacology**,153:1272-1280, 2008.

DIEZ-TASCÓN C, KEANE O.M., WILSON T., ZADISSA A., HYNDMAN D.L., BAIRD D.B., MCEWAN J.C., CRAWFORD A.M. Microarray analysis of selection lines from outbred populations to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. **physiol genomics.** 21; 59-69.2004.

DITTMER S, KOVACS Z, YUAN SH, SISZLER G, KÖGL M, SUMMER H, GEERTS A, GOLZ S, SHIODA T, METHNER A. Tox3 is a neuronal survival factor that induces transcription depending on the presence of cited 1 or phosphorylated creb in the transcriptionally active complex. **j cell sci**, 15;224- 252, 2010.

E. DIRANDEH, J. GHAFARI, Effects of feeding a source of omega-3 fatty acid during the early postpartum period on the endocannabinoid system in the bovine endometrium, *theriogenology*, v 121, p 141-146, 2018.

E.E. CONNOR, et al., Transcriptional regulators transforming growth factor-beta1 and estrogen- related receptor-alpha identified as putative mediators of calf rumen epithelial tissue development and function during weaning, **j. dairy sci.** 97, 7,4193–4207; 2014.

ELSAFADI M, MANIKANDAN M, DAWUD RA, ALAJEZ NM, HAMAM R, ALFAYEZ M, KASSEM M, ALDAHMAH A, MAHMOOD A. Transgelin is a $\text{tgf}\beta$ -inducible gene that regulates osteoblastic and adipogenic differentiation of human skeletal stem cells through actin cytoskeleton organization. *cell death dis.* 4;7 8 2016.

F.SOSA; JOSÉ E.P. SANTOS, D. OWENS RAE et al. Effects of the slick 1 mutation in prlr on regulation of core body temperature and global gene expression in liver in cattle. **animal** 16.2022.

FAJAS L, LANDSBERG RL, HUSS-GARCIA Y, SARDETC, LEES JA, AUWERX J. E2Fs regulate adipocyte differentiation. *dev cell.*,3, 1, 39-49, 2002.

FORTES, M.; LEHNERT, S.; BOLORMAA, S.; REICH, C.; FORDYCE, G.; CORBET, N.; WHAN, V.; HAWKEN, R.; Reverter, A. Finding genes for economically important traits: brahman cattle puberty. **anim. prod.sci**, 52, 143–150. 2012

FREEMARK M., AVRIL I., FLEENOR D., et al., Targeted deletion of the prl receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *endocrinology*; 143; 1378–1385; 2002.

GALFI P., NEOGRADY S., SAKATA T., Effects of volatile fatty acids on the epithelial cell proliferation of the digestive tract and its hormonal mediation. in: tsuda t, sasaki y, kawashimara, editors. physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: proceedings of the seventh international symposium on ruminant physiology. san diego (ca): academic press; p. 49–59. 1991

GAO, JIANQIANG Y.U., QIANHONG W.U., SHOUYUAN ZHAO; Cloning and mapping of human pkib and pkig, and comparison of tissue expression patterns of three members of the protein kinase inhibitor family, including pkia. **biochem j** 15, 349;403–407, 2000.

GASPAROTTO E.P.L., TOGNON R., FERREIRA A.F., OLIVEIRA G.L.V., PALMA P.V.B., ZANICHELLI M.A., Deregulated expression of a1, bcl-2, bcl-x1, and mcl-1 antiapoptotic proteins and bid, bad, and bax proapoptotic genes in polycythemia vera patients. **braz j pharm sci**, 47,4 873–8, 2011.

GHOLIZADEH et al. Transcriptomic changes in the rumen epithelium of cattle after the induction of acidosis. *archives of razi institute*, vol. 75, no. 1, 109-121, 2020.

GOODRICH, R. D., J. E. GARRETT, D. R. GHAST, M. A. KIRICH, D. A. LARSON, AND J. C. MEISKE. Influence of monensin on the performance of cattle. **j. anim. Sci**, 58, 1484-1498, 1984.

GUELHO D. ,GOMES L., PAIVA I., CARRILHO F., Prolactina e metabolismo – uma perspectiva diferente de uma hormona multifuncional, **revista portuguesa de endocrinologia, diabetes e metabolismo**, v 11, issue 2, p 268-276, 2016.

GUNNING P.W., HARDEMAN E.C., LAPPALAINEN P, MULVIHILL D.P. Tropomyosin - master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. **j cell sci.**, 128:2965–74, 2015.

GUYTON A.C., HALL J.E Tratado de fisiologia médica. guanabara koogan. rio de janeiro, brasil. 803-812, 2002.

HADLEY B., LITFIN T., DAY C.J., HASELHORST T., ZHOU Y., TIRALONGO J., Nucleotide sugar transporter slc35 family structure and function. **comput struct biotechnol j.** 2019, 7;17:1123-1134, 2019.

HANNA N., GIJS R., FERRY F.J., JORINE M. E. et al., An antimicrobial epidermal protein that can interact with late cornified envelope proteins, *journal of investigative dermatology*, 0022-2020, 2023.

HASHIMOTO K, OSHIMA T, TOMITA T, KIM Y, MATSUMOTO T, JOH T, MIWA H. Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3. **biochem biophys res commun.**, 7 :154-7, 2008.

HODGON E. introdução à biotransformação (metabolismo). 53-72, 2012.

HOWELL M.D., FAIRCHILD H.R., KIM B.E., et al., Cytokines act on s100/a11 to downregulate keratinocyte differentiation. **j invest Dermatol**, 128, 9, 2248-58, 2008.

HUANG D.W., SHERMAN B.T, LEMPICKI R.A, Systematic and integrative analysis of large genelists using david. *bioinformatics resources. nature protoc*, 1:44-57, 2009.

HUANG Y.S., XING Y.L., LI H.W. Heterozygous Desmin gene (des) mutation contributes to familial dilated cardiomyopathy. **j int med res**, 49 – 4, 2021.

HUWS S.A, CREEVEY C.J., OYAMA L.B., MIZRAHI I. et al. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. *front. microbiol.* 9:2161, 2018.

IZZO AA, FEZZA F, CAPASSO R, BISOGNO T, et al., Cannabinoid cb1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. **br j pharmacol**;134:563–570, 2001.

NYE J.S., R..KOPAN, R. AXEL, An activated notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells, *development*. 120, 2421–2430, 1994.

JASS, J. R. et al., Butyric acid a differentiation of gastrointestinal tract turnover. *med hypotheses* 118, 113-118, 1985.

JUNQUEIRA, L.C. E CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*, rio de janeiro, editora guanabara koogan, 8ª edição, 2006.

DIEHO, J. VAN BAAL, L. KRUIJT, A. BANNINK, J.T. Effects of supplemental concentrate during the dry period or early lactation on rumen epithelium gene and protein expression in dairy cattle during the transition period, **journal of dairy science**, v 100, issue 9, , p 7227-7245, 2017.

K.-J. LEEUW, H.H. MEISSNER, P.H. HENNING, F.K. SIEBRITS, Effects of virginiamycin and monensin administered alone or together with *Megasphaera elsdenii* strain ncimb 41125 on in vitro production of lactate and vfa and the effects of monensin and *M. elsdenii* strain ncimb 41125 on health and performance of feedlot steers, **Livestock science**, volume 183, pages 54-62, 2016.

KRAUSE, K.M. OETZEL G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. **Animal feed science and technology** 126, 215–236, 2006.

KALININ, A.; MAREKOV, L.N. STEINERT, P.M. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. **jcell sci** v.114, p. 3069-70. 2001.

KELLY P.A., DJIANE J., POSTEL-VINAY M.C., EDERY M. The prolactin/growth hormone receptor family. **Endocr**, ;12(3) :235-51. 1991.

KUMAR V., KUMARESAN A., NAG P., KUMAR P., DATTA T.K., Transcriptional abundance of type-1 endocannabinoid receptor (cb1) and fatty acid amide hydrolase (faah) in bull spermatozoa: relationship with field fertility. *theriogenology*. jul 1; 114:252-257, 2018

LIN, ET AL., Ruminal microbiome-host crosstalk stimulates the development of the ruminal epithelium in a lamb model, **microbiome** 7, 1, 83, 2019.

LÉA TOURNEUR AND GILLES CHIOCCHIA, Fadd: a regulator of life and death, trends in **immunology**, v.31, i.7, p. 260-269. 2010

JUN L.I., ZHOU M.I., FENG J.I.A-Q.I., Bulk rna sequencing with integrated single-cell rna sequencing identifies bcl2a1 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for sepsis, *frontiers in public health*,10,2022.

L.I.SHIJUN, HONG J., MEI C. Function and characterization of the promoter region of perilipin 1 (plin1): roles of e2f1, plag1, c/ebp β , and smad3 in bovine adipocytes, *genomics*, volume 112, i 3, p 2400-2409, 2020

GELSINGER L.I, W., EDWARDS, S.A. *et al.* Transcriptome analysis of rumen epithelium and meta- transcriptome analysis of rumen epimural microbial community in young calves with feed induced acidosis. *sci rep* 9, 4744, 2019.

LIAO Y., SMYTH G.K., SHI W. The R package RSubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of rna sequencing reads. *nucleic acids research*, 47, e47. 2019.

LIN, SHUDAI ET AL. Establishment and transcriptomic analyses of a cattle rumen epithelial primary cells (repc) culture by bulk and single-cell rna sequencing to elucidate interactions of butyrate and rumen development, *heliyon*, volume 6, issue 6, 2020.

LISTON H PHA., MARKOWITZ R. M D J., PHARM D; Glucuronidação de medicamentos em psicofarmacologia clínica. *jornal de psicofarmacologia clínica*, 21 5 500-515, 2001.

LIU R AND JIN JP. Calponin isoforms cnn1, cnn2 and cnn3: regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. *gene*. Jul 1;585(1):143-153. 2016.

LIU, ET AL., Infusion of sodium butyrate promotes rumen papillae growth and enhances expression of genes related to rumen epithelial vfa uptake and metabolism in neonatal twin lambs, **j. anim. sci.** 97 2 909–921., 2019

LOVE, M.I.; HUBER, W.; ANDERS, S Moderated estimation of fold change and dispersion for rna-seq data with deseq2. *genome biol*, 15, 550.2014.

LU L., HU X., JIN X., Il-4 as a potential biomarker for differentiating major depressive disorder from bipolar depression. *medicine (baltimore)*. apr 14;102. 115, 2014.

LUO W., BROUWER C., PATHVIEW: An r / bioconductor package for pathway-based data integration and visualization *bioinformatics* 29:1830–1.2013.

MALHI, ET AL., Increased papillae growth and enhanced short-chain fatty acid absorption in the rumen of goats are associated with transient increases in cyclin d1 expression after ruminal butyrate infusion, **j. dairy sci.** 96 (12) 7603–7616, 2013.

WANG M. Y., LI Y., GAO M., SONG L.W., Effects of subacute ruminal acidosis on colon epithelial morphological structure, permeability, and expression of key tight junction proteins in dairy goats, **journal of dairy science**, volume 104, issue 4, 2021, pages 4260-4270,2020.

MAJORS B.S., ARDEN N., OYLER G.A., E2f-1 overexpression increases viable cell density in batch cultures of chinese hamster ovary cells. *j biotechnol.* nov 25;138(3-4): 2008.

MANDAL M, BOROWSKI C, PALOMERO T, FERRANDO AA, The bcl2a1 gene as a pre-t cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *j exp med.* feb 21;201(4):603-14.2005.

MASCOLO N, IZZO A.A, LIGRESTI A, COSTAGLIOLA A, PINTO L., The endocannabinoid system and the molecular basis of paralytic ileus in mice. *fasebj.* 2002.

MAUS, M.V. ET AL. prolactin as a chemoattractant for human breast carcinoma. *endocrinology* 140, 5447–5450, 1999.

MCGUFFEY, L.F. RICHARDSON, J.I.D. WILKINSON, Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook, *journal of dairy science*, volume 84, supplement, p. 194-213, 2001,

MENTSCHER, J., LEISER, R., MÜLLING, C., Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. *archiv für tierernaehrung*, 55(2), 85, 1999.

MICHELE K., MCKINNEY AND BENJAMIN F, Structure and function of fatty acid amide hydrolase, *annual review of biochemistry*, 2005, 74:1, 411-432

MILATZ S., KRUG S.M., ROSENTHAL, Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *biochimica et biophysica acta* 1798, 2048–2057, 2010.

MIREILLE A., PAULINE B., ALEXANDROS M., N- acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase and fatty acid amide hydrolase inhibition differentially affect n-acylethanolamine levels and macrophage activation, *bba - molecular and cell biology of lipids*, 2017.

MYLÈNE D., LAURENCE B., DIDIER V., Milk and plasma proteomes from cows facing diet-induced milk fat depression are related to immunity, lipid metabolism and inflammation, **animal**, 17, 6, 2023.

NAGARAJA T.G., LECHTENBERG K.F. Liver abscesses in feedlot cattle. *vet. clin. food anim.*; 23: 351-69, 2007

NIWINSKA, ET AL., Review: exogenous butyrate: implications for the functional development of ruminal epithelium and calf performance, **animal** 11,9,1522–1530, 2017.

OKUIT., IWASHITA M., ROGERS M.A., Crot (carnitine o-octanoyltransferase) is a novel contributing factor in vascular calcification via promoting fatty acid metabolism and mitochondrial dysfunction. *arterioscler thromb vasc biol.*; 41(2):755-768, 2021.

ORMANDY, C.J. ET AL. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *genes dev.* 11, 167–178,1997.

OSEI-HYIAMAN D, HARVEY-WHITE J, BÁTKAI S, KUNOS G. The role of the endocannabinoid system in the control of energy homeostasis. *int j obes (lond)*. apr;30 suppl 1:s33-8, 2006.

OVERGAARD, C.E., E DAUGHERTY, BRANDY L. E MITCHELL, LESLIE A. E KOVAL, MICHAEL. Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *antioxidants & redox signaling*, 15,5,1179-1193,2011.

FELÍCIO P.S.N.; NASCIMENTO A.M.; CHAVES M.L Differences in the skeletal muscle transcriptome profile associated with extreme values of fatty acids content. *bmc genom*, 17, 961.,2016.

PRESLAND, R.B.; JUREVIC, R.J. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. **j dent educ.** v.66, n.4, p.564-74. apr. 2002.

XIANGYU P., YU W., ZONGJUN LI ET AL., , Tracing the origin of a new organ by inferring the genetic basis of rumen evolution *bioRxiv*.02.19. 2020

PEARSON G., ROBINSON F., BEERS G.T., Mitogen- activated protein (map) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr rev* 2001;22:153– 183.

PEREIRA, G., GUO, Y., SILVA, E. ET AL. Progesterone differentially affects the transcriptomic profiles of cow endometrial cell types. *bmc genomics* 23, 82 ,2022.

PERKS, C.M. ET AL. Prolactin acts as a potent survival factor for human breast cancer cell lines. *br. j. cancer* 91, 305–311, 2004

PLAIZIER J.C., KHAFIPOURE, LIS., Subacute ruminal acidosis (sara), endotoxins and health consequences. *anim. feed sci. technol.*; 172: 9-21,2012.

QU, D., HUANG, H., DI, J., GAO, K., Structure, functional regulation and signaling properties of rap2b (review). *oncology letters*, 11, 2339-2346.2016.

RAMOS, S.C.; JEONG, C.D.; MAMUAD, L.L.ET AL., Diet transition from high-forage to high-concentrate alters rumen bacterial community composition, epithelial transcriptomes and ruminal fermentation parameters in dairy cows., *animals*, 11, 838. 2021.

RATUSHNA, OKSANA Glucose deprivation affects the expression of genes encoding camp-activated protein kinase and related proteins in u87 glioma cells in ern1 dependent manner" *endocrine regulations*, vol.54, n.4, pp.244-254, 2020.

RAUTENGARTEN C., QUARRELL O.W., STALS K., Hypomorphic allele of slc35d1 results in schneckenbecken-like dysplasia. *hum mol genet.* nov 1;28(21):3543-3551. 2019.

RIGUEIRO A.L.N., PEREIRA M.C.S., SILVESTRE A.M., PINTO A.C.J., Withdrawal of sodium monensin when associated with virginiamycin during adaptation and finishing periods on feedlot performance, feeding behavior, carcass, rumen, and cecum morphometrics characteristics of Nellore cattle. *front vet sci* jan 24;10: 1067434 2023.

ROBERT RINGSEIS, JANINE KELLER AND KLAUS EDER Regulation of carnitine status in ruminants and efficacy of carnitine supplementation on performance and health aspects of ruminant livestock: a review, *archives of animal nutrition*, 72:1, 1-30, 2018.

ROBINSON M.D., ET AL. A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *bioinformatics* 26:139–40, 2010.

ROGERS J.A., DAVIS C.L. Rumen volatile fatty acid production and nutrient utilization in steers fed a diet supplemented with sodium bicarbonate and monensin. *j dairy sci.* jun;65(6):944-52, 1982.

ROSS B., BRADLEY K., NIJLAND M.J., Increased fetal colonic muscle contractility following glucocorticoid and thyroxine therapy: implications for meconium passage. *j matern fetal med*, 6(3):129-33.1997

ALHARTHI S. A., ABDULRAHMAN AND ZHOU, ZHENG AND LUCHINI, DANIEL AND LOOR, JUAN. Endocannabinoid network and proopiomelanocortin gene expression in peripartal bovine liver in response to rumen-protected methionine supplementation.. *Journal of Animal Science*. 94. 793. (2016).

DITTMER S., KOVACS Z., YUAN S.H. ET AL., , Tox3 is a neuronal survival factor that induces transcription depending on the presence of cited1 or phosphorylated creb in the transcriptionally active complex, *j cell sci*. 124 252–260. 2011.

IVES SE, TITGEMEYER EC, NAGARAJA TG, DEL BARRIO A, BINDEL DJ, HOLLIS LC. Effects of virginiamycin and monensin plus tylosin on ruminal protein metabolism in steers fed corn-based finishing diets with or without wet corn gluten feed. *J Anim Sci*. Nov;80 (11):3005-15 2002.

SANCHEZ R.I, KAUFFMAN F.C. Regulação do metabolismo xenobiótico no fígado. *toxicologia abrangente*.; 9: 109-128, 2010.

SANJEEB K S, ALINA F, NEHA T, ZSUZSA K, Tox3 plays a role in neuronal progenitor proliferation, *bba - gene regulatory mechanisms*, 2016.

OLIVEIRA JUNIOR, S.M., GERSON C., ALINE F.GOMES M. Copy number variations and genome- wide associations reveal putative genes and metabolic pathways involved with the feed conversion ratio in beef cattle. *journal of applied genetics*. 57.2006.

SHERMAN, B.T. M., HAO, J. QIU, X. ET AL. David: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists(2021 update). *nucleic acids research*, 2022.

SHUDAI LIN A. B., LINGZHAO FANG A. C., XIAOLONG KANG A D, Prolactin receptor signal transduction. *lupus* 10:706–718 2001

SILVESTRE, A. M. AND MILLEN, D. D. The 2019 brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. *revista brasileira de zootecnia* 2021

SINGH, A. B., A. SHARMA, AND P. DHAWAN. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *j. oncol.* 2010.

STEELE M.A., CROOMJ., KAHLER M., ALZAHAL O., Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. *am. j. physiol. regul. integr. comp. physiol.*;300: 1515-23, 2011.

SUN D., YIN Y., GUO C., LIU L. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanisms of rumen wall morphological and functional development induced by different solid diet introduction in a lamb model, **journal of animal science and biotechnology** , 10;12(1):33, 2021.

NAGARAJA T. G. AND TAYLOR M. B., Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives, **applied and environmental microbiology**, 53,7,1620-1625,1987.

TIWARI, S., MISHRA, M., SALEMI, M.R.et al. Gender-specific changes in energy metabolism and protein degradation as major pathways affected in livers of mice treated with ibuprofen. *Sci Rep*10, 3386 2020.

MARION C. B., PREUKSCHAT D., PATRICK-SIMON W., The adaptor protein fadd protects epidermal keratinocytes from necroptosis in vivo and prevents skin inflammation immunity 35, 572–582,28, 2011

VAN DER POLL T., KEOGH C.V., GUIRAO X. ET AL., Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia, the journal of infectious diseases, volume 176, issue 2, august, pages 439–444, 1997.

TOUFEKTCHANE., TOLEDO F. The Guardian of the Genome Revisited: p53 Downregulates Genes Required for Telomere Maintenance, DNA Repair, and Centromere Structure. *Cancers (Basel)*. May 6;10(5):135,2018.

TOURINÑO C., OVEISI F., LOCKNEY J. FAAH deficiency promotes energy storage and enhances the motivation for food. *int j obes (lond)*. mar;34(3):557-68, 2010.

TSUJI-TAMURA K., MORINO-KOGA S., SUZUKI S., OGAWA M. The canonical smooth muscle cell marker *α*1 is present in endothelial cells and is involved in angiogenesis. *j cell sci*. aug1;134(15), 2021.

VAN ITALLIE, C. M., E ANDERSON J.M. Claudins and epithelial paracellular transport. *annu. rev. physiol*. 68:403–429. 2006.

VARELLA, P. P. FORTE V. NEVES W.C. Citokines: a review. *rev. bras. alergía imunopatol* 24(4): 146-154, jul.-ago. 2001.

VIANA P.R.L, VIANA L.F., ARAÚJO G.H.M. et al. The macroscopic and microscopic description of ruminal lesions in feedlot bovine. *Ciênc anim bras* 2022.

KERN W., JOHN W.K., JEREMY R. ET AL. Transcriptome differences in the rumen of beef steers with variation in feed intake and gain, *gene*, volume 586, issue 1, pages 12-26, 2016.

WANG D.S., ZHANG R.Y., ZHU W.Y., Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and biogenic amines in the rumen of dairy cows. *livest. sci.*; 155:262-72, 2013.

WEI L., JIAN-XIN L., WARREN J L., IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of il-2 as a broad regulator of t helper cell differentiation, *current opinion in immunology*, volume 23, issue 5, pages 598-604. 2011.

WEI, B. Q., MIKKELSEN, T. S., MCKINNEY, M. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals, *journal of biological chemistry*, ,48,281,365669-36578, 2006.

XIANG R., ODDY V.H., ARCHIBALD A.L. ET AL. Epithelial, metabolic and innate immunity transcriptomic signatures differentiating the rumen from other sheep and mammalian gastrointestinal tract tissues. *PeerJ*. Mar 8;4:e1762; 2016.

YANG R., DUAN C., GUO Y. Sequence analysis and mRNA expression of prolactin receptor gene isoforms in different tissues of sheep during lactation and the post-weaning period. *PeerJ*. Jul 29;9:e11868, 2021.

YANG W., WU W., LIANG H.et al., Tox3 regulates the proliferation and apoptosis of colorectal cancer by downregulating rhob via the activation of the mapk pathway. *cell biol int*. jul;46(7):1074-1088, 2022.

YINGYU M.U., WANGPAN Q.I., TAO ZHANG, J. Z., Multi-omics analysis revealed coordinated responses of rumen microbiome and epithelium to high-grain-induced subacute rumen acidosis in lactating dairy cows, *mysistems*, *american society for microbiology*, volume 7, issue 1.2022.

YU G., WANG L.G., HAN Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. May;16(5):284-7, 2012.

YU J., XIAO F., ZHANG Q. ET AL. PRLR regulates hepatic insulin sensitivity in mice via stat5. *diabetes*. sep;62(9):3103-13, 2013.

ZACHUT M., KRA G., MOALLEM U. ET AL., Characterization of the endocannabinoid system in subcutaneous adipose tissue in periparturient dairy cows and its association to metabolic profiles. *plos one* 13(11): 2018

ZHANG Y., CAI W., LI Q., ET AL., Transcriptome analysis of bovine rumen tissue in three developmental stages. *front. genet*. 13:821406, 2022.

ZHANG N, JIN W, ZHOU S. ET AL. Hypothyroidism is associated with worse outcomes of hepatocellular carcinoma patients after liver transplantation. *Cancer Med.* Dec;7(12):5870-5878, 2018.

ZHAO, Z.D., ZAN, L.S., LI, A.N. ET AL. Characterization of the promoter region of the bovine long-chain acyl-coa synthetase 1 gene: roles of e2f1, sp1, klf15 and e2f4. *sci rep* 6, 19661, 2016.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 – Concentração e integridade do mRNA das amostras de papila ruminal de bovinos Nelore.

Amostra	Tratamento	[] pg/ μ L	Razão 260/280	Volume μ L	BioanalyzerRIN
Baia 6	2	760,90	2,08	3	6,90
Baia 8	1	1856,50	2,01	3	6,10
Baia 9	2	2082,30	2,00	3	8,10
Baia 10	1	2207,50	1,98	3	7,20
Baia 11	2	1587,70	2,14	3	8,20
Baia 12	1	1078,70	2,15	3	6,30
Baia 13	2	1450,30	2,16	3	5,10
Baia 16	2	1381,00	2,15	3	6,70
Baia 17	1	1373,10	2,14	3	7,10
Baia 18	1	1556,80	2,15	3	6,90
Baia 21	2	1859,90	2,14	3	7,60
Baia 23	1	1315,80	2,16	3	6,20
Baia 3	1	1055,60	2,17	3	9,50
Baia 5	2	1160,60	2,18	3	8,70
Baia 24	2	966,50	2,18	3	8,40
Baia 26	2	1178,70	2,17	3	6,90

Tabela S2 – Lista de todos os genes diferencialmente expressos obtidas em contraste de MON versus MONVM em bovinos Nelore consumindo dietas com alta inclusão de concentrado.

Genes	log2 Fold Change	FDR	Genes	log2 Fold Change	FDR
ADGRV1	0,932	0,028	ME1	0,560	0,028
AHNAK2	-0,618	0,084	MSC	-1,130	0,054
ASB11	-0,647	0,078	NMNAT2	-1,440	0,059
ATP11C	0,770	0,059	NUDT17	-0,779	0,084
BCL2A1	-0,881	0,054	PAPLN	0,648	0,055
C18H19orf84	-1,090	0,059	PENK	-1,590	0,051
CA12	0,788	0,078	PKIG	-0,849	0,086
CADPS	1,580	0,054	PRLR	0,811	0,064
CASS4	0,579	0,084	RAB32	-0,549	0,093
DC42EP2	2,110	,084	RAB4B	0,505	,078
CLCF1	-1,560	0,073	RAP2B	-1,010	0,037
CLDN3	-2,170	0,008	RBM3	-0,692	0,054
CLTB	-0,553	0,084	RHOD	-0,902	0,084
CNN1	-1,280	0,000	ROBO1	0,520	0,059
CPT1A	0,649	0,059	RPL12	-9,350	0,000
CROT	0,762	0,037	S100A11	-0,748	0,059
CSTB_1	-0,741	0,001	SERPINB10	0,501	0,028
CYSRT1	-1,140	0,059	SIGLEC10	-0,803	0,078
DES	-1,580	0,000	SLC16A1	0,585	0,059
E2F1	-0,684	0,037	SLC35D1	0,942	0,028
ECHDC3	0,855	0,003	SYDE2	1,070	0,004
EIF6	-0,745	0,084	TAGLN	-0,828	0,024
FAAH	-0,701	0,059	TCAP	-3,890	0,037
FADD	-1,030	0,084	THRB	0,768	0,038
FAM117B	0,851	0,060	TLCD4	0,710	0,077
FAM13A	0,519	0,059	TLE4	0,516	0,059
FAM25A	-1,210	0,059	TMEM184A	-0,596	0,084
FAM3A	-0,616	0,066	TNFRSF12A	-1,050	0,076
GREB1	0,928	0,100	TOX3	1,280	0,010
HS3ST1	-1,260	0,097	TPM2	-1,280	0,010
IL18BP	-1,400	0,009	TXNIP	0,610	0,078

