

TATHYANE RAMALHO SANTOS GIONBELLI

**NUTRIÇÃO MATERNA E SEXO FETAL SOBRE O DESENVOLVIMENTO
PRÉ-NATAL DE BOVINOS MISTIÇOS HOLANDÊS × GIR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G496n
2015

Gionbelli, Tathyane Ramalho Santos, 1984-
Nutrição materna e sexo fetal sobre o desenvolvimento
pré-natal de bovinos mestiços Holandês × Gir / Tathyane
Ramalho Santos Gionbelli. – Viçosa, MG, 2015.
xii, 69f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Cristina Mattos Veloso.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Vaca - Nutrição. 2. Vaca - Gestação. 3. Feto - Sistema
musculoesquelético. 4. Feto - Intestino - Morfologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.085

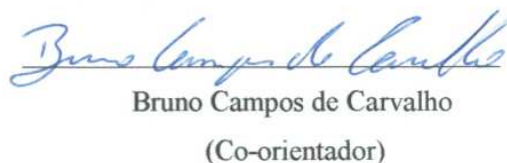
TATHYANE RAMALHO SANTOS GIONBELLI

**NUTRIÇÃO MATERNA E SEXO FETAL SOBRE O DESENVOLVIMENTO
PRÉ-NATAL DE BOVINOS MISTIÇOS HOLANDÊS × GIR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

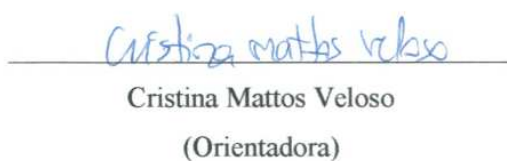
APROVADA: 12 de março de 2015.


José Domingos Guimarães


Bruno Campos de Carvalho
(Co-orientador)


Luciana Navajas Rennó


Bruna Rios Coelho Alves


Cristina Mattos Veloso
(Orientadora)

Em memória ao meu pai, Antônio Jarbas Ramalho dos Santos.

A meu marido Mateus, meu filho Antônio, minha mãe Maria das Graças, meu irmão Talles Antônio e minha irmã Tane Cristina, alicerces da minha vida.

Em especial a Mateus Pies Gionbelli, meu anjo da guarda.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por se fazer presente em todos os dias de minha vida, por ser meu amigo, meu amparo e minha força. Obrigada senhor, por fazer parte de minha vida!

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e, em especial, ao Departamento de Zootecnia, pelo apoio na realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

À professora Cristina Mattos Veloso, pela oportunidade, pela excelente orientação, confiança, simplicidade, paciência e amizade.

Ao pesquisador Bruno Campos de Carvalho, pela confiança e auxílio na construção deste trabalho.

A pesquisadora Bruna Rios Coelho Alves, pela disposição para participar da banca de defesa de tese.

Ao professor Marcos Inácio Marcondes, pelo apoio, confiança e disposição em ajudar.

Ao professor José Domingos Guimarães, pelo apoio, atenção e disposição em ajudar.

Ao professor Sebastião de Campos Valadares Filho, pelo apoio irrestrito, pela confiança e disposição em ajudar.

Ao professor Marcio Duarte, pela atenção, pelos ensinamentos, pelas excelentes ideias, pela paciência e amizade.

À professora Simone, pela atenção e apoio.

Aos funcionários do DZO: Natanael (Pum), Joécio, Dinei, Marcelo Cardoso, Zezé, Fabi, Fernanda, Celeste, Venâncio, Baiano, Mário, Rosana, Edson (informática), Vanor, Antônio, Divino e Seu Jorge, pela amizade, apoio e disposição em ajudar.

Aos funcionários da Fábrica de Ração, pelo auxílio na confecção das rações.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Zootecnia, pelo apoio, convívio e amizade.

A todos os estagiários, pela ajuda, apoio, amizade e companheirismo. Sem vocês, nada disso seria possível.

À Polyana, pelo companheirismo, confiança, ajuda e amizade.

À turma de Zootecnia 2005, pelos inesquecíveis momentos de alegria, pela amizade. Turma da qual sempre terei orgulho de ter feito parte.

Ao Mateus (Xuxu), por todo o aprendizado, companheirismo, amizade, carinho, dedicação, ajuda, força e amor. Juntos para sempre.

Ao meu filho Antônio, pela inocência, amor e por me fazer a pessoa mais feliz do mundo.

Aos meus pais, Maria das Graças e Antônio Jarbas (em memória), pelos ensinamentos de vida, pelo amor, pela dedicação, confiança, apoio e compreensão.

Ao meu irmão, Talles Antônio, pela alegria de viver, coragem, amizade, simplicidade e carinho.

A minha irmã Tane, Cristina, pelo carinho, companheirismo, ensinamentos, consultas e amizade.

A minha sogra, Ceci, meu sogro Valdir, meu cunhado Cristian (em memória) e minha cunhada Mariana, pela amizade, carinho, paciência, confiança, ajuda, apoio e exemplo de família.

A todos os meus familiares, que sempre me apoiaram e torceram por mim.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

TATHYANE RAMALHO SANTOS GIONBELLI, filha de Maria das Graças Santos Ramalho e Antônio Jarbas Ramalho dos Santos, nasceu em Teófilo Otoni, Estado de Minas Gerais, em 04 de março de 1984.

Em 2005, ingressou na Universidade Federal de Viçosa-UFV, onde obteve título de bacharel em Zootecnia, colando grau em 25 de julho de 2009.

Em agosto de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Fisiologia da Produção Animal. Em julho de 2011 tornou-se mestre em Zootecnia.

Em março de 2012 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na mesma instituição e na mesma linha de pesquisa, submetendo-se à defesa de tese em março de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
LITERATURA CITADA	9

Capítulo 1 – MATERNAL NUTRITION INTENSIFICATION AND FETAL SEX ON DEVELOPMENT OF SKELETAL MUSCLE OF BOVINE FETUSES ALONG GESTATION

Abstract	14
Resumo.....	16
/body.....	18
Results	20
Discussion	24
Materials and methods	27
References	31

Capítulo 2 – DESENVOLVIMENTO INTESTINAL FETAL AO LONGO DA GESTAÇÃO É AFETADO PELO SEXO E NUTRIÇÃO MATERNA EM BOVINOS

Resumo.....	43
Abstract	45
Introdução	47
Material e métodos.....	48
Resultados	53
Discussão	56
Conclusão.....	61
Literatura citada	61

CONCLUSÕES GERAIS	69
-------------------------	----

RESUMO

GIONBELLI, Tathyane Ramalho Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Nutrição materna e sexo fetal sobre o desenvolvimento pré-natal de bovinos mestiços Holandês × Gir.** Orientadora: Cristina Mattos Veloso. Coorientadores: Marcos Inácio Marcondes e Bruno Campos de Carvalho.

Vacas gestantes criadas em pasto são, frequentemente, submetidas à variação na oferta e qualidade da forragem, principalmente na época seca do ano, em função da grande variabilidade climática predominante no Brasil. Buscando contornar esse problema, tem-se adotado estratégias de suplementação em algumas fases da gestação. No entanto, informações sobre a fisiologia do desenvolvimento muscular, adiposo e intestinal fetal, nas diferentes fases da gestação de bovinos mestiços, são escassas. A gestação é o mais complexo estágio fisiológico de uma vaca, durante o ciclo produtivo. Vários desafios ocorrem no status fisiológico normal da fêmea bovina, para suportar a formação de um novo indivíduo da espécie. Para melhor entendimento da fisiologia do período gestacional, objetivando preencher lacunas existentes, foi conduzido um experimento com abate de vacas gestantes submetidas a dois tratamentos nutricionais e quatro tempos de gestação. Os resultados são aqui apresentados em dois capítulos. No primeiro capítulo, objetivou-se avaliar os efeitos do nível de alimentação materna e sexo fetal sobre o desenvolvimento do músculo esquelético de fetos bovinos, ao longo de diferentes estágios da gestação. Quarenta e quatro vacas multíparas, não lactantes, cruzadas Holandês x Gir com peso inicial médio de 480 ± 10 kg, foram alimentadas com alimentação restrita a 1,15% do peso corporal (CO, n = 24) ou *ad libitum* (ON, n = 20) com a mesma dieta. A dieta foi composta por silagem de milho (93%) e concentrado (7%). Onze vacas de cada tratamento dietético foram abatidas com 139, 199, 241 e 268 dias de gestação e os fetos necropsiados para avaliar o desenvolvimento do músculo *Longissimus dorsi*. O efeito sexo fetal também foi considerado, em esquema fatorial $2 \times 2 \times 4$, com dois níveis de nutrição materna (MN), dois gêneros fetais e quatro tempos de gestação (DG). O peso final das vacas foi maior ($P < 0,001$) em vacas ON do que em vacas CO. Modificações na expressão gênica do músculo esquelético de fetos foram observadas em função da MN, sexo fetal e DG, apesar da ausência de efeito da MN ($P = 0,330$) e sexo fetal ($P = 0,518$) no peso fetal. A expressão no músculo do mRNA dos

marcadores miogênicos β -catenina e MyoD foi maior em fetos do sexo masculino do que feminino, bem como a expressão de todos os marcadores adipogênicos avaliados (Zfp423, C/EBP α e PPAR), em três dos quatro marcadores fibrogênicos avaliados (Colágeno I, Colágeno III e Fibronectina) e no número de miócitos no músculo. No entanto, não houve efeito de sexo fetal sobre indicadores fenotípicos de adipogênese e fibrogênese. Efeitos marginais da MN foram observados na expressão de mRNA bem como nos indicadores fenotípicos de miogênese, adipogênese e fibrogênese no músculo esquelético de fetos bovinos. Foram observadas algumas interações entre MN e sexo fetal com DG para expressão gênica e evidências fenotípicas. Na fase intermediária da gestação (139 DG) a expressão de β -catenina e o número de miócitos foram maiores em fetos ON do que em fetos CO e nos machos do que nas fêmeas, mas essas diferenças não foram observadas nas fases posteriores de gestação. Observou-se o mesmo padrão de resultados para os marcadores adipogênicos Zfp423 e PPAR γ , que foram mais expressos em fetos ON do que em fetos CO, aos 139 dias, mas não em outros DG. O teor de gordura do músculo fetal, no entanto, não foi afetado pela MN e sexo fetal. Quase todos marcadores miogênicos, adipogênicos e fibrogênicos foram menos expressos na fase final do que na fase intermediária da gestação. A deposição de colágeno, gordura e teor de proteína bruta no músculo fetal, no entanto, foram maiores no final da gestação do que na fase intermediária. Em geral, a MN alterou a expressão gênica de alguns marcadores miogênicos, adipogênicos e fibrogênicos, na fase intermediária da gestação (maior em ON do que em CO), mas um possível efeito compensatório fez o efeito de MN não ser significativo no final da gestação, concordando com relatos prévios da literatura. Evidência do já conhecido maior desenvolvimento do músculo esquelético de machos na fase pós-natal também foi observada durante a fase fetal, em comparação com fetos do sexo feminino. No segundo capítulo, objetivou-se avaliar o efeito do nível alimentar materno (MN) e gênero fetal sobre o desenvolvimento intestinal de fetos bovinos em diferentes estágios da gestação. O manejo alimentar das vacas foi o mesmo descrito no primeiro capítulo. Os intestinos fetais foram coletados e analisados. A massa, comprimento e densidade intestinal fetal não foram afetados pela MN ($P \geq 0,260$). Observou-se interação entre a MN e o tempo de gestação para altura das vilosidades do jejuno ($P=0,006$) e íleo ($P < 0,001$). Fetos filhos de vacas ON tiveram maior altura de vilosidades intestinais no jejuno e íleo ($P < 0,10$) do que fetos filhos de vacas CO aos 139 dias de gestação. Entretanto, aos 199 dias de gestação, fetos filhos de vacas CO apresentaram maior altura de vilosidades no jejuno e

íleo ($P < 0,10$) do que fetos filhos de vacas ON. No entanto, aos 268 dias de gestação não foi observado efeito da MN sobre a altura de vilosidades ($P > 0,10$). Fetos fêmeas foram superiores a fetos machos para massa intestinal total ($P = 0,052$), massa do intestino delgado ($P = 0,093$), massa do intestino grosso ($P = 0,022$), massa intestinal relativa à massa corporal para o intestino delgado ($P = 0,017$), grosso ($P < 0,001$) e intestino total ($P = 0,003$), comprimento do intestino delgado ($P = 0,077$), densidade do intestino delgado ($P = 0,021$) e intestino total ($P = 0,009$) e altura de vilosidades no jejuno ($P = 0,001$) e íleo ($P = 0,010$). Conclui-se que MN altera a trajetória do desenvolvimento das vilosidades intestinais ao longo da gestação em fetos de vacas Holandês x Gir sem, no entanto, afetar o tamanho final das vilosidades. Fêmeas possuem maior massa intestinal, densidade intestinal e tamanho de vilosidades do que machos, durante a fase fetal.

ABSTRACT

GIONBELLI, Tathyane Ramalho Santos D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2015. **Maternal nutrition and fetal sex on fetal development of Holstein × Gyr cattle.** Adviser: Cristina Mattos Veloso. Co-advisers: Marcos Inácio Marcondes and Bruno Campos de Carvalho.

Pregnant cows raised on pasture are often subjected to variations in supply and quality of forage along the year, mainly on the dry season. This is effect occurs due to the high climate variability in Brazil. Aiming to solve this problem producers have been adopted feed supplementation during some stages of pregnancy. However, information on the physiology of muscle development, intramuscular adipose tissue and intestine at different stages of pregnancy are scarce in Zebu × Holstein crossbreed cattle. Pregnancy is the most complex physiological stage of a cow during the production cycle. Several challenges occur in the normal physiology status of the cow to support the formation of a new individual of the species. This experiment was conducted to better understand the physiology of gestation, aiming to fill gaps of knowledge. Pregnant cows were submitted to two nutritional treatments and slaughtered at four time points of gestation. The results are presented in two chapters. The first chapter aimed to evaluate the effects of maternal feeding level and fetal gender on the skeletal muscle development of bovine fetuses throughout different stages of gestation. Fourty-four multiparous, dry Holstein × Gyr cows with average initial body weight of 480 ± 10 kg were fed either of restricted feeding at 1.15% of body weight (CO, n=24) or *ad libitum* (ON, n=20) with the same diet. The diet was composed by corn silage (93%) and concentrate (7%). Eleven cows of each dietary treatment were slaughtered at 139, 199, 241 and 268 days of gestation and fetuses necropsied to evaluate the development of fetal muscle. The fetal gender effect was also considered in a $2 \times 2 \times 4$ factorial, with two maternal nutrition (MN) levels, two fetal sex and four time points of gestation (DG). Cows final weight was higher ($P < 0.001$) in ON cows than in CO cows. Modifications in gene expression of skeletal muscle of fetuses were observed in function of MN, fetal sex and DG despite the lack of effect of MN ($P = 0.330$) and fetal sex ($P = 0.518$) on fetal weight at necropsy. The muscle mRNA expression of myogenic markers β -Catenin and MyoD was greater in male than in female fetuses, as well the expression of all adipogenic markers evaluated (Zfp423, C/EBP α and PPAR γ), three of the four fibrogenic markers evaluated (Collagen I, Collagen III and Fibronectin) and the number of myocytes in muscle.

However, there were no differences of fetal sex on phenotypic indicators of adipogenesis and fibrogenesis. Marginal effects of MN were observed on mRNA expression as well in the phenotypic indicators of myogenesis, adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of cattle fetuses. Some interactions among MN and fetal sex with DG were observed for gene expression and phenotypic evidence. At the midgestation (139 DG) β -Catenin expression and myocytes number were greater in ON than in CO fetuses and in males than in females, but these differences were not observed at subsequent stages of gestation. The same pattern of results were observed for the adipogenic markers Zfp423 and PPAR γ , which were greater expressed in ON than in CO fetuses at 139 but not in others DG. Fat content of fetal muscle, however, was not affected by MN and fetal sex. Almost all myogenic, adipogenic and fibrogenic markers were less expressed at late gestation than in midgestation, however collagen deposition, fat and crude protein content of fetal muscle were greater at late gestation than in midgestation. In general, MN altered the gene expression of some myogenic, adipogenic and fibrogenic markers at midgestation (greater in ON than in CO) but some compensatory expression made the effect of MN not significant at late gestation, in accordance to previous literature reports. Already known evidence of greater skeletal muscle development of males was also observed during the fetal phase compared to female fetuses. In the second chapter the aim was to evaluate the effects of maternal feeding level MN and fetal gender on the intestinal development of bovine fetuses throughout different stages of gestation. The methodology was the same of the first chapter, however the fetal intestine was collected for analysis. The fetal gender effect was also considered in a 2 \times 2 \times 4 factorial, with two maternal feeding levels, two fetal gender and four stages of gestation. MN (P=0,330) and fetal gender (P=0,518) did not affect the fetal weight at slaughter. The mass, length and density of fetal intestines were not affected by MN (P \geq 0,260). Interaction between MN and stage of gestation was observed on the villi length of jejunum (P=0,006) and ileum (P<0,001). Villi length of jejunum and ileum was higher (P<0,10) in fetuses from ON-fed cows than in fetuses from CO-fed cows at 139 days of gestation. However, at 199 days of gestation, the villi length of jejunum and ileum of fetuses from CO-fed cows was higher than in fetuses from ON-fed cows. Despite these differences, MN did not affect villi length of jejunum and ileum at 268 days of gestation (P>0,10). Female fetuses were greater than male fetuses for total intestine mass (P=0,052), small intestine mass (P=0,093), large intestine mass (P=0,022), intestinal mass in proportion of body mass for small intestine

($P=0,017$), large intestine ($P<0,001$) and total intestine ($P=0,003$), small intestine length ($P=0,077$), small intestine density ($P=0,021$), total intestine density ($P=0,009$) and villi length of jejunum ($P=0,001$) and ileum ($P=0,010$). We conclude that MN affects the pathway of the development of fetal villi length throughout the gestation in fetuses from Holstein \times Gyr cows without, however, change the final villi length. Female had greater intestinal mass, density and villi length than males during the fetal phase in bovines.

INTRODUÇÃO GERAL

Apesar de ser um país predominantemente tropical, o Brasil possui grande variabilidade climática, refletindo nos regimes pluviométricos e, conseqüentemente, na quantidade e qualidade de alimentos disponíveis. Esse se torna um dos principais problemas da pecuária no Brasil e na América do Sul, sendo um dos pontos críticos na redução da eficiência de produção. Essa variação sazonal afeta grande parte das regiões brasileiras, conseqüentemente, vacas gestantes criadas em pasto, frequentemente, são submetidas à variação na oferta e qualidade da forragem, principalmente, na época seca do ano.

Buscando contornar esse problema, alguns pecuaristas têm adotado estratégias de suplementação para vacas gestantes, especialmente no terço final da gestação, quando ocorre a maior parte do crescimento fetal (Ferrell et al., 1976). Entretanto, alguns estudos recentes mostraram que a deficiência nutricional materna durante o início e meio da gestação, em ruminantes, pode causar redução do número de fibras e massa muscular da progênie, afetando o desempenho produtivo durante toda a vida do animal, mesmo que não tenha sido notada redução do peso ao nascimento (Du et al., 2010; Wu et al., 2006). Cabe ressaltar que é nesta fase que ocorre crescimento placentário máximo e organogênese fetal, os quais são acontecimentos críticos para o desenvolvimento do concepto (Funston et al., 2010).

Nos anos recentes, o aumento do número de estudos desenvolvidos nessa área levou à aplicação do tema “desenvolvimento fetal programado” ou “programação fetal” para animais de produção. O conceito de programação fetal surgiu a partir de dados epidemiológicos humanos, nos quais o baixo peso e a má nutrição materna foram relacionados com doenças nos filhos, tais como diabetes, derrames e hipertensão

(Barker et al., 2002). Esse conceito pode ser entendido como o resultado de mudanças específicas nos mamíferos, as quais ocorrem durante o desenvolvimento intra-uterino e alteram quantitativa e/ou qualitativamente a trajetória do seu desenvolvimento, com resultados que persistem por toda a vida do indivíduo (Duarte et al., 2012).

Nesse contexto, a compreensão da fisiologia do desenvolvimento fetal é de extrema importância. Por isso, estudos têm sido realizados com o objetivo de compreender os processos envolvidos no crescimento e desenvolvimento dos tecidos, uma vez que a produção de carne visa maximização do sistema. A partir desse conhecimento, torna-se possível a adoção de estratégias alimentares, durante os diferentes estágios da gestação, que possam resultar em incremento do desempenho da progênie, bem como da melhoria da qualidade da carne destes animais.

O componente principal da carne bovina é o tecido muscular, e o principal componente de um músculo são as fibras que o constituem. A massa muscular é, portanto, em grande parte, determinada pelo número (hiperplasia) e tamanho das fibras musculares (hipertrofia). A pesquisa sugere que os animais com um maior número de fibras musculares, de tamanho moderado conseguem produzir uma maior quantidade e qualidade de carne (Rehfeldt et al., 2004). O número de fibras musculares de um animal é definido, exclusivamente, durante o período pré-natal (Cossu & Borello, 1999), uma vez que as fibras são formadas durante a fase embrionária e fetal, época em que fatores de crescimento e de transcrição interagem, resultando no tecido muscular.

A formação das fibras musculares ocorre a partir de dois eventos distintos temporalmente. Inicialmente, ocorre a formação das miofibras primárias, durante o desenvolvimento embrionário. Essas miofibras são utilizadas como suporte para posterior formação das miofibras secundárias, que ocorre durante a fase fetal e que contribuem de forma majoritária para o aumento da massa muscular na fase pós-natal

(Beermann et al., 1978). A regulação deste processo envolve a ativação, proliferação e diferenciação de várias linhagens de células miogênicas e depende da expressão e atividade de fatores transcricionais, conhecidos como fatores de regulação miogênica (MRF). No embrião, o comprometimento das células do mesoderma somático com a linhagem muscular, inicia-se com ação sinalizadora oriunda de tecidos circundantes, tais como a notocorda e o tubo neural (Charge & Rudiniki, 2004). Estes sinais são responsáveis pela ativação de genes capazes de transformar células não musculares em células com fenótipo muscular.

No embrião a ação sinalizadora para o direcionamento das células do mesoderma para a linhagem muscular inicia com as proteínas Wnt/ β -catenina. Este sistema Wnt/ β -catenin é formado por várias proteínas, que transmitem sinais externos para dentro da célula, por meio de ligação ao receptor de membrana. Este complexo é responsável pela regulação dos fatores transcricionais Pax3 e Pax7. A ativação destes fatores promoverá a subsequente expressão dos genes responsáveis pela produção dos fatores reguladores da miogênese: Myf5 e Myod (Buckingham, 2001); que induzirão as células à linhagem miogênica. Parte dessas células (mioblastos) que expressam Myf5 e MyoD, saem do ciclo celular, tornando-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão dos MRFs miogenina e MRF4, os quais regulam a diferenciação dessas células em fibras musculares (Keren et al., 2006; Kollias & McDermott, 2008). Assim, ao final do processo de miogênese, os miócitos mononucleados se fundem para formar os miotubos e, no animal adulto, o músculo esquelético torna-se um tecido estável, caracterizado por fibras musculares multinucleadas (Schmalbruch & Lewis, 2000).

Durante o processo de miogênese, alguns mioblastos não se fundem e permanecem quiescentes entre a membrana plasmática da fibra muscular e a lâmina basal, sendo denominados de células satélites ou mioblastos adultos indiferenciados

(Charge & Rudiniki, 2004). Quando estimulada, a célula satélite é ativada, prolifera e funde-se com a fibra muscular pré-existente. Os núcleos derivados das células satélites começam a sintetizar proteínas musculares específicas que aumentam o volume das fibras musculares por meio da formação de novos sarcômeros, em posição externa às miofibrilas existentes, culminando no aumento da massa muscular por hipertrofia (Goldspink et al., 1972). Entretanto, além de células miogênicas, uma porcentagem das células satélites pode se diferenciar em adipócitos ou fibroblastos (Aguiari et al., 2008; Kuang et al., 2007).

Alguns trabalhos de pesquisa reportaram a nutrição materna como sendo um dos principais fatores que afetam a miogênese em ruminantes e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento muscular fetal, com efeitos que persistem por toda vida do animal (Godfrey & Barker, 2000; Quigley et al., 2005; Wu et al., 2006; Zhu et al., 2006), mesmo quando não é verificada alteração no peso ao nascimento (Ford et al., 2007; Martin et al., 2007; Larson et al., 2009). O músculo esquelético tem menor prioridade na partição de nutrientes durante o desenvolvimento fetal, quando comparado a órgãos como cérebro, coração e fígado fazendo com que este tecido apresente grande vulnerabilidade quanto à disponibilidade de nutrientes (Zhu et al., 2006)

Em pesquisa realizada por Zhu et al. (2006) quando se restringiu em 50% das exigências de ovinos em gestação, de acordo com o NRC (1985) entre o 28^o e o 78^o dias de gestação, foi observada redução do número total de fibras musculares no músculo *Longissimus dorsi* de cordeiros abatidos aos oito meses de idade.

Além do número e tamanho de fibras musculares, a presença de gordura intramuscular (marmoreio) é, também, um dos fatores de valorização da carne bovina, sendo altamente demandada pelo mercado consumidor por ser responsável, principalmente, pela suculência e palatabilidade (Du et al., 2010). A adipogênese intra-

muscular, em bovinos, também tem início durante a fase pré-natal (Du et al., 2010) e conforme abordado anteriormente, os adipócitos tem origem do mesmo *pool* de células mesenquimais que as fibras musculares, sendo que parte dessas células presentes no tecido muscular esquelético fetal diferencia-se em adipócitos, formando sítios para deposição de gordura no músculo do neonato (Tong et al., 2009). A adipogênese é regulada por fatores de transcrição, tais como C/EBP (*Enhancer binding protein*) e PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ*). Alguns trabalhos de pesquisa avaliaram esses fatores transcricionais e evidenciaram que a adipogênese, em animais ruminantes, inicia-se concomitantemente com a miogênese secundária, no terço médio da gestação (Fève, 2005; Gnanalingham et al., 2005; Muhlhausler et al., 2007; Du et al., 2010). Sendo assim, a adoção de nutrição materna adequada, durante a gestação, pode resultar em maior número de adipócitos, em função do aumento do comprometimento de células mesenquimais com a adipogênese, acarretando maior quantidade de gordura de marmoreio na carne da progênie. Em um estudo recente realizado por Underwood et al.,(2010), foi avaliada a qualidade da carne de novilhos oriundos de matrizes mantidas em pastagem, e que foram submetidas ou não a estresse nutricional por sessenta dias, durante o terço médio da gestação. Os autores verificaram maior peso ao abate, maior presença de gordura subcutânea na carcaça, maior teor de gordura intramuscular e menores valores de força de cisalhamento na carne de novilhos nascidos de matrizes que não sofreram estresse nutricional durante a gestação.

Dessa forma, percebe-se que o crescimento dos tecidos é um processo dinâmico e a formação das fibras musculares ocorre concomitantemente com a formação de adipócitos e fibroblastos, que, juntos, constituem a estrutura básica do tecido muscular esquelético. Assim, uma vez que os miócitos, adipócitos e fibroblastos são oriundos do mesmo *pool* de células mesenquimais, a definição e avaliação dos mecanismos

regulatórios da diferenciação destas células constituem-se num dos pontos-chave para a avaliação e o entendimento do desenvolvimento do tecido muscular e adiposo, durante a fase pré-natal.

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo em tempo real (qPCR) tem sido amplamente utilizada, com grande eficiência, para avaliar a ação dos fatores transcricionais, sendo está um dos mais confiáveis métodos para análise de expressão gênica (Yuan et al., 2006)

Seus resultados baseiam-se na medida de produtos gerados durante cada um dos ciclos do processo de PCR, os quais são diretamente proporcionais à quantidade do molde presente no início do processo. Por meio dele é possível medir a quantidade do produto de PCR ainda na fase, exponencial, pois, somente nessa fase é possível estimar a quantidade do molde utilizado inicialmente (Ginzinger, 2002). Dois diferentes métodos de análise são utilizados para análises de PCR em tempo real: quantificação absoluta e quantificação relativa. A primeira determina o número de cópias do transcrito de interesse, baseado numa curva padrão, enquanto o segundo descreve a diferença de expressão entre dois grupos, no qual, geralmente, se usa um grupo controle ou referência (Livak & Shimittigen, 2001). No caso de quantificação relativa, a escolha correta dos genes de referência para normalizar a expressão do gene-alvo em PCR em tempo real é essencial para refletir verdadeiramente o processo biológico (Robinson et al., 2007). Em trabalho recente de validação de genes de referência especificamente em músculo bovino. Perez et al. (2008) testaram 10 genes (18S, GAPDH, ACTB, B2M, RPII, UBC, CASC3, HMBS, SF3A1, EEF1A2) e verificaram que os três últimos apresentaram-se mais consistentes para uso como genes para controle endógeno.

Estudos recentes têm demonstrado que as diferenças obtidas na progênie de fêmeas submetidas a diferentes níveis nutricionais, durante a gestação, podem ser

explicadas não somente por alterações do desenvolvimento do tecido muscular e adiposo, mas, também, por alterações do desenvolvimento do trato gastrointestinal (Duarte et al., 2013; Wang et al., 2008; Wu et al., 2006).

Em ruminantes, a absorção de macromoléculas intactas de imunoglobulina do leite materno representa a principal forma de aquisição de imunidade pós-natal. Essa absorção ocorre através do epitélio intestinal, sendo possível, somente, por cerca de 24 horas após o nascimento do neonato. Dessa forma, o adequado desenvolvimento do trato gastrintestinal, durante as fases intra-uterinas, é fundamental para se reduzir a morbidade e mortalidade neonatal. Reduzida aquisição de imunidade, bem como alterações no desenvolvimento do trato gastrintestinal, que prejudiquem a absorção de nutrientes, podem afetar, permanentemente, o desempenho da progênie e a eficiência do uso de nutrientes (Duarte et al., 2013).

Alguns estudos têm demonstrado que os fetos oriundos de matrizes submetidas à restrição alimentar, durante o início e meio da gestação, diminuíram o crescimento do trato gastrintestinal (Trahair et al., 1997; Wang et al., 2008) e, em alguns casos, mesmo com intervenção nutricional pós-natal, o crescimento reduzido do trato gastrintestinal provocou alterações permanentes nas funções gastrintestinais, tais como a permeabilidade epitelial, por toda a vida do animal (Trahair et al., 1997).

Em condições tropicais, existem alguns trabalhos relatando que alterações na nutrição materna, durante a gestação, em função, principalmente, da sazonalidade de produção forrageira, afetam o peso dos bezerros ao nascimento e ao desmame (Ferraz Filho, 1996; Gregory et al., 1991; Souza et al., 1994a; Souza et al., 1994b). Esses estudos, entretanto, levam em consideração, apenas, variáveis de desempenho animal como peso ao nascimento e ao desmame. Não são encontrados, na literatura nacional, resultados de pesquisas com bovinos, que objetivaram avaliar os eventos, em nível

celular, que ocorrem ao longo do desenvolvimento fetal devido às alterações ambientais, tais como a nutrição materna, em diferentes estágios da gestação. Embora existam alguns trabalhos envolvendo programação fetal em bovinos na literatura mundial, nenhum utilizou animais mestiços europeu × zebu criados em condições tropicais, além de que os resultados obtidos ainda são inconclusivos para explicar com clareza, os mecanismos de controle do desenvolvimento celular na fase pré-natal (Duarte et al., 2012). Da mesma forma, os trabalhos nos quais o desenvolvimento do trato gastrintestinal foi avaliado como função da nutrição materna, em bovinos (Duarte et al., 2013; Meyer et al., 2010), apesar de evidenciarem algumas diferenças no desenvolvimento do trato gastrintestinal fetal como função da nutrição materna, não definem estratégias de manejo nutricional materno durante a gestação e salientam a necessidade da realização de mais estudos na área.

Assim sendo, o conhecimento e entendimento dos mecanismos que afetam o desenvolvimento dos tecidos muscular e adiposo e do trato gastrintestinal, durante a fase pré-natal, como função do nível alimentar a que são submetidas as matrizes durante a gestação, poderão oferecer suporte ao desenvolvimento de tecnologias de produção mais eficientes e dar base científica para o direcionamento das decisões a serem tomadas no meio produtivo da carne bovina.

Diante disso, este estudo objetivou avaliar o efeito do nível alimentar materno e gênero fetal sobre o desenvolvimento do músculo esquelético e do intestino de fetos bovinos em diferentes estágios da gestação.

LITERATURA CITADA

- AGUIARI, P.; LEO, B.; ZAVAN, V., et al. High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. In: National Academy of Science, 105.2008, USA. **Anais**. USA: p.1226-1231, 2008.
- BARKER, D. J., J. G. Eriksson, T. Forsen, and C. Osmond. Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis. *Int. Journal of Epidemiology*. 31:1235-1239, 2002.
- BEERMANN, D. H.; CASSENS, R. G.; HAUSMAN, G. J. A Second Look at Fiber Type Differentiation in Porcine Skeletal Muscle. **Journal of Animal Science**, v.46, n.1, p.125-132, 1978.
- BUCKINGHAM, M. Skeletal muscle formation in vertebrates. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.11, n.4, p.440-448, 2001.
- CHARGE, S. B. P.; RUDINIKI, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiology Reviews**, v.84, n.1, p.209-238, 2004.
- COSSU, G.; BORELLO, U. Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. **EMBO Journal**, v.18, n.24, p.6867-6872, 1999.
- DU, M.; TONG, J.; ZHAO, J., et al. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. **Journal of Animal Science**, v.88, n.13, p.E51-60, 2010.
- DUARTE, M.S., PAULINO, P.V.R., DU, M. Fetal programming in beef cattle: how to optimize performance and carcass value in early life stages. In: Valadares Filho, S.C., Paulino, M.F., Paulino P.V.R. (Ed.), VIII SIMCORTE. **Anais...** Grafica Suprema, Viçosa, pp. 123-139, 2012.
- DUARTE, M.S.; GIONBELLI, M.P.; PAULINO, P.V.R. et al. Effects of maternal nutrition on development of gastrointestinal tract of bovine fetus at different stages of gestation. **Livestock Science**, v.153, n.1, 2013.
- FERRELL, C. L.; GARRETT, W. N.; HINMAN, N. Growth, development and composition of the udder and gravid uterus of beef heifers during pregnancy. **Journal of Animal Science**, v.42, n.6, p.1477-1489, 1976.
- FÈVE, B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.19, n.4, p.483-499, 2005.
- FORD, S. P.; HESS, B. W.; SCHWOPE, M. M., et al. Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. **Journal of Animal Science**, v.85, n.5, p.1285-1294, 2007.
- FUNSTON, R. N.; LARSON, D.M.; VONNAHME, k. A. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: Implications for beef cattle production. **Journal of Animal Science**, v 88, n.13, E205-215, 2010.

- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, n.6, p.503-512, 2002.
- GNANALINGHAM, M. G.; MOSTYN, A.; SYMONDS, M. E., et al. Ontogeny and nutritional programming of adiposity in sheep: potential role of glucocorticoid action and uncoupling protein-2. **AJP Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.289, n.5, p.R1407-1415, 2005.
- GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. Fetal nutrition and adult disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.5, p.1344S-1352, 2000.
- GOLDSPINK, G.; WILKES, D.; STEVEN, E. **Myosin expression during ontogeny post-hatching growth and adaptation**. Academic Press: London, 1972. p.
- KEREN, A.; TAMIR, Y.; BENGAL, E. The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.252, n.1-2, p.224-230, 2006.
- KOLLIAS, H. D.; MCDERMOTT, J. C. Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.104, n.3, p.579-587, 2008.
- KUANG, S.; KURODA, K.; LE GRAND, F., et al. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. **Cell**, v.129, n.5, p.999-1010, 2007.
- LARSON, D. M.; MARTIN, J. L.; ADAMS, D. C., et al. Winter grazing system and supplementation during late gestation influence performance of beef cows and steer progeny. **Journal of Animal Science**, v.87, n.3, p.1147-1155, 2009.
- MEYER, A.M., REED, J.J., VONNAHME, K.A. et al. Effects of stage of gestation and nutrient restriction during early to mid-gestation on maternal and fetal visceral organ mass and indices of jejunal growth and vascularity in beef cows. **Journal of Animal Science**, v.88, p.2410-2424, 2010.
- MUHLHAUSLER, B. S.; DUFFIELD, J. A.; MCMILLEN, I. C. Increased Maternal Nutrition Stimulates Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ , Adiponectin, and Leptin Messenger Ribonucleic Acid Expression in Adipose Tissue before Birth. **Endocrinology**, v.148, n.2, p.878-885, 2007.
- PEREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Molecular Biology**, v.9, p.79, 2008.
- QUIGLEY, S. P.; KLEEMANN, D. O.; KAKAR, M. A., et al. Myogenesis in sheep is altered by maternal feed intake during the peri-conception period. **Animal reproduction science**, v.87, n.3, p.241-251, 2005.
- REHFELDT, C.; FIEDLER, I.; STICKLAND, N.C. Number and size of muscle fibres in relation to meat production. In: te PAS, M.F.W.; EVERTS, M.E.; HAAGSMAN, H.P. (Ed). **Muscle Development of Livestock Animals: Physiology, Genetics and Meat Quality**. 1ed. Cambridge: CABI Publishing, 2004, p.1-38.

- ROBINSON, T. L.; SUTHERLAND, I. A.; SUTHERLAND, J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.115, n.1-2, p.160-165, 2007.
- SCHMALBRUCH, H.; LEWIS, D. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. **Muscle & Nerve**, v.23, n.4, p.617-626, 2000
- TONG, J. F.; YAN, X.; ZHU, M. J., et al. Maternal obesity downregulates myogenesis and {beta}-catenin signaling in fetal skeletal muscle. **Animal Journal Physiology Endocrinol Metabolism**, v.296, n.4, p.E917-924, 2009.
- TRAHAIR, J.F., DEBARRO, T.M., ROBINSON, J. et al. Restriction of nutrition in utero selectively inhibits gastrointestinal growth in fetal sheep. **Journal of Nutrition**, v.127, p.637–641, 1997.
- UNDERWOOD, K. R.; TONG, J. F.; PRICE, P. L., et al. Nutrition during mid to late gestation affects growth, adipose tissue deposition, and tenderness in cross-bred beef steers. **Meat Science**, v.In Press, Corrected Proof, 2010.
- WANG, J., CHEN, L., LI, D. et al. Intrauterine growth restriction affects the proteomes of the small intestine, liver, and skeletal muscle in newborn pigs. **Journal of Nutrition**, v.138, p.60–66, 2008.
- WU, G.; BAZER, F. W.; WALLACE, J. M., et al. BOARD-INVITED REVIEW: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. **Journal of Animal Science**, v.84, n.9, p.2316-2337, 2006.
- YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F., et al. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v.7, p.85, 2006.
- ZHU, M. J.; FORD, S. P.; MEANS, W. J., et al. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **The Journal of Physiology**, v.575, n.1, p.241-250, 2006.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-000 – Telefone: (31) 3899.2262 – Fax: (31) 3899.2275 – e-mail: dzo@ufv.br

Comitê de Ética para Uso de Animais/DZO

Viçosa, 2 de abril de 2013

CERTIFICADO

O Comitê de Ética para Uso de Animais do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa certifica que o **processo nº 14/2013**, intitulado “**Efeito do nível de alimentação materna sobre o desenvolvimento fetal de bovinos mestiços Holandês × Gir**”, coordenado pelo **Prof(a). Cristina Mattos Veloso**, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por este Comitê em **02/Abr/2013**.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use of Animal Science Department/Universidade Federal de Viçosa certify that the **process number 14/2013**, named “”, coordinated by **Prof(a). Cristina Mattos Veloso**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Committee approved this process on **Apr, 2st, 2013**.

Marcos Inácio Marcondes
Presidente do CEUA/DZO/UFV

OBS.:

**O capítulo 1, apresentado a seguir, foi escrito na língua inglesa e está apresentado de acordo com as normas da revista PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences (exceto para presença de resumo em português).*

***O capítulo 2, apresentado em seguida, foi escrito na língua portuguesa e está apresentado de acordo com as normas da revista Journal of Animal Science.*

CAPÍTULO 1

Maternal nutrition intensification and fetal sex on development of skeletal muscle of bovine fetuses along gestation

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of maternal feeding level and fetal gender on the skeletal muscle development of bovine fetuses throughout different stages of gestation. Forty-four multiparous, dry Holstein × Gyr cows with average initial body weight of 480 ± 10 kg were fed either restricted feeding at 1.15% of body weight (CO, n=24) or *ad libitum* (ON, n=20) with the same diet. The diet was composed by corn silage (93%) and concentrate (7%). Eleven cows of each dietary treatment were slaughtered at 139, 199, 241 and 268 days of gestation and fetuses necropsied to evaluate the development of fetal muscle. The fetal sex effect was also considered in a 2×2×4 factorial, with two maternal nutrition (MN) levels, two fetal sex and four time points of gestation (DG). Cows final weight was higher ($P<0.001$) in ON cows than in CO cows. Modifications in gene expression of skeletal muscle of fetuses were observed in function of MN, fetal sex and DG despite the lack of effect of MN ($P=0.330$) and fetal sex ($P=0.518$) on fetal weight at necropsy. The muscle mRNA expression of myogenic markers β -Catenin and MyoD was greater in male than in female fetuses, as well the expression of all adipogenic markers evaluated (Zfp423, C/EBP α and PPAR γ), three of the four fibrogenic markers evaluated (Collagen I, Collagen III and Fibronectin) and the number of myocytes in muscle. However, there were no differences of fetal sex on phenotypic indicators of adipogenesis and fibrogenesis. Marginal effects of MN were observed on mRNA expression as well in the phenotypic indicators of myogenesis, adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of cattle fetuses. Some interactions among MN and fetal sex with DG were observed for gene expression and phenotypic evidence. At the midgestation (139 DG) β -Catenin expression and myocytes number were greater in ON than in CO fetuses and in males than in females, but these differences were not observed at subsequent stages of gestation. The same pattern of results were observed for the adipogenic markers Zfp423 and PPAR γ , which were greater expressed in ON than in CO fetuses at 139 but not in others DG. Fat content of fetal muscle, however, was not affected by MN and fetal sex. Almost all myogenic,

adipogenic and fibrogenic markers were less expressed at late gestation than in midgestation, however collagen deposition, fat and crude protein content of fetal muscle were greater at late gestation than in midgestation. In general, MN altered the gene expression of some myogenic, adipogenic and fibrogenic markers at midgestation (greater in ON than in CO) but some compensatory expression made the effect of MN not significant at late gestation, in accordance to previous literature reports. Already known evidence of greater skeletal muscle development of males was also observed during the fetal phase compared to female fetuses.

Keywords: adipogenesis, fetal programming, fibrogenesis, myogenesis, sex-biased, Zebu

Intensificação da nutrição materna e sexo fetal sobre o desenvolvimento do músculo esquelético de fetos bovinos ao longo da gestação

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do nível de alimentação materna e sexo fetal sobre o desenvolvimento do músculo esquelético de fetos bovinos ao longo de diferentes estágios da gestação. Quarenta e quatro vacas multíparas, não lactantes cruzadas Holandês x Gir com peso inicial médio de 480 ± 10 kg foram alimentadas ou com alimentação restrita em 1,15% do peso corporal (CO, n = 24) ou *ad libitum* (ON, n = 20) com a mesma dieta. A dieta foi composta por silagem de milho (93%) e concentrado (7%). Onze vacas de cada tratamento dietético foram abatidas com 139, 199, 241 e 268 dias de gestação e os fetos necropsiados para avaliar o desenvolvimento do músculo fetal. O efeito sexo fetal também foi considerado, em esquema fatorial $2 \times 2 \times 4$, com dois níveis de nutrição materna (MN), dois gêneros fetais e quatro tempos de gestação (DG). O peso final das vacas foi maior ($P < 0,001$) em vacas ON do que em vacas CO. Modificações na expressão gênica do músculo esquelético de fetos foram observadas em função da MN, sexo fetal e DG, apesar da ausência de efeito da MN ($P = 0,330$) e sexo fetal ($P = 0,518$) no peso fetal. A expressão do mRNA do músculo dos marcadores miogênicos β -catenina e MyoD foi maior no sexo masculino do que em fetos do sexo feminino, bem como a expressão de todos os marcadores adipogênicos avaliados (Zfp423, C/EBP α e PPAR), em três das quatro marcadores fibrogênicos avaliados (Colágeno I, Colágeno III e Fibronectina) e no número de miócitos no músculo. No entanto, não houve efeito de sexo fetal sobre indicadores fenotípicos de adipogênese e fibrogênese. Efeitos marginais da MN foram observadas na expressão de mRNA bem como nos indicadores fenotípicos de miogênese, adipogênese e fibrogênese no músculo esquelético de fetos bovinos. Foram observadas algumas interações entre MN e sexo fetal com DG para expressão gênica e evidências fenotípicas. Na fase intermediária da gestação (139 DG) a expressão de β -catenina e o número de miócitos foi maior em fetos ON do que em fetos CO e nos machos do que nas fêmeas, mas essas diferenças não foram observadas nas fases posteriores de gestação. Observou-se o mesmo padrão de resultados para os marcadores adipogênicos Zfp423 e PPAR γ , que foram mais expressos em fetos ON do que em fetos CO aos 139 dias, mas não em outros DG. O teor de gordura do músculo fetal, no entanto, não foi afetado pelo MN e

sexo fetal. Quase todos marcadores miogênicos, adipogênicos e fibrogênicos foram menos expressos na fase final do que na fase intermediária da gestação. A deposição de colágeno, gordura e teor de proteína bruta no músculo fetal, no entanto, foram maiores no final da gestação do que na fase intermediária. Em geral, MN alterou a expressão gênica de alguns marcadores miogênicos, adipogênicos e fibrogênicos na fase intermediária da gestação (maior em ON do que em CO), mas um possível efeito compensatório fez o efeito de MN não ser significativo no final da gestação, concordando com relatos prévios da literatura. Evidência do já conhecido maior desenvolvimento do músculo esquelético de machos na fase pós-natal também foi observada durante a fase fetal, em comparação com fetos do sexo feminino.

Palavras-chave: adipogênese, fibrogênese, miogênese, programação fetal, viés-sexual, Zebu

/body Balance greenhouse gas (GHG) mitigation, forest protection, and agricultural growth by promoting agricultural intensification have been focus of studies in many emerging economies, like Brazil (1). The development of policies that benefit land sparing in these countries would be very important from the point of view of environmental issue by prevent deforestation (2). The application of land sparing policies has been proved to increase productivity of agricultural systems making them more competitive than lower productive agricultural systems and to reduce GHG emissions and/or deforestation (3). Brazil had the greatest forests net loss in the world over the period of 1990-2010 (4) and the expansion of cattle ranching areas is related to the deforestation problem (5). By balancing GHG mitigation Brazil could be a template for many other emerging economies in the world. In a recent study Cohn et al. (3) create two different hypothetic economic model of global land use scenarios from 2010 to 2030 asking if intensification of pasture-based cattle ranching in Brazil could reduce global deforestation and mitigate global GHG emissions. The authors modeled a control scenario compared to the application of two land sparing policies, being either a tax on cattle from conventional pasture or a subsidy for cattle from semi-intensive pasture. Cohn et al. (3) found that both policies could achieve considerable sparing of forests and abatement of GHG with, significant increase of productivity.

In the same way, it can be cited a tremendous amount of research supporting the benefits of pasture-based cattle ranching intensification by increasing productivity and efficiency of use of pasture by growing animals (6-11). However, although represent about 42% of the total herd, the breeding herd did not received deserved interest along the last decades (12). But this situation has changed, due to the recent interest of scientists from tropical regions on fetal programming of cattle. Considerably research has shown that maternal nutrition during pregnancy can change intestinal (13-18) and

muscular (19-22) development of the ruminants offspring with effects that can be permanent to the entire life of the animal (21, 23). In tropical regions such as Brazil, since is pasture-based, the cattle production suffer the effects of distribution and seasonal variation in quantity and quality of forage along the year. In addition, the rainy season and better availability of good sources of food occurs when cows are in the breeding season, pregnant cows usually experience feed restriction during mid to late gestation period, which overlaps with the dry season in most of the tropical cattle production areas. Trying to minimize the effects of dry season on the reproduction of cows, when producers of tropical regions supplement pregnant cows (not so frequent), they do at the late gestation, when most of fetal growth occurs (24, 25). However, it has been proved that nutritional restriction during midgestation can cause reduction of muscle fiber number and muscle mass, and consequently affecting performance and meat quality of progeny (20), even when no difference is observed on birth weight of the offspring (21, 23). In the other hand, evidence of enhancement of adipogenic markers in skeletal muscle was shown in fetuses from overnourished cows (19).

Thus, based on these two considerations (environmental effect of intensification of pasture-based cattle ranching and potential effects on offspring development due to intensification of maternal nutrition) we investigate the effects of maternal nutrition intensification on fetal modifications of development of skeletal muscle in cattle by overnourishing (**ON**) cows in comparison of a control treatment (**CO**) where cows were fed the same diet of ON cows but at a level necessary to maintain their body condition.

However, another point to consider in a study like this is that emerging countries still have little genetically improved cattle herds, since the rapid expansion of livestock usually brings attractive prices, which make the genetic specialization less attractive than the herd size increase. Thus, in these countries, generally major proportion of beef

production is based on native cattle or dual purpose herds (10), where cows are used to produce milk, reposition heifers and males for fattening/finishing (26, 27). These dual purpose cattle raised in tropical regions are generally native or Zebu cattle crossed with specialized dairy breeds, like Holstein (28). In this case, Zebu breeds (*Bos indicus*) are important because its tolerance to heat and parasites, its rusticity, and its adaptation to the tropics (29, 30). Based on this, we opted to use dual purpose cattle as animal model in this study (Holstein × Gyr cows). Gyr is the Zebu breed mostly crossed with Holstein in Brazil (26, 28, 30).

In this study we also investigate the effects of fetal sex and its interactions with maternal nutrition (**MN**) and days of gestation (**DG**) on skeletal muscular development. To achieve the evaluations at different stages of gestation, cows and its fetuses were necropsied at 139, 199, 241 and 268 days of gestation, which represents 50, 70, 85 and 95% of gestation length (27) and 18, 31, 73 and 96% of gravid uterus growing (25), respectively. We investigate the mRNA gene expression and phenotypic indicators of myogenesis, adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of bovine fetuses to evaluate the potential impacts of MN and fetal sex along the gestation.

RESULTS

Maternal and fetal weight. From the forty-four cows used in this experiment, one had twin pregnancy (2.3%) and two had abortions (4.5%). Thus, the results presented represent data from 41 single and healthy pregnancies. Overnourished cows were heavier ($P < 0.001$) than CO cows at slaughter (Table 1), showing the efficacy of maternal nutrition treatment application. The average daily dry matter intake (DMI) was, respectively, 6.38 ± 0.32 (mean \pm SE) and 11.24 ± 0.37 kg/day (31). The fetal sex did not affect cow live weight at slaughter ($P = 0.976$). Interactions between nutritional

treatment, fetal sex and DG were not observed ($P \geq 0.557$). Fetal weight (Table 1) was affected by days of gestation ($P < 0.001$) but not by fetal sex. Thus, it can be noted that the results of the effect of maternal nutrition, fetal sex and days of gestation on muscular development of fetus occurred independently of fetal size.

Gene expression of myogenic markers and phenotypic indicators of myogenesis.

The mRNA expression for *Cadherin-associated protein, $\beta 1$* (β -catenin) was significantly affected by all fixed effects evaluated (Table 2). The analysis of main effects showed greater expression of β -catenin in the skeletal muscle of fetuses from ON-fed cows than in fetuses from CO-fed cows ($P = 0.035$) and in males compared to females ($P = 0.003$). However, interactions between MN and DG showed that β -catenin mRNA expression was greater in ON fetuses only at 139 days of pregnancy whereas was similar between fetuses from both MN groups in the subsequent stages of pregnancy. Another significant interaction for β -catenin mRNA expression was observed between fetal sex and DG ($P = 0.054$), where gene expression was greater in male fetuses than female fetuses at 139 days of gestation ($P < 0.10$) but no in the subsequent periods ($P > 0.10$). Similar values of mRNA expression for *Myogenic differentiation I* (MyoD; $P = 0.508$) and *Myogenin* (MyoG; $P = 0.320$) were observed among ON and CO fetal muscle (Table 2). MyoD was 16% greater expressed in male fetal muscle than in female ($P = 0.033$), whereas MyoG expression was not affected by fetal sex ($P = 0.120$). No interactions among the fixed effects evaluated were observed ($P \geq 0.122$) on MyoD and MyoG mRNA expression. The three myogenic markers evaluated were less expressed in fetal muscle at late gestation compared to middle gestation ($P \leq 0.002$, Table 2).

Crude protein (**CP**) content of fetal muscle (g/kg) was greater ($P=0.051$) in fetuses from ON cows compared to those from CO cows and increased ($P<0.001$) along the gestation (Table 2), being 78% greater at 268 days of gestation compared to 139 days. Fetal sex had no effect ($P=0.849$) on CP content of fetal muscle. However, different results were observed for the number of myocytes in fetal skeletal muscle (Table 2). The number of muscle cells was in average 10% greater ($P=0.009$) in males than in females in a same area. An interaction among MN and DG ($P=0.091$, Table 2) revealed that fetuses from ON cows had greater ($P<0.10$) number of myocytes at 139 days of gestation (Figure 1) but this phenotypic indicator of myogenesis was similar ($P>0.10$) between the both MN groups along the subsequent stages of gestation (Table 2).

Gene expression of adipogenic markers and phenotypic quantification of adipogenesis. The mRNA expression of early adipogenic marker *zinc finger protein 423* (*Zfp423*) was affected by interactions between the main effects evaluated. Interaction between MN and DG ($P=0.001$) showed that *Zfp423* was greater expressed in muscle of fetuses from ON-fed cows than in those from CO-fed cows at 139 days of gestation ($P<0.10$) but not in the subsequent stages of gestation ($P>0.10$). Similarly, *Zfp423* was greater expressed in males than in females ($P<0.10$) only at 139 days of gestation, but not in other periods ($P>0.10$). Where interactions were observed, no differences among MN and fetal sex were detected in the least stage of pregnancy evaluated (268 days). The mRNA expression of *CCAAT enhancer binding protein alpha* (*C/EBP α*), a late adipogenic marker, did not suffer effects from interactions among the main effects evaluated ($P\geq 0.209$, Table 3) and was not different in skeletal muscle of CO and ON fetuses ($P=0.791$). The *C/EBP α* expression was, however, greater in male compared to female fetuses ($P=0.029$) and was also lower at late gestation

compared to middle gestation ($P < 0.001$, Table 3). The mRNA expression of *Peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR γ), another late adipogenic marker, was 26% greater in male than in female fetuses ($P = 0.002$, Table 3). PPAR γ was also greater expressed in muscle from ON fetuses compared to CO fetuses at 139 days of gestation ($P < 0.10$) but not different in among the both MN groups in the subsequent stages of gestation ($P > 0.10$).

Although some effects of MN were observed on mRNA expression of adipogenic markers, the phenotypic indicator of adipogenesis evaluated (ether extract content of skeletal muscle) was not affected by MN ($P = 0.891$). Males and females fetuses also presented similar contents of intramuscular fat during pregnancy ($P = 0.191$). However, the fat content in fetal muscle increased about 36% from 139 days of gestation to the subsequent stages ($P = 0.017$, Table 3).

Gene expression of fibrogenic markers and phenotypic quantification of intramuscular collagen deposition. The mRNA expression of *Collagen type I alpha 1* (Collagen I) was greater in ON fetuses than in CO fetuses ($P = 0.091$, Table 4) and in male than female fetuses ($P = 0.095$). The expression of Collagen I also decreased from 199 days to the subsequent stages of gestation ($P < 0.001$, Table 4). An interaction between fetal sex and DG was observed on the mRNA expression of *Collagen type III alpha 1* (Collagen III, $P = 0.072$) and *Fibronectin 1* (FN1, $P = 0.002$). In both cases the marker was greater expressed in males than in females ($P < 0.10$) only at 139 days of gestation (Table 4), with no differences among fetal sex at the subsequent periods ($P > 0.10$). The mRNA expression of FN1 was greater in ON than in CO fetuses ($P = 0.027$). In other hand, the mRNA expression of *transforming growth factor β* (TGF- β) was affected by days of gestation ($P = 0.004$), and an interaction among MN and fetal

sex ($P=0.100$). The expression of TGF- β was greater in ON male fetuses than in CO male fetuses ($P<0.10$), but not in females, which were not affected by the MN ($P>0.10$).

To evaluate the phenotypic fibrogenesis we quantified histochemically the collagen deposition in fetal muscle (Figure 2). The intramuscular collagen deposition was not affected by MN ($P=0.907$) and fetal sex ($P=0.227$, Table 4). However, significantly increase was observed due to the increase days of gestation ($P<0.001$, Figure 2). Total area of collagen increase about five times from 139 to 268 days of gestation (Table 4, Figure 2).

DISCUSSION

All effects observed in this study on fetal skeletal muscle development occurred without fetal weight differences within the same time of gestation (Table 1). These findings agree with previous reports in the literature which have shown that the vast majority of changes in the trajectory of fetal development due to environmental effects occurs without variation of weight at birth (16, 20, 21, 23).

Both maternal nutrient restriction (32) and obesity (33) have been shown to decrease myogenesis in ruminants. In this study, however, we did not find any reduction of myogenesis due to maternal overfeeding. Otherwise, we observed increase in β -Catenin expression and number of myocytes at 139 days of gestation due to maternal overfeeding, despite no differences among MN levels in the subsequent time points of gestation (Table 2). In a previous study with beef cattle breed, the maternal overnutrition tended to decrease gene expression of β -Catenin (19), contrary to the observed in this study. This may suggest that maternal nutrition affects differently the fetal muscular development in beef specialized and non-specialized breeds. We also observed a 4% higher content of crude protein in the muscle of ON fetuses compared to

CO ($P=0.051$, Table 2). The differences between ON and CO fetuses for expression of β -Catenin and number of myocytes may be explained by the greater availability of nutrients to the gravid uterus in ON cows at the point of greater function of myogenesis (20). However, with the advance of gestation, since the CO feeding level was not restriction, the myogenesis seems to have been compensated in fetuses from CO-fed cows. Evidence of compensatory fetal muscle growth from nutrient restricted and then refed cows has been recent reported (34) and may be related to the effects that were observed in this study.

In general, the mRNA expression of all myogenic markers and the number of myocytes decreases from middle to late gestation (Table 2). These findings corroborate with those observed in beef cattle fetuses (19) and revised by Du et al. (20) based on data from studies with sheep, rodents, and humans. The general report is that myogenesis decreases as gestation progresses where after midgestation (4.5 mo) the formation of new muscle cells is reduced concomitantly with the increase of intramuscular adipogenesis (20). Increase in fat content of the muscle was observed in this study from middle to late gestation (Table 3), signaling increase of intramuscular adipogenesis in the last third of gestation. However, the mRNA expression of adipogenic markers was observed to decrease from middle to late gestation (Table 3), instead of an expected increase. Non-significant increase in mRNA expression through the gestation of the same markers evaluated in this study was previously reported (19).

Although the ON treatment was expected to increase adipogenesis of fetal skeletal muscle based on previous reports (19, 33), enhancement of mRNA expression of adipogenic markers was observed for two of the three markers evaluated and only at 139 days of gestation, with no effects on subsequent time points of gestation (Table 3).

Likewise, the fat content of skeletal muscle of fetuses did not change as function of MN in this study (Table 3).

Previous studies have suggested that the β -Catenin can alter the expression of other myogenic markers by regulating the expression of *paired box 3* (Pax3), which acts upstream of MyoD during skeletal muscle development (35, 36). The β -Catenin can also downregulate the myogenesis by regulating the expression of PPAR γ (37). Although in the current study the results of β -Catenin and MyoD expression were correlated (Table 2), there was no signal of PPAR γ downregulation by β -Catenin, since the pattern of the mRNA expression of both genes were similar (Tables 2 and 3), differently from previous reports when greater expression of PPAR γ was observed when expression of β -Catenin decreased (19).

To our knowledge, this is the first study investigating the effects of gender on myogenesis, adipogenesis and fibrogenesis of skeletal muscle of bovines during the fetal phase. The muscle mRNA expression of myogenic markers β -Catenin and MyoD was greater in male than in female fetuses, as well the expression of all adipogenic markers evaluated (Zfp423, C/EBP α and PPAR γ), three of the four fibrogenic markers evaluated (Collagen I, Collagen III and Fibronectin) and the number of myocytes in muscle. However, there were no effects of fetal sex on phenotypic indicators of adipogenesis and fibrogenesis. These all findings lead to a general evidence that the development of skeletal muscle is greater in males than in females since the intrauterine life. Extensive efforts have been done by scientists to describe the sex-biased evolutionary adaptation and allocation of maternal resources in mammals (38-41). Although males seem to be favored regarding to the skeletal muscle development during the fetal phase, females are favored regarding to the intestinal development

(Gionbelli et al., unpublished data¹). The causes or effects related to these findings are, however, still not well elucidated.

In general, intensification of maternal nutrition altered the gene expression of some myogenic, adipogenic and fibrogenic markers at midgestation (greater in ON than in CO) but some compensatory expression made the effect of MN not significant at late gestation, in accordance to previous literature reports (34). Thus, although previous studies (23) have reported that an increase in the quality of maternal diet from only 60 days during the midgestation increased tenderness, adipose tissue and growth in the offspring, our results suggest that these kind of potential effects does not occurs when cows nutrition is intensified over the maintenance requirements in dual purpose cattle. It can be noted, however, that potential increase in adipogenesis of skeletal muscle has been shown in fetuses from overnourished cows of beef specialized breed (19). What we find is that, although MN intensification over maintenance can alter the trajectory and speed of skeletal muscle development (see interactions between MN and DG in Tables 2, 3 and 4 and Figure 1), the effects that remain until the late gestation are marginal. On the other hand, however, our finds regarding to the differences between males and females during the intrauterine development of skeletal muscle suggest that in fetal programming studies the effect of fetal sex should be carefully controlled and isolated.

MATERIALS AND METHODS

Animal Husbandry. All animal care and handling procedures were approved by Animal Care and Use Committee of the Department of Animal Science of the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, prior to initiation of the

¹ Capítulo 2 desta Tese.

experiment. Forty-four multiparous non-lactating Holstein × Gyr cows with initial average body weight of 480 ± 10.1 kg and 5 ± 0.5 years old had pregnancy confirmed after an fixed time artificial insemination protocol using semen from a single bull. The general procedures for the reproductive protocol as well the management of the cows during the adaptation period are well described by Rotta et al. (31). Day 0 of pregnancy was considered the day of insemination. At 60 days of gestation the fetal sex diagnose was performed and feeding treatments application started and lasted until the slaughter. Cows were divided at random in two groups with different feeding levels, being the control group (CO, n=24) the feeding restriction to 1.15% of cow body weight per day to maintain the gestation and body weight. Overnourished (ON, n=20) treatment consisted in fed cows *ad libitum* with the same diet of CO group. The diet was based on corn silage (93%), cotton meal (5%) and mineral + urea mixture (2%). Both groups were fed twice daily (60% in the morning and 40% afternoon).

Tissue Sample Collection. To achieve the evaluations at different stages of gestation, cows and its fetuses were necropsied at 139 (n=9), 199 (n=11), 241 (n=11) and 268 days (n=10) of gestation, which represents 50, 70, 85 and 95% of gestation length (27) and 18, 31, 73 and 96% of gravid uterus growing (25), respectively. Pre-harvest animal care and handling procedures followed the National Sanitary and Industrial Inspection Regulation for Animal Origin Products (42). Before harvest, feed was withheld from animals for 16 h, but they had *ad libitum* access to water the entire time. Harvest was performed by using captive bolt stunning and exsanguination. The euthanasia of fetuses was achieved according American Veterinary Medical Association Guidelines (43). After cow's exsanguination the gravid uterus was collected and fetuses were removed. Samples of *Longissimus dorsi* muscle (**LM**) were quickly collected from both sides of the carcass after the removal of skin and apparent subcutaneous fat. A total of 3 samples

were collected from each fetus. One of the LM samples was placed in sterile tubes containing RNAlater (Qiagen, Hilden, North Rhine, Westphalia, Germany) stored at 4°C overnight and then kept at -80°C before RNA isolation. A small portion of samples was fixed in fresh 10% (wt/vol) formalin in phosphate buffer (pH = 7.4) immediately after slaughter and then processed for histological analysis. A third sample was frozen at -20 °C for further ether extract and crude protein quantification.

Real-Time Quantitative PCR Analysis. Total RNA (1 µg) was extracted from 0.5 g of powdered tissue samples using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), treated with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen), and reverse transcribed into cDNA using the GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI). The primer sets used are shown in Table 2. Reverse transcription PCR was performed on a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) using SYBR Green RT-PCR kit from Bio-Rad and the following cycle parameters: 95°C for 3 min and 40 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 30 s. The amplification efficiency was 0.90 to 0.99. After amplification, a melting curve (0.01 °C/s) was used to confirm product purity. Results are expressed relative to 18S using the $\Delta\Delta C_t$ method (44). To be used as a reference gene, the stability of 18S expression among experimental treatments was determined through statistical analysis by Tukey's method at $\alpha=0.05$. No variation of 18S expression was observed ($P=0.845$) among experimental treatments.

Histochemical and Image Analysis. Muscle samples were fixed in fresh 10% (wt/vol) formalin in phosphate buffer (pH 7.4) and embedded in resin using the HistoResin Mounting Kit (Leica, Solmos, Hessen, Germany). Sections were cut at 3 µm by using a RM2255 microtome (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Germany), stained with toluidine blue, mounted in synthetic resin, and observed under light microscopy for observation of number of muscle cells by using an EVOS xl light microscope (AMG,

Bothell, WA). A total of 10 images per fetus were taken (2 images per section and 5 sections per fetus) at 400-fold magnification to quantify a total of muscle cells by using ImageJ software (National Institute of Health, Baltimore, MD). Samples were embedded in Paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and cut into sections of 5 μm by using a RM2245 microtome (Leica Microsystems Inc.). Sections were rehydrated through incubations on Histochoice (Sigma-Aldrich) and ethanol solutions. After rehydration, sections were stained for 1 h in the picrosirius solution (45). Picrosirius solution was composed of 0.1% (wt/vol) of Direct Red 80 (Sigma-Aldrich) in 1.3% (wt/vol) aqueous picric acid solution. After 1 h incubation, stained sections were washed for 2 min in 0.01 *N* HCl solution, dehydrated, cleared, and mounted in synthetic resin. Picrosirius stained sections were observed under polarized light by using an Olympus BX53 coupled with a DP21 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan). For quantification of picrosirius-stained intramuscular collagen, a total of 10 images per fetus (2 images per section and 5 sections per fetus) were taken into the same background under the polarized light and then analyzed by using ImageJ software. All the images were converted into grayscale and split into red, green, and blue channels. After that, the green channel of all images was thresholded to the same level to highlight the stained collagen. Collagen was quantified as percentage of the total image area. All images were analyzed for collagen quantification at 100-fold magnification.

Chemical Analysis. Ether extract quantification and crude protein content in the fetal skeletal muscle follow the procedures described by Lage et al. (46) for adult animals.

Statistical Analysis. Data were analyzed through a model including the fixed effects of MN, fetal sex and DG (139,199, 241 and 268 d), and their interactions as follows:

$$Y_{ijkl} = \mu + MN_i + FS_j + DG_k + (MN \times FS)_{ij} + (MN \times DG)_{ik} + (FS \times DG)_{jk} + (MN \times FS \times DG)_{ijk} + e_{ijkl}$$

where MN_i is the i th level of the fixed effect of maternal nutrition, FS_j is the j th level of the fixed effect fetal sex, DG_k is the k th level of the fixed effect days of gestation and e_{ijkl} is the random error associated with Y_{ijkl} . Gene expression levels were transformed using the natural logarithm of the expression values + 1 to achieve normality (47). Outliers were removed to achieve normality using Shapiro-Wilks test at $\alpha = 0.10$ (48). Least square means were estimated for all effects and compared using Tukey's method at $\alpha = 0.10$. All statistical procedures were performed using the MIXED procedure from SAS (SAS, version 9.2, software; SAS Institute).

REFERENCES

1. Newton P, Agrawal A, & Wollenberg L (2013) Enhancing the sustainability of commodity supply chains in tropical forest and agricultural landscapes. *Global Environmental Change* 23(6):1761-1772.
2. Nepstad DC, Boyd W, Stickler CM, Bezerra T, & Azevedo AA (2013) *Responding to climate change and the global land crisis: REDD+, market transformation and low-emissions rural development*.
3. Cohn AS, *et al.* (2014) Cattle ranching intensification in Brazil can reduce global greenhouse gas emissions by sparing land from deforestation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(20):7236-7241.
4. FAO (2010) United Nations Food and Agriculture Organization (Global Forest Resource Assessment). (Rome, Italy).
5. Bowman MS, *et al.* (2012) Persistence of cattle ranching in the Brazilian Amazon: A spatial analysis of the rationale for beef production. *Land Use Policy* 29(3):558-568.
6. Detmann E, Gionbelli MP, & Huhtanen P (2014) A meta-analytical evaluation of the regulation of voluntary intake in cattle fed tropical forage-based diets. *J. Anim. Sci.*
7. Detmann E, Paulino MF, & Valadares Filho SC (2010) Otimização do uso de recursos forrageiros basais. *VII Simpósio de Produção de Gado de Corte*, eds Valadares Filho SC, Paulino MF, Paulino PV, & Marcondes MI (Suprema), pp 191-240.
8. Valente É, *et al.* (2013) Effect of calves' supplementation on performance, nutritional and behavioral characteristics of their dams. (Translated from English) *Tropical Animal Health and Production* 45(2):487-495 (in English).
9. Valente E, *et al.* (2012) Strategies of supplementation of female suckling calves and nutrition parameters of beef cows on tropical pasture. (Translated from English) *Tropical Animal Health and Production* 44(7):1803-1811 (in English).

10. Bouman BAM & Nieuwenhuyse A (1999) Exploring options for sustainable beef cattle ranching in the humid tropics: a case study for the Atlantic Zone of Costa Rica. *Ag. Syst.* 59(2):145-161.
11. Sampaio CB, *et al.* (2010) Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. (Translated from eng) *Trop Anim Health Prod* 42(7):1471-1479 (in eng).
12. Gionbelli MP, *et al.* (2015) Quantitative aspects of growth and development of cow, udder and gravid uterus of Zebu beef cows during pregnancy. *PLoS One* (in revision - PONE-D-14-27792).
13. Duarte MS, *et al.* (2013) Effects of maternal nutrition on development of gastrointestinal tract of bovine fetus at different stages of gestation. *Livestock Science* 153(1):60-65.
14. Hammer CJ, *et al.* (2011) Effects of maternal selenium supply and plane of nutrition during gestation on passive transfer of immunity and health in neonatal lambs. *J. Anim. Sci.* 89(11):3690-3698.
15. Meyer AM, *et al.* (2010) Effects of stage of gestation and nutrient restriction during early to mid-gestation on maternal and fetal visceral organ mass and indices of jejunal growth and vascularity in beef cows. *J. Anim. Sci.* 88(7):2410-2424.
16. Trahair JF, DeBarro TM, Robinson JS, & Owens JA (1997) Restriction of Nutrition In Utero Selectively Inhibits Gastrointestinal Growth in Fetal Sheep. *The Journal of Nutrition* 127(4):637-641.
17. Yanusova RD, *et al.* (2013) Impacts of maternal selenium supply and nutritional plane on visceral tissues and intestinal biology in 180-day-old offspring in sheep. *J. Anim. Sci.* 91(5):2229-2242.
18. Reed JJ, *et al.* (2007) Effects of selenium supply and dietary restriction on maternal and fetal body weight, visceral organ mass and cellularity estimates, and jejunal vascularity in pregnant ewe lambs. *J. Anim. Sci.* 85(10):2721-2733.
19. Duarte MS, *et al.* (2014) Maternal overnutrition enhances mRNA expression of adipogenic markers and collagen deposition in skeletal muscle of beef cattle fetuses. *J. Anim. Sci.*
20. Du M, *et al.* (2010) Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J. Anim. Sci.* 88:E51-E60.
21. Wu G, Bazer FW, Wallace JM, & Spencer TE (2006) BOARD-INVITED REVIEW: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J. Anim. Sci.* 84(9):2316.
22. Vonnahme KA (2007) Nutrition during gestation and fetal programming. *Range Beef Cow Symposium XX*, (University of Nebraska Lincoln), pp 1-11.
23. Underwood KR, *et al.* (2010) Nutrition during mid to late gestation affects growth, adipose tissue deposition, and tenderness in cross-bred beef steers. *Meat Science* 86(3):588-593.
24. Ferrell CL, Garrett WN, & Hinman N (1976) Growth, development and composition of the udder and gravid uterus of beef heifers during pregnancy. *J. Anim. Sci.* 42(6):1477-1489.
25. Gionbelli MP, *et al.* (2015) Achieving Body Weight Adjustments for Feeding Status and Pregnant or Non-Pregnant Condition in Beef Cows. *PLoS ONE* 9(12):e115724.
26. Menezes GCdC, *et al.* (2014) Meat Production in a Feedlot System of ZebuxHolstein Steers and Heifers with Dairy Genetics: Productive and Biological Analyses. *The Scientific World Journal* 2014:7.

27. Mellado M, Coronel F, Estrada A, & Ríos FG (2011) Lactation performance of Holstein and Holstein x Gyr cattle under intensive condition in a subtropical environment. *Tropical and subtropical agroecosystems* 14:927-931.
28. Ruas JRM, *et al.* (2014) Lactation productive characteristics of four genetic groups F1 Holstein x Zebu. *R. Bras. Ci. Vet.* 21(1).
29. Silva AA, *et al.* (2011) Quantitative trait loci affecting milk production traits on bovine chromosome 6 in zebuine Gyr breed. *J. Dairy. Sci.* 94(2):971-980.
30. Santana ML, Jr., *et al.* (2014) History, structure, and genetic diversity of Brazilian Gir cattle. *Livestock Science* 163:26-33.
31. Rotta PP, *et al.* (2015) Effects of day of gestation and feeding regimen in Holstein x Gyr cows: I. Apparent total tract digestibility, nitrogen balance, and fat deposition. *J. Dairy. Sci.*:(accepted).
32. Zhu MJ, *et al.* (2006) Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *The Journal of Physiology* 575(Pt 1):241-250.
33. Tong JF, *et al.* (2009) Maternal obesity downregulates myogenesis and β -catenin signaling in fetal skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 296(4):E917-E924.
34. Gonzalez JM, *et al.* (2013) Realimentation of nutrient restricted pregnant beef cows supports compensatory fetal muscle growth. *J. Anim. Sci.* 91(10):4797-4806.
35. Ridgeway AG & Skerjanc IS (2001) Pax3 Is Essential for Skeletal Myogenesis and the Expression of Six1 and Eya2. *Journal of Biological Chemistry* 276(22):19033-19039.
36. Gustafsson MK, *et al.* (2002) Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. *Genes & Development* 16(1):114-126.
37. Okamura M, *et al.* (2009) COUP-TFII acts downstream of Wnt/ β -catenin signal to silence PPAR γ gene expression and repress adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(14):5819-5824.
38. Hinde K, Carpenter AJ, Clay JS, & Bradford BJ (2014) Holsteins Favor Heifers, Not Bulls: Biased Milk Production Programmed during Pregnancy as a Function of Fetal Sex. *PLoS One* 9(2):e86169.
39. Trivers RL & Willard DE (1973) Natural Selection of Parental Ability to Vary the Sex Ratio of Offspring. *Science* 179(4068):90-92.
40. Clark AB (1978) Sex Ratio and Local Resource Competition in a Prosimian Primate. *Science* 201(4351):163-165.
41. Smith JM (1980) A new theory of sexual investment. (Translated from English) *Behav Ecol Sociobiol* 7(3):247-251 (in English).
42. Brasil (1997) *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal [Regulation of Industrial and Sanitary Inspection of Animal Products]* (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, Brazil (In Portuguese)).
43. AVMA (2013) *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition* (American Veterinary Medical Association, Schaumburg, IL, USA) p 102.
44. Bustin S (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29(1):23-39.

45. Junqueira LCU, Bignolas G, & Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. (Translated from English) *Histochem J* 11(4):447-455 (in English).
46. Lage JF, *et al.* (2012) Influence of genetic type and level of concentrate in the finishing diet on carcass and meat quality traits in beef heifers. *Meat Science* 90(3):770-774.
47. Voge JL, *et al.* (2004) Quantification of insulin-like growth factor binding protein mRNA using real-time PCR in bovine granulosa and theca cells: effect of estradiol, insulin, and gonadotropins. *Domestic Animal Endocrinology* 26(3):241-258.
48. Shapiro SS & Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52(3/4):591-611.

TABLES

Table 1. Least square means \pm standard errors of the means of the effects of maternal feeding level, fetal sex and days of gestation on initial and final cow live weight and fetal weight

Item	Maternal nutrition ¹		Fetal sex		Days of gestation				P-value ²						
	CO (n=23)	ON (n=18)	Female (n=21)	Male (n=20)	139 (n=9)	199 (n=11)	241 (n=11)	268 (n=10)	N	S	D	N×S	N×D	S×D	N×S×D
Cows initial weight, kg	477±11	477±12	476±12	479±12	489±19	478±15	482±15	460±18	0,992	0,860	0,688	0,745	0,661	0,839	0,600
Cows final weight, kg	523±14	646±15	584±14	585±15	558±23	574±19	596±19	611±22	<0,001	0,976	0,344	0,646	0,557	0,578	0,694
Fetal weight at slaughter, kg	16,4±0,7	17,3±0,7	17,1±0,7	16,5±0,7	1,84 ^d ±1,06	10,0 ^c ±0,8	22,8 ^b ±0,9	32,8 ^a ±1,0	0,330	0,518	<0,001	0,925	0,885	0,367	0,893

^{a-d}Within a variable, means differ (P<0.10)

¹CO = control and ON = overnourished cows.

²The main effects of maternal nutrition (N), fetal sex (S) and days of gestation (D).

Table 2. Least square means \pm standard errors for mRNA expression of myogenic markers and phenotypic indicators of myogenesis evaluated on fetal skeletal muscle of Holstein \times Gyr cattle according to maternal nutrition, fetal sex and days of gestation

Item	Maternal nutrition ¹		Fetal sex		Days of gestation				P-value ²						
	CO (n=23)	ON (n=18)	Female (n=21)	Male (n=20)	139 (n=9)	199 (n=11)	241 (n=11)	268 (n=10)	N	S	D	N \times S	N \times D	S \times D	N \times S \times D
<i>mRNA expression of myogenic markers (arbitrary units)</i>															
β -Catenin	2.25 \pm 0.08	2.50 \pm 0.08	2.19 \pm 0.08	2.56 \pm 0.08	2.78 \pm 0.13	2.63 \pm 0.11	2.16 \pm 0.11	1.93 \pm 0.11	0.035	0.003	0.002	0.986	<0.001	0.054	0.140
CO	-	-	-	-	2.10 ^{cd} \pm 0.20	2.57 ^{bc} \pm 0.14	2.22 ^{cd} \pm 0.14	2.10 ^{ef} \pm 0.14	-	-	-	-	-	-	-
ON	-	-	-	-	3.45 ^a \pm 0.18	2.69 ^{ab} \pm 0.16	2.09 ^{de} \pm 0.16	1.76 ^f \pm 0.17	-	-	-	-	-	-	-
Female	-	-	-	-	2.17 ^{CD} \pm 0.22	2.59 ^{BC} \pm 0.14	2.06 ^D \pm 0.14	1.93 ^D \pm 0.16	-	-	-	-	-	-	-
Male	-	-	-	-	3.39 ^A \pm 0.16	2.67 ^B \pm 0.16	2.25 ^{CD} \pm 0.16	1.92 ^D \pm 0.16	-	-	-	-	-	-	-
MyoD	2.61 \pm 0.11	2.72 \pm 0.13	2.47 \pm 0.12	2.87 \pm 0.13	3.31 ^a \pm 0.20	3.09 ^a \pm 0.15	2.27 ^b \pm 0.16	2.01 ^c \pm 0.17	0.508	0.033	<0.001	0.856	0.122	0.288	0.444
Myogenin	3.74 \pm 0.11	3.92 \pm 0.12	3.70 \pm 0.11	3.97 \pm 0.13	4.32 ^a \pm 0.19	4.67 ^a \pm 0.14	3.63 ^b \pm 0.14	2.72 ^b \pm 0.19	0.320	0.120	<0.001	0.486	0.250	0.254	0.364
<i>Phenotypic indicators of myogenesis</i>															
Crude protein content of skeletal muscle (g/kg)	117 \pm 2	122 \pm 2	120 \pm 2	119 \pm 2	82.9 ^d \pm 3.6	112 ^c \pm 2	135 ^b \pm 2	148 ^a \pm 2	0.051	0.849	<0.001	0.885	0.458	0.618	0.150
Number of myocytes (400-fold magnification)	379 \pm 9	382 \pm 9	362 \pm 9	399 \pm 9	459 \pm 15	458 \pm 12	324 \pm 12	280 \pm 14	0.796	0.009	<0.001	0.555	0.091	0.291	0.247
CO	-	-	-	-	427 ^b \pm 22	453 ^{ab} \pm 16	337 ^c \pm 16	297 ^d \pm 16	-	-	-	-	-	-	-
ON	-	-	-	-	491 ^a \pm 20	464 ^{ab} \pm 18	311 ^{cd} \pm 18	262 ^d \pm 23	-	-	-	-	-	-	-

^{A-D}Within a variable, means differ (P<0.10).

^{a-f}Within a variable, means differ (P<0.10).

¹CO = control and ON = overnourished cows.

²The main effects of maternal nutrition (N), fetal sex (S) and days of gestation (D).

Table 3. Least square means \pm standard errors for mRNA expression of adipogenic markers and muscle fat content as a phenotypic indicator of adipogenesis evaluated on fetal skeletal muscle of Holstein \times Gyr cattle according to maternal nutrition, fetal sex and days of gestation

Item	Maternal nutrition ¹		Fetal sex		Days of gestation				P-value ²						
	CO (n=23)	ON (n=18)	Female (n=21)	Male (n=20)	139 (n=9)	199 (n=11)	241 (n=11)	268 (n=10)	N	S	D	N \times S	N \times D	S \times D	N \times S \times D
<i>mRNA expression of adipogenic markers (arbitrary units)</i>															
Zfp423	2.32 \pm 0.10	2.62 \pm 0.09	2.20 \pm 0.09	2.74 \pm 0.11	3.14 \pm 0.15	3.02 \pm 0.12	2.11 \pm 0.14	1.61 \pm 0.16	0.049	<0.001	<0.001	0.581	0.001	<0.001	0.307
CO	-	-	-	-	2.43 ^c \pm 0.21	3.08 ^b \pm 0.16	2.15 ^{cd} \pm 0.22	1.62 ^{de} \pm 0.22	-	-	-	-	-	-	-
ON	-	-	-	-	3.86 ^a \pm 0.19	2.95 ^b \pm 0.17	2.05 ^{cde} \pm 0.17	1.59 ^e \pm 0.22	-	-	-	-	-	-	-
Female	-	-	-	-	2.26 ^C \pm 0.23	2.86 ^B \pm 0.15	2.08 ^{CD} \pm 0.15	1.57 ^E \pm 0.15	-	-	-	-	-	-	-
Male	-	-	-	-	4.03 ^A \pm 0.17	3.17 ^B \pm 0.17	2.12 ^{CD} \pm 0.23	1.64 ^{DE} \pm 0.27	-	-	-	-	-	-	-
C/EBP α	2.93 \pm 0.11	2.97 \pm 0.11	2.77 \pm 0.11	3.13 \pm 0.11	3.02 ^{ab} \pm 0.17	3.39 ^a \pm 0.15	2.56 ^c \pm 0.15	2.82 ^{cd} \pm 0.15	0.791	0.029	<0.001	0.384	0.377	0.624	0.209
PPAR γ	2.21 \pm 0.11	2.45 \pm 0.10	2.07 \pm 0.11	2.60 \pm 0.11	2.90 \pm 0.16	2.82 \pm 0.15	2.08 \pm 0.16	1.52 \pm 0.14	0.128	0.002	<0.001	0.482	0.008	0.190	0.168
CO	-	-	-	-	2.32 ^{cd} \pm 0.23	2.58 ^{bc} \pm 0.21	2.27 ^{cd} \pm 0.24	1.66 ^{ef} \pm 0.19	-	-	-	-	-	-	-
ON	-	-	-	-	3.48 ^a \pm 0.21	3.06 ^{ab} \pm 0.21	1.90 ^{de} \pm 0.21	1.38 ^f \pm 0.21	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phenotypic indicator of adipogenesis</i>															
Fat content of skeletal muscle (g/kg)	6.10 \pm 0.26	6.05 \pm 0.29	5.81 \pm 0.26	6.34 \pm 0.29	4.78 ^b \pm 0.52	6.25 ^a \pm 0.34	6.99 ^a \pm 0.34	6.28 ^a \pm 0.35	0.891	0.191	0.017	0.906	0.887	0.968	0.565

^{A-E}Within a variable, means differ (P<0.10).

^{a-f}Within a variable, means differ (P<0.10).

¹CO = control and ON = overnourished cows.

²The main effects of maternal nutrition (N), fetal sex (S) and days of gestation (D).

Table 4. Least square means \pm standard errors for mRNA expression of fibrogenic markers and intramuscular collagen deposition as a phenotypic indicator of fibrogenesis evaluated on fetal skeletal muscle of Holstein \times Gyr cattle according to maternal nutrition, fetal sex and days of gestation

Item	Maternal nutrition ¹		Fetal sex		Days of gestation				P-value ²						
	CO (n=23)	ON (n=18)	Female (n=21)	Male (n=20)	139 (n=9)	199 (n=11)	241 (n=11)	268 (n=10)	N	S	D	N \times S	N \times D	S \times D	N \times S \times D
<i>mRNA expression of fibrogenic markers (arbitrary units)</i>															
Collagen I	4.06 \pm 0.20	4.56 \pm 0.20	4.06 \pm 0.20	4.56 \pm 0.20	5.15 ^a \pm 0.32	5.51 ^a \pm 0.26	3.76 ^b \pm 0.26	2.84 ^c \pm 0.28	0.091	0.095	<0.001	0.953	0.739	0.130	0.198
Collagen III	3.77 \pm 0.15	4.05 \pm 0.15	3.72 \pm 0.15	4.11 \pm 0.15	4.34 \pm 0.25	4.95 \pm 0.20	3.73 \pm 0.20	2.62 \pm 0.21	0.216	0.085	<0.001	0.382	0.844	0.072	0.154
Female	-	-	-	-	3.58 ^b \pm 0.40	4.97 ^a \pm 0.26	3.65 ^b \pm 0.26	2.67 ^c \pm 0.26	-	-	-	-	-	-	-
Male	-	-	-	-	5.11 ^a \pm 0.28	4.94 ^a \pm 0.29	3.81 ^b \pm 0.32	2.58 ^c \pm 0.32	-	-	-	-	-	-	-
Fibronectin	3.59 \pm 0.12	4.02 \pm 0.13	3.63 \pm 0.12	3.98 \pm 0.13	4.55 \pm 0.20	4.90 \pm 0.16	3.41 \pm 0.17	2.36 \pm 0.20	0.027	0.069	<0.001	0.806	0.121	0.002	0.201
Female	-	-	-	-	3.62 ^c \pm 0.32	4.93 ^b \pm 0.21	3.43 ^c \pm 0.21	2.55 ^d \pm 0.21	-	-	-	-	-	-	-
Male	-	-	-	-	5.48 ^a \pm 0.23	4.86 ^b \pm 0.24	3.39 ^c \pm 0.26	2.18 ^d \pm 0.33	-	-	-	-	-	-	-
TGF- β	3.27 \pm 0.13	3.22 \pm 0.13	3.29 \pm 0.11	3.21 \pm 0.13	3.43 ^{ab} \pm 0.18	3.69 ^a \pm 0.18	3.18 ^b \pm 0.16	2.67 ^c \pm 0.18	0.759	0.629	0.004	0.100	0.812	0.624	0.747
Female	3.16 ^{ab} \pm 0.18	3.38 ^{ab} \pm 0.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Male	3.02 ^b \pm 0.19	3.41 ^a \pm 0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phenotypic indicator of fibrogenesis</i>															
Intramuscular collagen deposition (percentage of area at 100-fold magnification)	2.56 \pm 0.09	2.55 \pm 0.10	2.64 \pm 0.09	2.47 \pm 0.10	0.70 ^c \pm 0.15	2.72 ^b \pm 0.13	3.33 ^a \pm 0.13	3.46 ^a \pm 0.14	0.907	0.227	<0.001	0.974	0.203	0.656	0.907

^{a-d}Within a variable, means differ (P<0.10)

¹CO = control and ON = overnourished cows.

²The main effects of maternal nutrition (N), fetal sex (S) and days of gestation (D).

Table 5. Primers for genes analyzed by qRT-PCR

Gene	Gene abbreviation	UniGene access code	Forward sequence	Reverse sequence
Collagen type I, alpha 1	COL1A1	NM_001034039.1	CCACCCCAGCCGCAAAGAGT	ACGCAGGTGACTGGTGGGATGTC
Collagen type III, alpha 1	COL3A1	NM_001076831.1	GGCCCCCTGGAAAGGACGGA	CCCCGCCAGCACCACAACAT
Fibronectin 1	FN1	NM_001163778.1	GCGTGTCACCTGGGCTCCAC	CGGTGCCGGGCAGGAGATTT
Transforming growth factor, beta 1	TGFβ-1	NM_001166068.1	AGCCAGGGGGATGTGCCA	TAGCACGCGGGTGACCTCCT
CCAAT enhancer binding protein, alpha	C/EBPα	NM_176784.2	TGCGCAAGAGCCGGGACAAG	ACCAGGGAGCTCTCGGGCAG
Peroxisome proliferator actiated-receptor gamma	PPARγ	NM_001098905.1	TGGAGACCGCCCAGGTTTGC	AGCTGGGAGGACTCGGGGTG
Zinc finger protein 423	Zfp423	NM_001101893.1	GGATTCCTCCGTGACAGCA	TCGTCCTCATTCTCTCCTCT
Cadherin-associated protein, beta 1	B-catenin	NM_001076141.1	CCGGCTATTGTAGAAGCTGGTG	AAGGCGCTGACTTGGATCTGTC
Myogenic differentiation 1	MYOD	NM_001040478.2	TTCCGACGGCATGATGGACTAC	TAAGTGCGGTCGTAGCAGTTCC
Myogenin (Myogenic factor 4)	MYOG	NM_001111325.1	TACAGACGCCACAATCTGCAC	AGCGACATCCTCCACTGTGATG
18 S ribosomal	18S	NM_001033614	CCTGCGGCTTAATTTGACTC	AACTAAGAACGGCCATGCAC

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Images of fetal *Longissimus dorsi* muscle stained with toluidine blue at 400-fold magnification from a CO (A) and ON (B) male fetuses at 139 days of gestation.

Figure 2. Images of *Longissimus dorsi* stained with picrosirius and observed under brightfield light (A and C) and polarized light (B and D) at 100-fold magnification. Images are from 139 (A and B) and 268 (C and D) days of gestation.

Figure 1.

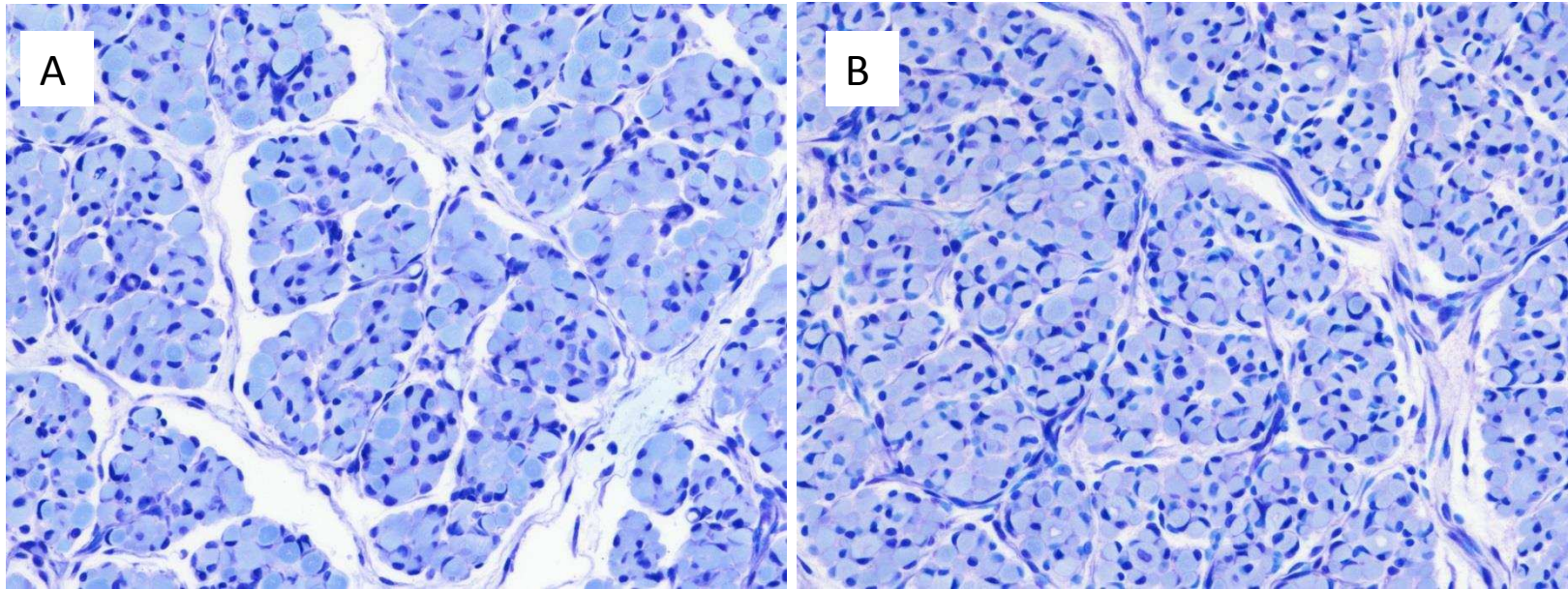
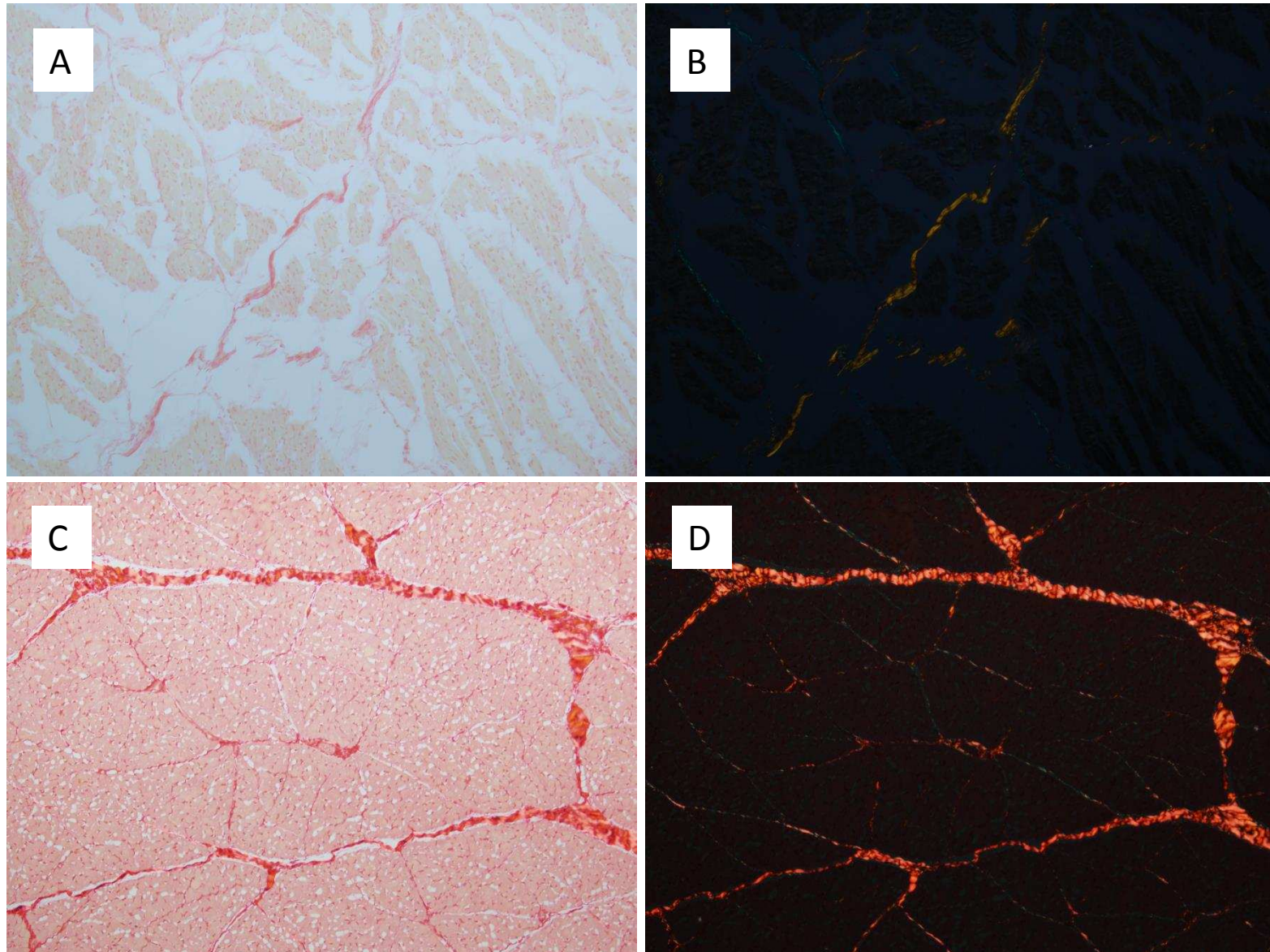


Figure 2.



CAPÍTULO 2

Desenvolvimento intestinal fetal ao longo da gestação é afetado pelo sexo e nutrição materna em bovinos

RESUMO: Com este estudo objetivou-se avaliar o efeito do nível alimentar materno e sexo fetal sobre o desenvolvimento intestinal de fetos bovinos em diferentes estágios da gestação. Quarenta e quatro vacas Holandês × Gir, múltíparas, não lactantes, com peso médio inicial de $480 \pm 10,1$ kg, foram alimentadas com consumo restrito a 1,15% do peso corporal (**CON**, n=24) ou à vontade (**SUP**, n=20), com a mesma dieta, que continha 93% de silagem de milho e 7% de concentrado. Aos 139, 199, 241 e 268 dias de gestação, 11 vacas (6 CON e 5 SUP) foram abatidas para avaliação do desenvolvimento intestinal fetal. O efeito do sexo fetal foi também considerado, perfazendo um arranjo fatorial $2 \times 2 \times 4$, com dois níveis alimentares, dois sexos e quatro tempos de gestação. Não foram observados efeitos da nutrição materna ($P=0,330$) e gênero fetal ($P=0,518$) sobre o peso fetal. A massa, comprimento e densidade intestinal fetal não foram afetados pela nutrição materna ($P \geq 0,260$). Observou-se interação entre a nutrição materna e o tempo de gestação para altura das vilosidades do jejuno ($P=0,006$) e íleo ($P < 0,001$). Fetos filhos de vacas SUP tiveram maior altura de vilosidades intestinais no jejuno e íleo ($P < 0,10$) do que fetos filhos de vacas CON aos 139 dias de gestação. Entretanto, aos 199 dias de gestação, fetos filhos de vacas CON apresentaram maior altura de vilosidades no jejuno e íleo ($P < 0,10$) do que fetos filhos de vacas SUP. No entanto, aos 268 dias de gestação, não foi observado efeito da nutrição materna sobre a altura de vilosidades ($P > 0,10$). Fetos fêmeas foram superiores a fetos machos para massa intestinal total ($P=0,052$), massa do intestino delgado ($P=0,093$), massa do

intestino grosso ($P=0,022$), massa intestinal relativa à massa corporal para o intestino delgado ($P=0,017$), grosso ($P<0,001$) e intestino total ($P=0,003$), comprimento do intestino delgado ($P=0,077$), densidade do intestino delgado ($P=0,021$) e intestino total ($P=0,009$) e altura de vilosidades no jejuno ($P=0,001$) e íleo ($P=0,010$). Conclui-se que a nutrição materna altera a trajetória do desenvolvimento das vilosidades intestinais, ao longo da gestação em fetos de vacas Holandês x Gir, sem, no entanto, afetar o tamanho final das vilosidades. Fêmeas possuem maior massa intestinal, densidade intestinal e tamanho de vilosidades do que machos, durante a fase fetal.

PALAVRAS-CHAVE: absorção, intestino delgado, morfologia intestinal, nível alimentar, programação fetal, vilosidades

Intestinal development of bovine fetuses during gestation is affected by fetal sex and maternal nutrition

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the effects of maternal feeding level and fetal gender on the intestinal development of bovine fetuses throughout different stages of gestation. Forty-four multiparous, dry Holstein × Gyr cows with average initial body weight of 480 ± 10 kg were fed either of restricted feeding at 1.15% of body weight (**CON**, n=24) or *ad libitum* (**SUP**, n=20) with the same diet. The diet was composed by corn silage (93%) and concentrate (7%). Eleven cows of each dietary treatment (6 CON and 5 SUP) were slaughtered at 139, 199, 241 and 268 days of gestation to evaluate the development of fetal intestine. The fetal gender effect was also considered in a 2×2×4 factorial, with two maternal feeding levels, two fetal gender and four stages of gestation. Maternal nutrition ($P=0,330$) and fetal gender ($P=0,518$) did not affect the fetal weight at slaughter. The mass, length and density of fetal intestines were not affected by maternal nutrition ($P \geq 0,260$). Interaction between maternal nutrition and stage of gestation was observed on the villi length of jejunum ($P=0,006$) and ileum ($P < 0,001$). Villi length of jejunum and ileum was higher ($P < 0,10$) in fetuses from SUP-fed cows than in fetuses from CON-fed cows at 139 days of gestation. However, at 199 days of gestation, the villi length of jejunum and ileum of fetuses from CON-fed cows was higher than in fetuses from SUP-fed cows. Despite these differences, maternal nutrition did not affect villi length of jejunum and ileum at 268 days of gestation ($P > 0,10$). Female fetuses were greater than male fetuses for total intestine mass ($P=0,052$), small intestine mass ($P=0,093$), large intestine mass ($P=0,022$), intestinal mass in proportion of body mass for small intestine ($P=0,017$), large intestine ($P < 0,001$) and total intestine ($P=0,003$), small intestine length ($P=0,077$), small intestine density

($P=0,021$), total intestine density ($P=0,009$) and villi length of jejunum ($P=0,001$) and ileum ($P=0,010$). We conclude that maternal nutrition affects the pathway of the development of fetal villi length throughout the gestation in fetuses from Holstein \times Gyr cows without, however, change the final villi length. Female had greater intestinal mass, density and villi length than males during the fetal phase in bovines.

KEYWORDS: Absorption, feeding level, fetal programming, intestinal morphology, small intestine, villi length

INTRODUÇÃO

Uma vez que, em bovinos, a absorção intacta de macromoléculas, como imunoglobulinas, através da parede intestinal, ocorre nas primeiras horas de vida, o correto desenvolvimento do trato intestinal, durante a fase intrauterina é crucial para redução da morbidade e mortalidade. Por ser o principal local de absorção de nutrientes, tem sido demonstrado que, mudanças no desenvolvimento intestinal, durante a fase fetal afetam permanentemente a eficiência de utilização de nutrientes (Trahair et al., 1997; Godfrey and Barker, 2000; Wu et al., 2006; Wang et al., 2008).

A restrição nutricional materna, durante o início até meados da gestação, pode provocar redução do tamanho do diâmetro e área de mucosa intestinal fetal, em ovinos (Trahair et al., 1997). Entretanto, outros estudos têm mostrado que fetos de vacas que sofreram restrição podem apresentar maior vascularização e proliferação celular no jejuno (Meyer et al., 2010) e maior comprimento relativo do intestino e altura de vilosidades (Duarte et al., 2013). Tem sido reportado, também, que ovinos filhos de mães que sofreram restrição nutricional tiveram melhor eficiência de absorção de imunoglobulinas nas primeiras horas pós-nascimento enquanto que aqueles filhos de mães superalimentadas apresentaram redução da eficiência de absorção de imunoglobulinas (Hammer et al., 2011). Em muitos desses casos, as alterações no desenvolvimento intestinal fetal foram sugeridas como adaptações em relação à provável menor ou maior capacidade materna de produzir colostro em função do nível alimentar recebido durante a gestação (Swanson et al., 2008; Hammer et al., 2011; Duarte et al., 2013). Efeitos diretos do plano alimentar materno sobre o desenvolvimento intestinal fetal independente da capacidade de produção materna de colostro ainda carecem de fontes. Nos estudos prévios realizados com bovinos (Meyer et al., 2010; Duarte et al., 2013) não se utilizaram animais de alta aptidão leiteira. Vacas

com aptidão leiteira, frequentemente, são submetidas a diferentes planos nutricionais durante a gestação, em função da lactação e período seco anteriores (Holtenius et al., 2003; Odensten et al., 2005; March et al., 2014) e, mesmo assim, produzem quantidade significativa de colostro na fase pós-natal (Kessler et al., 2013; Garcia et al., 2014).

Cabe ressaltar, também, que não têm sido reportados, na literatura, trabalhos evidenciando diferenças de sexo fetal em relação ao desenvolvimento intestinal intrauterino. Com base nisso, foi formulada a hipótese de que diferentes níveis alimentares maternos poderiam afetar o desenvolvimento intestinal fetal de bovinos com aptidão leiteira. De forma investigativa, propôs-se inclusão do sexo fetal como um dos fatores envolvidos no desenvolvimento intrauterino do intestino de bovinos. Sendo assim, objetivou-se avaliar o efeito do nível alimentar materno e sexo fetal sobre o desenvolvimento intestinal de fetos bovinos em diferentes estágios da gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil), seguindo os procedimentos padrões de manejo e bem estar animal, de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa.

Animais e manejo

Quarenta e quatro vacas Holandês × Gir, multíparas, não lactantes, com peso médio inicial de $480 \pm 10,1$ kg e idade média inicial de $5 \pm 0,5$ anos tiveram prenhez confirmada após protocolo de inseminação artificial em tempo fixo com sêmen de um único touro da raça Holandesa. Os procedimentos relativos ao protocolo reprodutivo utilizado para concepção das vacas, bem como o manejo pré-experimental dos animais

utilizados nesse experimento foi previamente descrito por Rotta et al. (2015). O dia da inseminação artificial foi considerado como o dia zero de gestação.

Aos 40 dias de gestação, as vacas foram confinadas em baias individuais (15 m², sendo 4 m² cobertos), contendo comedouros de concreto e bebedouros automáticos. Aos 60 dias de gestação procedeu-se diagnóstico do sexo fetal por meio de ultrassonografia (Aloka 500, sonda de 5 MHz, Aloka, Wallingford, CT, EUA).

O controle de consumo da dieta experimental foi realizado desde os 60 dias de gestação até que as vacas atingissem o tempo designado para o abate. Após o diagnóstico do sexo fetal, as vacas foram aleatoriamente separadas em dois grupos, com diferentes níveis alimentares, sendo: grupo controle (**CON**, n=24), com alimentação restrita a 1,15% do peso corporal, com base na matéria seca, ou superalimentadas (**SUP**, n=20), com alimentação à vontade. Ambos os grupos receberam a mesma dieta experimental, mas em níveis de consumo diferentes. O nível alimentar restrito (**CON**) foi planejado para que as vacas mantivessem a gestação com ganho mínimo de tecidos corporais (Gionbelli et al., 2015a), enquanto que o tratamento com consumo irrestrito (**SUP**) foi planejado para permitir acúmulo de reservas corporais.

A cada 28 dias, as vacas foram pesadas pela manhã para obtenção do peso corporal, sendo o consumo de matéria seca do tratamento **CON** ajustado para manter a restrição ao longo de todo o período gestacional.

A dieta experimental continha 11,1% de proteína bruta e 67,4% de nutrientes digestíveis totais e era composta por 93% de silagem de milho, 5% de farelo de algodão, 0,9% de uréia, 0,1% de sulfato de amônio e 1% de mistura mineral. A mistura mineral foi formulada para atender as exigências de manutenção e gestação, de acordo com o NRC (2001). As vacas foram alimentadas duas vezes ao dia, com 60% da dieta sendo ofertada na parte da manhã (0700 h) e 40% à tarde (1500 h). Para permitir consumo à vontade,

no tratamento SUP, o fornecimento de dieta foi ajustado para que ocorressem sobras na ordem de 5% da quantidade ofertada. Todas as vacas tiveram livre acesso à água durante todo o experimento.

Abate e coleta de amostras

Para avaliação do efeito do tempo de gestação, as vacas foram aleatoriamente divididas em quatro grupos (n=11 em cada grupo, sendo 6 CON e 5 SUP), que foram abatidos aos 139, 199, 241 e 268 dias de gestação, respectivamente. A casualização foi repetida até que houvesse número suficiente de fetos machos e fêmeas em cada subgrupo formado (tratamento nutricional dentro de tempo de gestação). Os quatro tempos de gestação nos quais ocorreu abate de vacas gestantes correspondem respectivamente a 50, 70, 85 e 95% do tempo médio de gestação de 284 dias para vacas Holandês × Gir (Mellado et al., 2011) e 18, 31, 73 e 96% do crescimento total do útero grávido (Gionbelli et al., 2015a).

Os procedimentos de abate foram realizados de acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1997). Antes do abate, as vacas foram submetidas a jejum de sólidos por 16 horas, com livre acesso à água. O abate foi realizado por insensibilização com dardo cativo seguido de exsanguinação por meio de secção da veia jugular. A eutanásia fetal seguiu os padrões da American Veterinary Medical Association Guidelines (AVMA, 2013).

Após a exsanguinação, o útero grávido foi imediatamente coletado e os fetos removidos. A dissecação dos fetos e o isolamento dos intestinos foi realizado de forma similar a Meyer et al. (2010). Para isso, fetos foram dissecados e o trato gastrintestinal foi cuidadosamente separado das vísceras, gordura e digesta. O intestino delgado foi

isolado a partir da válvula pilórica. O intestino grosso foi separado do intestino delgado a partir da junção do ceco (válvula ileocecal), sendo ambos medidos e pesados separadamente após retirada cuidadosa de seu conteúdo. Posteriormente, o intestino delgado foi separado entre duodeno, jejuno e íleo similarmente ao descrito por Soto-Navarro et al. (2004), conforme segue: o duodeno foi identificado como sendo o segmento a partir do piloro até o ponto diretamente adjacente à entrada da veia gastropilórica na veia mesentérica. O jejuno foi identificado como o segmento formado a partir da parte caudal do duodeno até a junção entre o jejuno e o íleo. Essa junção foi determinada mensurando-se 15 cm após a veia mesentérica a partir da convergência das veias mesentéricas e ileocecal até a arcada mesentérica. A partir desse ponto, uma medida de 100 cm foi realizada no sentido caudal ao intestino, sendo identificada como a porção terminal do jejuno e início do íleo. A porção ileal do intestino foi, então, considerada desde o final do jejuno até a junção ileocecal.

Morfologia das vilosidades intestinais

Amostras de jejuno e íleo, com cerca de 4 cm de comprimento, foram cuidadosamente coletadas na porção média de cada secção intestinal, e, então, fixadas em formalina 10% (peso/volume) em tampão fosfatado (pH 7,4) e, em seguida, embebidas usando *kit* para fixação em resina (HistoResin Mounting Kit, Leica[®], Heidelberg, BW, Alemanha). Fragmentos do intestino delgado foram cuidadosamente embebidos para permitir presença de grande número de vilosidades longitudinalmente orientadas em cada porção. As seções foram então cortadas a 3 µm, usando navalha de vidro em micrótomo Reichert Jung (mod. 1140 / autocut, Viena, Áustria). Um a cada 10 cortes obtidos em série foi distendido em água destilada, aderido em lâmina histológica, seco em chapa quente a 60 °C e, em seguida, corado com azul de toluidina-borato de

sódio, sendo, posteriormente, observado em microscópio de luz. Para cada segmento de intestino delgado (jejuno e íleo) de cada animal, somente vilosidades intactas, com lâmina própria evidente, na base e no topo, foram selecionadas para mensuração da altura das vilosidades.

Fotomicrografias foram obtidas por meio de uma câmera digital CMOS (Biocam GmbHs, Alemanha), acoplada a um microscópio óptico modelo Olympus BX50 (Center Valley, PA, Estados Unidos). Dez campos e um máximo de dez vilosidades por campo foram aleatoriamente selecionados para mensuração da altura das vilosidades. As imagens foram analisadas no software ImageJ[®] (National Institutes of Health, USA) e foi mensurado um total de cerca de 70 vilosidades por porção de cada animal (média de sete vilosidades por campo × 10 campos). Mensurações de vilosidades em curva foram realizadas pela ferramenta de linhas segmentadas do software ImageJ[®].

Análises estatísticas

Os dados foram analisados por meio de um modelo que incluiu os efeitos fixos de nutrição materna, sexo fetal, tempo de gestação e suas respectivas interações, perfazendo um arranjo fatorial 2×2×4 (dois níveis alimentares maternos, dois sexos e quatro tempos de gestação). O modelo estatístico utilizado é descrito abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + N_i + G_j + T_k + (N \times G)_{ij} + (N \times T)_{ik} + (G \times T)_{jk} + (N \times G \times T)_{ijk} + e_{ijkl}$$

em que N_i representa o i ésimo nível do efeito fixo nutrição materna, G_j o j ésimo nível do efeito fixo sexo fetal, T_k o k ésimo nível do efeito fixo tempo de gestação e e_{ijkl} o erro aleatório associado a Y_{ijkl} .

O teste de Shapiro-Wilk (Shapiro and Wilk, 1965), com $\alpha=0,10$, foi realizado para verificar a normalidade dos dados em todas as variáveis analisadas, antes de proceder-se a análise de variância. Médias de mínimos quadrados foram estimadas para todos os

efeitos e comparadas pelo teste de Tukey, quando necessário, a $\alpha=0,10$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SAS 9.2 (Statistical Analysis System Institute, Inc., Cary, NC, USA), utilizando-se o procedimento MIXED.

RESULTADOS

Das 44 vacas prenhes utilizadas no experimento, uma apresentou gestação gemelar (2,3%) e duas abortaram (4,5%). Dessa forma, os resultados apresentados correspondem aos dados de 41 gestações simples e sadias.

Vacas SUP apresentaram maior peso ao abate ($P<0,001$) do que vacas CON (Tabela 1), demonstrando a eficácia da aplicação do tratamento nutricional. Vacas CON ingeriram, em média, $6,38 \pm 0,32$ kg/d, enquanto vacas SUP ingeriram, em média, $11,24 \pm 0,37$ kg/d (Rotta et al., 2015). Vacas gestando machos e fêmeas não apresentaram variação no peso final ($P=0,976$). Não foram observadas interações entre tratamento nutricional, sexo fetal e tempo de gestação para o peso das vacas ao abate ($P\geq 0,557$).

O peso fetal (Tabela 1) foi afetado pelo tempo de gestação ($P<0,001$) e não sofreu influência do sexo fetal ($P=0,518$), do tratamento nutricional materno ($P=0,330$) ou de interações entre o tratamento nutricional materno, sexo e tempo de gestação ($P\geq 0,367$). Dessa forma, os resultados observados para variáveis relativas ao desenvolvimento do intestino, dentro de cada tempo de gestação, não sofreram efeito indireto do tamanho do feto.

A massa, comprimento e densidade intestinal fetal (Tabela 2) não foram afetados pela nutrição materna ($P\geq 0,260$) e nem sofreram efeito das interações entre o tratamento nutricional materno, sexo e tempo de gestação ($P\geq 0,113$). Fetos fêmeas apresentaram maior massa intestinal total ($P=0,052$) e das porções delgada ($P=0,093$) e grossa ($P=0,022$) do que fetos machos. A massa intestinal total e das porções aumentou ao

longo da gestação ($P < 0,001$). Entretanto, em função da massa corporal fetal (g/kg), não houve aumento significativo do intestino delgado ($P = 0,289$) ao longo da gestação, enquanto o intestino grosso fetal apresentou crescimento relativo maior do que o corpo fetal aos 199 dias de gestação ($P = 0,010$). Da mesma forma que para a massa total, fêmeas também apresentaram massa intestinal relativa à massa corporal (g/kg) maior do que machos, para o intestino delgado ($P = 0,017$), grosso ($P < 0,001$) e intestino total ($P = 0,003$). A diferença média entre os sexo fetais foi de 18% para a massa total e 13% para a massa relativa à massa corporal.

Embora diferissem na massa intestinal (Tabela 2), fetos fêmeas e machos não diferiram no comprimento (cm) do intestino delgado ($P = 0,753$) e intestino total ($P = 0,604$). Entretanto, o intestino grosso de fêmeas foi 9% mais comprido do que o de fetos machos ($P = 0,077$). O comprimento intestinal fetal total e das porções aumentou ao longo da gestação ($P < 0,001$), com destacado efeito para o aumento ocorrido dos 139 aos 199 dias (130%), sem haver, no entanto, aumento significativo entre 241 e 268 dias de gestação ($P > 0,10$).

A densidade (g/cm) do intestino delgado ($P = 0,021$) e do intestino total ($P = 0,009$) foi maior em fêmeas do que em machos (Tabela 2). Entretanto, não foi observada diferença entre os sexos para a densidade do intestino grosso ($P = 0,173$). Em ambas as porções intestinais e, também, no intestino total, observou-se aumento da densidade com o aumento do tempo de gestação ($P < 0,001$), sendo o intestino de fetos no final da gestação (269 dias) cerca de seis vezes mais denso do que na metade da gestação (139 dias).

Diferenças na trajetória do desenvolvimento das vilosidades intestinais, ao longo da gestação, foram observadas em função do tratamento alimentar materno (Tabela 3). Observou-se interação entre a nutrição materna e o tempo de gestação para altura das

vilosidades (μm) do jejuno ($P=0,006$) e íleo ($P<0,001$). No ponto médio da gestação (139 dias), fetos filhos de vacas SUP tiveram maior altura de vilosidades intestinais no jejuno e íleo ($P<0,10$) do que fetos filhos de vacas CON (Figura 1). Aos 199 dias de gestação, o resultado observado foi contrário, com fetos filhos de vacas CON apresentando maior altura de vilosidades no jejuno e íleo ($P<0,10$) do que fetos filhos de vacas SUP. Maiores vilosidades em fetos CON foram observadas, ainda, aos 241 dias de gestação no íleo ($P<0,10$), mas não no jejuno ($P>0,10$). Aos 268 dias de gestação, no entanto, a altura de vilosidades intestinais no íleo e jejuno foi igual ($P>0,10$) para fetos CON e SUP. O efeito geral da nutrição materna não foi significativo ($P=0,599$ e $0,484$, para jejuno e íleo, respectivamente), porém, as interações verificadas apontam para um desenvolvimento precoce das vilosidades nos filhos de vacas SUP, embora, ao aproximar-se do final da gestação, tenha havido efeito compensatório do aumento do tamanho das vilosidades nos fetos filhos de vacas CON.

Assim como para massa e densidade intestinal, fetos fêmeas também apresentaram maior altura de vilosidades no jejuno ($P=0,001$) e íleo ($P=0,010$) do que fetos machos (Tabela 3). De maneira geral, vilosidades do jejuno foram 11% maiores e do íleo 9% maiores em fêmeas do que em machos, sem haver interação entre sexo e nutrição materna ($P\geq 0,381$), tempo de gestação ($P\geq 0,128$) ou entre sexo, nutrição materna e tempo de gestação ($P\geq 0,560$).

DISCUSSÃO

Ao nosso conhecimento este é o primeiro trabalho que investigou os efeitos da nutrição materna e sexo fetal sobre o desenvolvimento intestinal fetal em bovinos com aptidão genética para produção de grande quantidade de colostro na fase pós-parto.

Efeitos marginais da variação do nível alimentar materno acima da manutenção, durante a gestação, foram observados sobre o desenvolvimento intestinal fetal. Grande parte dos estudos tem reportado alterações no desenvolvimento normal do intestino de fetos de ruminantes devido a possíveis adaptações à menor disponibilidade de colostro na fase pós-nascimento. Swanson et al. (2008) observaram menor produção de colostro, embora com mesma concentração de imunoglobulinas, em ovelhas que receberam 60% ou 140% das exigências nutricionais, comparadas às que receberam 100% das exigências nutricionais durante a gestação. No entanto, a eficiência de absorção de imunoglobulinas nos cordeiros filhos de ovelhas que sofreram restrição foi maior do que a dos demais tratamentos (Hammer et al., 2011). A hipótese de adaptações no desenvolvimento intestinal intrauterino em função do menor aporte nutricional materno durante a gestação, em bovinos, foi confirmada (Meyer et al., 2010; Duarte et al., 2013). No caso do presente estudo, entretanto, os níveis nutricionais maternos não proporcionaram restrição alimentar materna, uma vez que vacas CON e SUP tiveram, respectivamente, ganho de peso médio igual a 0,11 e 0,94 kg/d (Rotta et al., 2015). Quando fêmeas ruminantes gestantes foram alimentadas acima do nível de manutenção em comparação a um nível próximo à manutenção, observaram-se impactos negativos sobre o desenvolvimento intestinal fetal em bovinos (Duarte et al., 2013) e aos 180 dias de gestação em ovinos (Yanusova et al., 2013). Entretanto, efeitos compensatórios aos efeitos deletérios do excessivo nível alimentar materno sobre o desenvolvimento intestinal fetal foram observados na fase pós-natal, em que cordeiros filhos de ovelhas

alimentadas com 140% das exigências nutricionais, durante a gestação, tiveram maior atividade intestinal da maltase aos 180 dias de idade (Yanusova et al., 2013). Tais efeitos compensatórios assemelham-se àqueles observados em filhos de fêmeas ruminantes que sofreram restrição alimentar durante a gestação (Meyer et al., 2010; Hammer et al., 2011; Yanusova et al., 2013).

Cabe ressaltar, porém, que fetos oriundos de vacas SUP apresentaram desenvolvimento de vilosidades mais precoce do que fetos filhos de vacas COM, ao longo da gestação (Tabela 3, Figura 1). É possível sugerir que tal efeito tenha ocorrido devido ao maior aporte de nutrientes em filhos de vacas SUP, durante a fase intermediária da gestação, na qual as taxas de crescimento de órgãos internos são maiores (Gionbelli et al., 2015b). No entanto, tais diferenças não foram observadas nos abates realizados no terço final da gestação (241 e 268 dias), pressupondo que não haveria diferenças na altura de vilosidades no intestino da progênie em função do nível alimentar materno durante a gestação.

No presente estudo, a falta de efeito da nutrição materna sobre o resultado final do desenvolvimento intestinal fetal pode estar associada ao maior potencial de produção de colostro na fase pós-natal, uma vez que nenhum dos estudos anteriores utilizou, como modelo animal, animais com alto potencial de produção de leite. Os estudos que evidenciaram menor produção e qualidade do colostro produzido em função de plano alimentar materno fora do normal foram realizados com ovinos (Wallace et al., 2005; Swanson et al., 2008; Hammer et al., 2011). Em bovinos, especialmente em raças especializadas para produção de leite, estudos envolvendo efeitos da nutrição materna durante a gestação ou suplementação pré-parto sobre o peso ao nascimento, produção de colostro e absorção de imunoglobulinas têm recebido pouca atenção (Garcia et al., 2014). Diante disso, e a partir dos resultados observados nesse estudo, hipotetizou-se

que efeitos da nutrição materna sobre o desenvolvimento intestinal da progênie só são significativos quando as espécies ou raças não possuem grande aptidão leiteira (menor produção de colostro pós-parto) ou quando a restrição da nutrição intrauterina ocorre de maneira bastante drástica (Trahair et al., 1997).

É importante ressaltar que todos os efeitos observados nesse trabalho ocorreram sem que houvesse diferença no peso fetal entre os tratamentos alimentares maternos e sexo fetal ao longo da gestação (Tabela 1). Sendo assim, pesos fetais ou pesos ao nascimento semelhantes podem não evidenciar mudanças importantes ocorridas no desenvolvimento fisiológico normal durante a gestação, causadas por eventos distintos. Observações semelhantes são reportadas na literatura, em que mesmo não havendo mudanças no peso da progênie, drásticas mudanças ocorreram no desenvolvimento intestinal fetal (redução do diâmetro da área da mucosa e maturação dos enterócitos) quando a nutrição intrauterina for restringida (Trahair et al., 1997).

Um novo fato, evidenciado a partir da investigação realizada nesse estudo, é o maior desenvolvimento intestinal fetal em fêmeas do que em machos. Fetos fêmeas foram superiores a fetos machos para massa intestinal total, massa do intestino delgado, massa do intestino grosso, massa intestinal relativa à massa corporal para o intestino delgado, grosso e intestino total, comprimento do intestino delgado, densidade do intestino delgado e intestino total (Tabela 2) e altura de vilosidades no jejuno e íleo (Tabela 3), mesmo sem diferença no peso fetal (Tabela 1). Estudos relacionando sexo desenvolvimento fetal são escassos em bovinos. Por outro lado, a programação da lactação subsequente em função do sexo fetal, durante a gestação, em vacas leiteiras, foi evidenciada recentemente (Hinde et al., 2014), usando banco de dados de 2,39 milhões de lactações de vacas da raça Holandesa. Hinde et al. (2014) observaram que a gestação de uma fêmea, na primeira parição, aumenta a produção de leite em 445 kg ao longo das

duas primeiras lactações, em comparação à gestação de um macho, suportando uma programação da função mamária pelo conceito *in utero*.

A alocação adaptativa dos recursos maternos, com favorecimento de um dos sexos em mamíferos, é objeto de estudo desde a década de 70 (Trivers and Willard, 1973; Clark, 1978). São várias as espécies de mamíferos em que os recursos maternos são alocados de forma diferenciada a um dos dois sexos, sendo que os fatores genéticos e ambientais que desencadearam tal evolução adaptativa de favorecimento materno a um dos dois sexos é variável entre espécies (Smith, 1980; Hinde et al., 2014). A hipótese melhor aceita e mais investigada acerca do assunto é a hipótese Trivers-Willard (Trivers and Willard, 1973), que sugere que as fêmeas, em função do estado fisiológico, evoluem dentro da espécie para alocar seus recursos de forma preferencial ao sexo cujo retorno para a espécie possa ser melhor do que o investimento. No entanto, as causas da programação da glândula mamária para maior produção de leite quando vacas leiteiras estão gestando fêmeas permanecem obscuras (Hinde et al., 2014). O maior desenvolvimento intestinal na fase pré-natal, em fêmeas, pode estar relacionado a isso, e à hipótese de Trivers-Willard como um todo (Trivers and Willard, 1973). Em raças bovinas especializadas para produção de leite, o efeito pós-natal do intestino mais desenvolvido ou da maior produção de leite materna não tem sido reportado e é de difícil estudo, uma vez que, normalmente, a progênie é separada da mãe após o nascimento e recebe aleitamento artificial, sendo a ordenha realizada de maneira mecânica. Mesmo em bovinos de corte, cujas crias permanecem junto às mães, apenas efeitos marginais sobre variações na produção de leite em função do sexo da cria são observadas (Christian et al., 1965; Rutledge et al., 1971; Minick et al., 2001). Vale notar, no entanto, que efeitos contrários às suposições esperadas ocorrem na prática,

uma vez que bezerros machos normalmente apresentam crescimento mais acelerado do que fêmeas durante a fase de aleitamento.

Uma possível hipótese acerca do favorecimento do desenvolvimento intestinal e da maior produção de leite quando fêmeas são geradas pode estar relacionada às taxas naturais de concepção de machos e fêmeas em bovinos leiteiros. As taxas naturais de concepção de machos são ligeiramente maiores do que as de fêmeas, variando de 50 a 54%, contra 46 a 50% de fêmeas (Foote, 1977; Del Río et al., 2007). Como bovídeos são espécies poligâmicas, na natureza, um número menor de touros seria necessário. Para compensar tais desvios, a evolução da alocação dos recursos maternos e do desenvolvimento intrauterino para favorecer a sobrevivência pós-natal (intestino mais desenvolvido ao nascimento, maior carga imunitária, maior produção de leite materna) poderia ter sido direcionada para favorecer fêmeas, como compensação evolutiva à dificuldade para conceber proporção maior de fêmeas. Outro fator a ser considerado como influenciador do desenvolvimento intestinal fetal é a variação no perfil hormonal materno, durante a gestação, como função do sexo fetal (Rudolph et al., 2003; Neville et al., 2012).

No entanto, a despeito das suposições aqui mencionadas, as causas e/ou consequências do efeito de sexo sobre o desenvolvimento intestinal fetal ainda permanecem inconclusivas. Supõe-se, entretanto, que estejam correlacionadas com a programação da produção de leite, nas lactações subsequentes, em função do sexo do feto gestado.

CONCLUSÃO

Alteração dos níveis nutricionais maternos acima da manutenção, durante a gestação, afeta a trajetória do desenvolvimento das vilosidades intestinais, ao longo da gestação, em fetos de vacas Holandês x Gir sem, no entanto, afetar o tamanho final das vilosidades. Fêmeas possuem maior massa intestinal, densidade intestinal e tamanho de vilosidades do que machos, durante a fase fetal.

LITERATURA CITADA

- AVMA. 2013. Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association, Schaumburg, IL, USA.
- Brasil. 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal [*Regulation of Industrial and Sanitary Inspection of Animal Products*]. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, Brazil (In Portuguese).
- Christian, L., E. Hauser, and A. Chapman. 1965. Association of preweaning and postweaning traits with weaning weight in cattle. *J. Anim. Sci.* 24: 652-659.
- Clark, A. B. 1978. Sex Ratio and Local Resource Competition in a Prosimian Primate. *Science* 201: 163-165.
- Del Río, N. S., S. Stewart, P. Rapnicki, Y. Chang, and P. Fricke. 2007. An observational analysis of twin births, calf sex ratio, and calf mortality in Holstein dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 90: 1255-1264.
- Duarte, M. S., M. P. Gionbelli, P. V. R. Paulino, N. V. L. Serão, T. S. Martins, P. I. S. Tótaró, C. A. Neves, S. C. Valadares Filho, M. V. Dodson, M. Zhu, and M. Du. 2013. Effects of maternal nutrition on development of gastrointestinal tract of bovine fetus at different stages of gestation. *Livestock Science* 153: 60-65.
- Footo, R. 1977. Sex ratios in dairy cattle under various conditions. *Theriogenology* 8: 349-356.
- Garcia, M., L. F. Greco, M. G. Favoreto, R. S. Marsola, L. T. Martins, R. S. Bisinotto, J. H. Shin, A. L. Lock, E. Block, W. W. Thatcher, J. E. P. Santos, and C. R. Staples. 2014. Effect of supplementing fat to pregnant nonlactating cows on

- colostral fatty acid profile and passive immunity of the newborn calf. *J. Dairy Sci.* 97: 392-405.
- Gionbelli, M. P., M. S. Duarte, S. C. Valadares Filho, E. Detmann, M. L. Chizzotti, F. C. Rodrigues, D. Zanetti, T. R. S. Gionbelli, and M. G. Machado. 2015a. Achieving Body Weight Adjustments for Feeding Status and Pregnant or Non-Pregnant Condition in Beef Cows. *PLoS ONE* 9: e115724.
- Gionbelli, M. P., M. S. Duarte, S. C. Valadares Filho, H. C. Freetly, E. Detmann, D. F. T. Sahtler, T. R. S. Gionbelli, and K. E. Hales. 2015b. Quantitative aspects of growth and development of cow, udder and gravid uterus of Zebu beef cows during pregnancy. *PLoS One* (in revision - PONE-D-14-27792).
- Godfrey, K. M., and D. J. Barker. 2000. Fetal nutrition and adult disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71: 1344s-1352s.
- Hammer, C. J., J. F. Thorson, A. M. Meyer, D. A. Redmer, J. S. Luther, T. L. Neville, J. J. Reed, L. P. Reynolds, J. S. Caton, and K. A. Vonnahme. 2011. Effects of maternal selenium supply and plane of nutrition during gestation on passive transfer of immunity and health in neonatal lambs. *J. Anim. Sci.* 89: 3690-3698.
- Hinde, K., A. J. Carpenter, J. S. Clay, and B. J. Bradford. 2014. Holsteins Favor Heifers, Not Bulls: Biased Milk Production Programmed during Pregnancy as a Function of Fetal Sex. *PLoS One* 9: e86169.
- Holtenius, K., S. Agenäs, C. Delavaud, and Y. Chilliard. 2003. Effects of Feeding Intensity During the Dry Period. 2. Metabolic and Hormonal Responses. *J. Dairy Sci.* 86: 883-891.
- Kessler, E. C., R. M. Bruckmaier, and J. J. Gross. 2013. Milk production during the colostrum period is not related to the later lactational performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97: 2186-2192.
- March, M. D., M. J. Haskell, M. G. G. Chagunda, F. M. Langford, and D. J. Roberts. 2014. Current trends in British dairy management regimens. *J. Dairy Sci.* 97: 7985-7994.
- Mellado, M., F. Coronel, A. Estrada, and F. G. Ríos. 2011. Lactation performance of Holstein and Holstein x Gyr cattle under intensive condition in a subtropical environment. *Tropical and subtropical agroecosystems* 14: 927-931.
- Meyer, A. M., J. J. Reed, K. A. Vonnahme, S. A. Soto-Navarro, L. P. Reynolds, S. P. Ford, B. W. Hess, and J. S. Caton. 2010. Effects of stage of gestation and nutrient restriction during early to mid-gestation on maternal and fetal visceral

- organ mass and indices of jejunal growth and vascularity in beef cows. *J. Anim. Sci.* 88: 2410-2424.
- Minick, J., D. Buchanan, and S. Rupert. 2001. Milk production of crossbred daughters of high-and low-milk EPD Angus and Hereford bulls. *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE-MENASHA THEN ALBANY THEN CHAMPAIGN ILLINOIS-* 79: 1386-1393.
- Neville, M. C., S. M. Anderson, J. L. McManaman, T. M. Badger, M. Bunik, N. Contractor, T. Crume, D. Dabelea, S. M. Donovan, N. Forman, D. N. Frank, J. E. Friedman, J. B. German, A. Goldman, D. Hadsell, M. Hambidge, K. Hinde, N. D. Horseman, R. C. Hovey, E. Janoff, N. F. Krebs, C. B. Lebrilla, D. G. Lemay, P. S. MacLean, P. Meier, A. L. Morrow, J. Neu, L. A. Nommsen-Rivers, D. J. Raiten, M. Rijnkels, V. Seewaldt, B. D. Shur, J. VanHouten, and P. Williamson. 2012. Lactation and neonatal nutrition: defining and refining the critical questions. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 17: 167-188.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Odensten, M. O., Y. Chilliard, and K. Holtenius. 2005. Effects of Two Different Feeding Strategies During Dry-Off on Metabolism in High-Yielding Dairy Cows. *J. Dairy. Sci.* 88: 2072-2082.
- Rotta, P. P., S. C. Valadares Filho, T. R. S. Gionbelli, L. F. Costa e Silva, T. E. Engle, M. I. Marcondes, F. S. Machado, F. A. C. Villadiego, and L. H. R. Silva. 2015. Effects of day of gestation and feeding regimen in Holstein x Gyr cows: I. Apparent total tract digestibility, nitrogen balance, and fat deposition. *J. Dairy. Sci.:* (accepted).
- Rudolph, M. C., J. L. McManaman, L. Hunter, T. Phang, and M. C. Neville. 2003. Functional development of the mammary gland: use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 8: 287-307.
- Rutledge, J., O. Robison, W. Ahlschwede, and J. Legates. 1971. Milk yield and its influence on 205-day weight of beef calves. *J. Anim. Sci.* 33: 563-567.
- Shapiro, S. S., and M. B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.

- Smith, J. M. 1980. A new theory of sexual investment. *Behav Ecol Sociobiol* 7: 247-251.
- Soto-Navarro, S. A., T. L. Lawler, J. B. Taylor, L. P. Reynolds, J. J. Reed, J. W. Finley, and J. S. Caton. 2004. Effect of high-selenium wheat on visceral organ mass, and intestinal cellularity and vascularity in finishing beef steers. *J. Anim. Sci.* 82: 1788-1793.
- Swanson, T. J., C. J. Hammer, J. S. Luther, D. B. Carlson, J. B. Taylor, D. A. Redmer, T. L. Neville, J. J. Reed, L. P. Reynolds, J. S. Caton, and K. A. Vonnahme. 2008. Effects of gestational plane of nutrition and selenium supplementation on mammary development and colostrum quality in pregnant ewe lambs. *J Anim Sci* 86: 2415-2423.
- Trahair, J. F., T. M. DeBarro, J. S. Robinson, and J. A. Owens. 1997. Restriction of Nutrition In Utero Selectively Inhibits Gastrointestinal Growth in Fetal Sheep. *The Journal of Nutrition* 127: 637-641.
- Trivers, R. L., and D. E. Willard. 1973. Natural Selection of Parental Ability to Vary the Sex Ratio of Offspring. *Science* 179: 90-92.
- Wallace, J. M., J. S. Milne, and R. P. Aitken. 2005. The effect of overnourishing singleton-bearing adult ewes on nutrient partitioning to the gravid uterus. *British Journal of Nutrition* 94: 533-539.
- Wang, J., L. Chen, D. Li, Y. Yin, X. Wang, P. Li, L. J. Dangott, W. Hu, and G. Wu. 2008. Intrauterine Growth Restriction Affects the Proteomes of the Small Intestine, Liver, and Skeletal Muscle in Newborn Pigs. *The Journal of Nutrition* 138: 60-66.
- Wu, G., F. W. Bazer, J. M. Wallace, and T. E. Spencer. 2006. BOARD-INVITED REVIEW: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J. Anim. Sci.* 84: 2316.
- Yanusova, R. D., T. L. Neville, K. A. Vonnahme, C. J. Hammer, J. J. Reed, J. B. Taylor, D. A. Redmer, L. P. Reynolds, and J. S. Caton. 2013. Impacts of maternal selenium supply and nutritional plane on visceral tissues and intestinal biology in 180-day-old offspring in sheep. *J. Anim. Sci.* 91: 2229-2242.

Tabela 1. Efeito do nível alimentar materno, sexo fetal e tempo de gestação sobre o peso inicial e final das vacas e peso fetal

Item	Nutrição materna ¹		Sexo fetal		Tempo de gestação				P-valor ²						
	CON (n=23)	SUP (n=18)	Fêmeas (n=21)	Machos (n=20)	139 (n=9)	199 (n=11)	241 (n=11)	268 (n=10)	N	S	T	N×G	N×T	G×T	N×G×T
Peso inicial das vacas, kg	477±11	477±12	476±12	479±12	489±19	478±15	482±15	460±18	0,992	0,860	0,688	0,745	0,661	0,839	0,600
Peso final das vacas, kg	523±14	646±15	584±14	585±15	558±23	574±19	596±19	611±22	<0,001	0,976	0,344	0,646	0,557	0,578	0,694
Peso fetal ao abate, kg	16,4±0,7	17,3±0,7	17,1±0,7	16,5±0,7	1,84 ^d ±1,06	10,0 ^c ±0,8	22,8 ^b ±0,9	32,8 ^a ±1,0	0,330	0,518	<0,001	0,925	0,885	0,367	0,893

^{a-d}Médias seguidas por letras diferentes diferem a P<0,10.

¹CON = tratamento controle e SUP = vacas superalimentadas.

²N = efeito da nutrição materna, S = efeito do sexo fetal e T = efeito do tempo de gestação.

Tabela 2. Efeito do nível alimentar materno, sexo fetal e tempo de gestação sobre o tamanho e peso intestinal fetal

Item	Nutrição materna ¹		Sexo fetal		Tempo de gestação				P-valor ²						
	CON (n=23)	SUP (n=18)	Fêmeas (n=21)	Machos (n=20)	139 (n=9)	199 (n=11)	241 (n=11)	268 (n=10)	N	S	T	N×S	N×T	S×T	N×S×T
Intestino delgado, g	252±16	250±17	271±16	231±17	20,7 ^d ±25,3	163 ^c ±21	329 ^b ±22	492 ^a ±25	0,950	0,093	<0,001	0,525	0,822	0,904	0,922
Intestino grosso, g	74,4±4,1	77,7±4,3	83,4±4,1	68,8±4,2	5,43 ^d ±6,51	50,2 ^c ±5,3	101 ^b ±6	148 ^a ±7	0,576	0,022	<0,001	0,525	0,288	0,546	0,372
Intestino total, g	326±18	328±19	355±18	300±19	26,1 ^d ±29,3	213 ^c ±24	429 ^b ±25	640 ^a ±29	0,943	0,052	<0,001	0,491	0,803	0,838	0,811
Intestino delgado, g/kg MF ³	901±32	887±34	901±32	886±33	359 ^d ±50	852 ^c ±41	1139 ^b ±43	1225 ^a ±50	0,766	0,753	<0,001	0,346	0,345	0,977	0,748
Intestino grosso, g/kg MF ³	126±4	133±4	135±4	124±4	65,5 ^c ±6,6	125 ^b ±5	160 ^a ±6	168 ^a ±7	0,260	0,077	<0,001	0,214	0,342	0,594	0,393
Intestino total, g/kg MF ³	1027±34	1020±36	1036±34	1010±35	425 ^c ±53	977 ^b ±43	1299 ^a ±46	1392 ^a ±53	0,888	0,604	<0,001	0,298	0,439	0,972	0,696
Intestino delgado, g/kg PF	14,8±0,5	15,2±0,5	15,9±0,5	14,1±0,5	14,5±0,8	16,1±0,6	14,5±0,6	14,8±0,7	0,564	0,017	0,289	0,877	0,116	0,905	0,653
Intestino grosso, g/kg PF	4,28±0,07	4,38±0,07	4,58±0,07	4,07±0,07	4,01 ^c ±0,11	4,55 ^a ±0,10	4,29 ^b ±0,10	4,46 ^{ab} ±0,10	0,352	<0,001	0,010	0,423	0,219	0,113	0,248
Intestino total, g/kg PF	19,0±0,5	19,6±0,5	20,5±0,5	18,2±0,5	18,5±0,7	20,6±0,7	19,0±0,7	19,2±0,8	0,409	0,003	0,217	0,897	0,113	0,857	0,358
Intestino delgado, g/cm	0,234±0,001	0,242±0,01	0,256±0,01	0,220±0,01	0,071 ^d ±0,01	0,192 ^c ±0,01	0,290 ^b ±0,01	0,399 ^a ±0,01	0,579	0,021	<0,001	0,857	0,417	0,882	0,988
Intestino grosso, g/cm	0,488±0,02	0,504±0,02	0,516±0,02	0,476±0,02	0,103 ^d ±0,03	0,368 ^c ±0,02	0,635 ^b ±0,02	0,878 ^a ±0,03	0,591	0,173	<0,001	0,755	0,770	0,489	0,801
Intestino total, g/cm	0,267±0,01	0,275±0,01	0,292±0,01	0,250±0,01	0,076 ^d ±0,01	0,219 ^c ±0,01	0,332 ^b ±0,01	0,457 ^a ±0,01	0,584	0,009	<0,001	0,731	0,307	0,698	0,887

^{a-d}Médias seguidas por letras diferentes diferem a P<0,10 para a mesma variável.

¹CON = tratamento controle e SUP = vacas superalimentadas.

²N = efeito da nutrição materna, S = efeito do sexo fetal e T = efeito do tempo de gestação.

³MF = massa corporal fetal

Tabela 3. Efeito do nível alimentar materno, sexo fetal e tempo de gestação sobre o tamanho de vilosidades em diferentes porções do intestino delgado fetal

Altura de vilosidades, μm	Nutrição materna ¹		Sexo fetal		Tempo de gestação				P-valor ²						
	CON (n=23)	SUP (n=18)	Fêmeas (n=21)	Machos (n=20)	139 (n=9)	199 (n=11)	241 (n=11)	268 (n=10)	N	<u>S</u>	T	N×S	N×T	S×T	N×S×T
Jejuno	138±3	140±3	147±3	132±3	109±4	138±4	145±4	165±4	0,599	0,001	<0,001	0,736	0,006	0,274	0,560
CON	-	-	-	-	94,2 ^e ±6,4	145 ^b ±5	148 ^b ±5	165 ^a ±5	-	-	-	-	-	-	-
SUP	-	-	-	-	123 ^d ±6	131 ^{cd} ±5	143 ^{bc} ±5	164 ^a ±5	-	-	-	-	-	-	-
Íleo	85,0±1,6	83,3±1,8	87,6±1,8	80,7±1,7	59,6±2,6	83,6±2,7	94,7±2,7	98,6±2,7	0,484	0,010	<0,001	0,381	<0,001	0,128	0,776
CON	-	-	-	-	50,0 ^f ±3,9	89,6 ^{bc} ±4,2	103 ^a ±4	97,1 ^{ab} ±4,2	-	-	-	-	-	-	-
SUP	-	-	-	-	69,4 ^e ±3,9	77,6 ^d ±4,2	86,0 ^{cd} ±4,2	100 ^a ±4	-	-	-	-	-	-	-

^{a-f}Médias seguidas por letras diferentes diferem a $P < 0,10$ para a mesma variável.

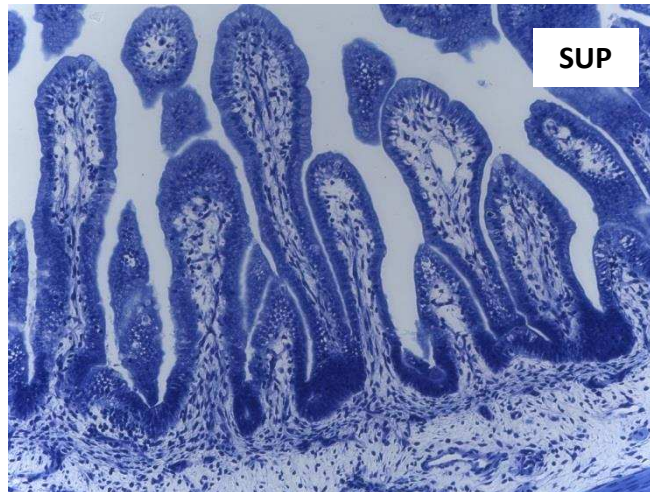
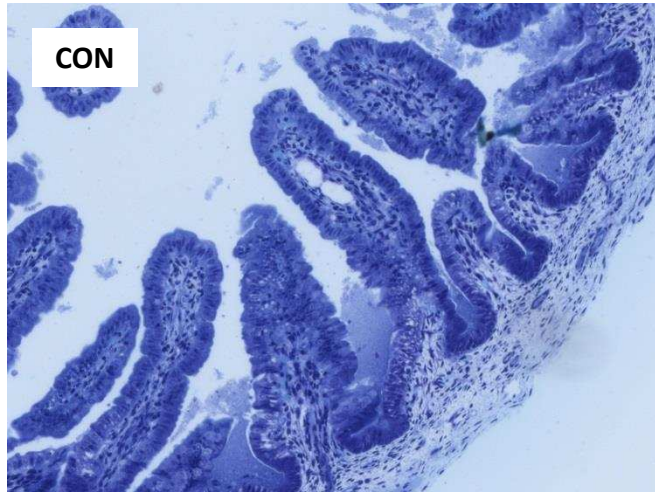
¹CON = tratamento controle e SUP = vacas superalimentadas.

²N = efeito da nutrição materna, S = efeito do sexo fetal e T = efeito do tempo de gestação.

Legendas das figuras

Figura 1. Fotomicrografia, em mesma escala, de amostras de íleo de fetos machos com 139 dias de gestação, sendo um filho de vaca CON (esquerda) e outro filho de vaca SUP (direita), evidenciando diferença na altura das vilosidades.

Figura 1.



CONCLUSÕES GERAIS

Nutrição materna ao longo da gestação afeta a trajetória do desenvolvimento do músculo esquelético e intestino fetal. No entanto, os efeitos que persistem até o final da gestação são marginais.

Fêmeas apresentam maior desenvolvimento intestinal em relação aos machos, durante a fase fetal.

Machos apresentam maior desenvolvimento do tecido muscular esquelético, em relação a fêmeas, durante a fase fetal.