

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**HELOÍSE TRAUTENMÜLLER**

**USO DA 1,25-DIHDROXICOLECALCIFEROL GLICOSÍDEO NA**  
**SUBSTITUIÇÃO PARCIAL OU TOTAL DO COLECALCIFEROL NA**  
**ALIMENTAÇÃO DE LEITÕES**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**HELOÍSE TRAUTENMÜLLER**

**USO DA 1,25-DIHDROXICOLECALCIFEROL GLICOSÍDEO NA**  
**SUBSTITUIÇÃO PARCIAL OU TOTAL DO COLECALCIFEROL NA**  
**ALIMENTAÇÃO DE LEITÕES**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção Animal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho.  
Coorientador: Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira.

Coorientador: Dr. Eduardo Raele de Oliveira.

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**2020**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Trautenmüller, Heloíse

Uso da 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo na substituição parcial ou total do colecalciferol na alimentação de leitões / Heloíse Trautenmüller; orientador(a), Paulo Levi de Oliveira Carvalho; coorientador(a), Eduardo Raele de Oliveira, coorientador(a)II, Newton Tavares Escocard de Oliveira, 2020.

78 f.

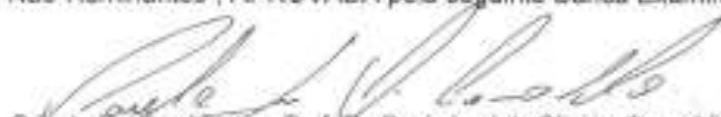
Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2020.

1. Desempenho. 2. Desenvolvimento ósseo. 3. Nutrição de suínos. 4. Vitamina D. I. Carvalho, Paulo Levi de Oliveira. II. Oliveira, Eduardo Raele de. III. Oliveira, Newton Tavares Escocard de. IV. Título.

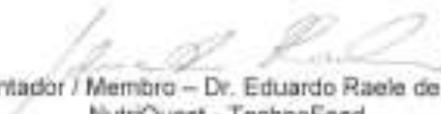
## HELOÍSE TRAUTENMÜLLER

Uso da 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo na substituição parcial e total do colecalciferol na alimentação de leitões

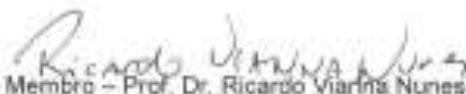
TESE apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de "Doutora em Zootecnia", Área de Concentração "Produção e Nutrição Animal", Linha de Pesquisa "Produção e Nutrição de Não-Ruminantes", APROVADA pela seguinte Banca Examinadora:



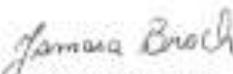
Orientador Presidente – Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - Campus de Mal. Cândido Rondon



Coorientador / Membro – Dr. Eduardo Rael de Oliveira  
NutriQuest - TechnoFeed



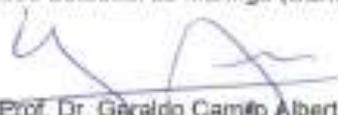
Membro – Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) - Campus de Mal. Cândido Rondon



Membro – Dr.<sup>a</sup> Jomara Broch  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) -  
Campus de Mal. Cândido Rondon (PNPD/PPZ)



Membro – Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha  
Universidade Estadual de Maringá (UEM)



Membro – Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton  
Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina  
Marechal Cândido Rondon, 9 de dezembro de 2019.

## **DEDICATÓRIA**

**Ao meu maior incentivador, Renan Locatelli.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e pela saúde.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Levi de Oliveira Carvalho, por acreditar no meu potencial e não desistir do meu trabalho.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em especial ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade.

Aos meus pais, Herton e Iara Trautenmüller, que nunca mediram esforços para que eu pudesse me dedicar aos estudos durante todos esses anos.

À minha família, que sempre acreditou e confiou em mim.

Ao meu namorado, Renan Locatelli, por não me deixar desistir e se fazer presente sempre que precisei, me ajudando nos trabalhos da fazenda e por ser meu apoio emocional em casa.

Às minhas amigas da vida, Paula Franciele Becker, Raíssa Ostjen e Priscila Schulz Henz, pelo apoio e por entenderem a minha ausência. Obrigada por torcerem por mim!

A todos os meus colegas do Grupo de Estudos e Pesquisa em Suinocultura: obrigada por toda ajuda durante os experimentos, ninguém faz nada sozinho.

Às minhas queridas amigas e colegas de profissão, Adriana Bulcão Bock de Faria, Juliana Stocco Martins, Gleicianny de Brito Santos, Sthefany Caroline Marques Viana e Aparecida da Costa Oliveira. Obrigada por tudo!

Ao meu amigo Lucas Wachholz, pelas inúmeras vezes que me ajudou, sou grata.

Ao Professor Dr. Luís Daniel Giusti Bruno, pela amizade e apoio emocional em todos estes anos.

Aos parceiros da Technofeed, Dr. Eduardo Rael e Giselle Gallio, pelo incentivo à ciência e acompanhamento do projeto.

Ao secretário do programa, Paulo Morsch, pela dedicação ao trabalho.

Aos funcionários da fazenda experimental Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, por estarem sempre dispostos a ajudar e compartilharem seu chimarrão e conversar.

E todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram com o meu trabalho.

Meu muito obrigada!

# USO DA 1,25-DIHIIDROXICOLECALCIFEROL GLICOSÍDEO NA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL OU TOTAL DO COLECALCIFEROL NA ALIMENTAÇÃO DE LEITÕES

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) e 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) na ração de leitões na fase de creche. Foram realizados dois experimentos, o ensaio de digestibilidade, utilizando 36 leitões, machos inteiros, com peso médio de 18,79±3,37 kg, distribuídos em um delineamento em blocos, com quatro tratamentos, nove repetições e um animal por unidade experimental (UE). Os tratamentos consistiram em: D<sub>3</sub> = 1969 UI de colecalciferol; Controle Negativo (CN) = ração isenta de Vitamina D; 50% = 984,5 UI de colecalciferol + 0,375 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; e 100% = ração com 0,750 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo. Foram avaliados os teores de cálcio (Ca) e fósforo (P) na ração, fezes e urina, consumo de Ca e P total, excreção de Ca e P, coeficientes de digestibilidade de matéria seca, proteína bruta, matéria orgânica, Ca e P. O segundo experimento foi um ensaio de desempenho zootécnico, em que se utilizou 128 leitões híbridos, machos inteiros, com aproximadamente 21 dias de idade e peso corporal médio inicial de 6,82±0,38kg, distribuídos em um delineamento em blocos, com oito repetições e quatro animais por UE. Os tratamentos foram: 100/0 = 100% da exigência de vitamina D suplementada pelo colecalciferol (2707 UI na fase pré-inicial I, 2405 UI, na fase pré-inicial II e 1969 UI na fase inicial); 50/50 = 50% da exigência suplementada pelo colecalciferol de acordo com cada fase de criação + 0,25 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; 25/75 = 25% da exigência de colecalciferol para cada fase + 0,375 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo e 0/100 = 0,50 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo. Determinou-se o peso corporal inicial (PCI, kg), peso corporal final (PCF, kg), consumo de ração diário médio (CRDM, kg dia<sup>-1</sup>), ganho de peso corporal diário médio (GPCDM, kgdia<sup>-1</sup>) e a taxa de conversão alimentar (TCA, kg kg<sup>-1</sup>). Foram analisadas as concentrações de cálcio (Ca), fósforo (P), fosfatase alcalina (FA) e 25(OH)D<sub>3</sub> no sangue. Ao final do período experimental foram abatidos 24 animais. As carcaças foram evisceradas, coletados e pesados o coração, o fígado, os rins, os intestinos e o baço para a obtenção do peso relativo dos órgãos e pH dos órgãos gastrointestinais. Os ossos foram coletados para as análises de morfometria óssea. As comparações entre as médias de tratamentos foram realizadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% ou

10% de probabilidade. O erro  $\beta$  dos parâmetros foi utilizado para ajudar a explicar os valores de p de 5 a 10% de probabilidade. A digestibilidade aparente dos nutrientes não foi influenciada ( $P>0,05$ ) pelos tratamentos, bem como a excreção de  $\text{Ca}^{2+}$  e P. O desempenho zootécnico dos leitões apresentou diferenças entre os tratamentos para as variáveis GPD ( $P=0,031$ ) e para o CRD ( $P=0,060$ ) na fase pré-inicial I, PCF ( $P=0,095$ ) e CRD ( $P=0,032$ ) na fase pré-inicial I + II, CRD na fase inicial, CRD e conversão alimentar (CA) no período total do experimento. Para as concentrações plasmáticas, o cálcio na fase pré-inicial II ( $P=0,058$ ), a maior concentração foi no tratamento 50/50. A fosfatase alcalina apresentou diferença entre os tratamentos na fase inicial ( $P<0,0001$ ), sendo que o tratamento 25/75 promoveu o menor valor plasmático (481,63 U/L). A combinação das duas formas de vitamina D resultou em um aumento significativo de 9% na concentração plasmática de cálcio na fase pré-inicial II. Foram encontrados efeitos para o peso relativo do baço ( $P=0,032$ ) com redução do peso no tratamento 0/100 e efeito ( $P=0,048$ ) para a concentração de fósforo no órgão. O coração apresentou efeito para a matéria seca ( $P=0,061$ ) com a maior concentração no tratamento 100/0. O pH do estômago demonstrou um efeito ( $P=0,076$ ) com a redução do pH no tratamento 50/50, em contrapartida, apresentou os valores mais elevados de pH no jejuno ( $P=0,000$ ) e íleo ( $P=0,002$ ). A morfometria óssea dos metatarsos apresentou diferenças para a largura da epífise ( $P=0,013$ ), altura da diáfise ( $P=0,068$ ), largura da diáfise ( $P=0,049$ ) e no tamanho da placa de crescimento ( $P=0,002$ ). Verificou-se uma melhora no desenvolvimento ósseo pelo aumento de 0,7 mm na placa de crescimento e 6,6 mm na largura da diáfise dos ossos dos animais alimentados com a forma ativa da vitamina D. Houve redução do peso relativo do baço em 25,4% no tratamento com a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  em relação ao tratamento com o colecalciferol. O tratamento 50/50 apresentou os maiores valores de pH intestinal comparado ao tratamento 0/100, que demonstrou redução de 4,7% no pH do jejuno e 7% no íleo. Neste contexto, a utilização da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na suplementação de rações para os leitões se mostra eficiente na manutenção do pH estomacal e intestinal, bem como no desenvolvimento ósseo dos suínos. Além disso, diante dos resultados encontrados, sugere-se que há um aumento na imunidade inata dos leitões pela redução no tamanho do baço, indicando pouca função deste órgão.

**PALAVRAS-CHAVE:** desempenho, desenvolvimento ósseo, nutrição de suínos, vitamina D.

## USE OF 1,25-DIHYDROXYCHOLECALCIFEROL GLYCOSIDES IN PARTIAL OR TOTAL REPLACEMENT OF CHOLECALCIFEROL FOR PIGLETS

### ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>) and 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) on the feed of piglets in the nursery phase. Two experiments were carried out, digestibility experiment, using 36 male piglets with an average weight of  $18,79 \pm 3,37$  kg, distributed in a block design, with four treatments, nine repetitions and one animal per experimental unit (EU). The procedures consisted of: D<sub>3</sub> = 1969 IU of cholecalciferol; Negative control (NC) = vitamin D-free diet; 50% = 984,5 IU cholecalciferol + 0,375 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glycoside; and 100% = feed with 0,750 µg of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glycoside. The levels of calcium (Ca) and phosphorus (P) in feed, feces and urine, total consumption of Ca and P, excretion of Ca and P, and digestibility coefficients of dry matter, crude protein, organic matter, Ca and P were analysed. The zootechnical performance experiment used 128 hybrid piglets, whole males, with approximately 21 days of age and an initial average body weight of  $6,82 \pm 0,38$  kg, distributed in a block design, with eight replicates and four animals per EU. The treatments were: 100/0 = 100% of vitamin D supplemented by cholecalciferol (2707 IU in the pre-initial I, 2405 IU in the pre-initial II and 1969 IU in the initial phase); 50/50 = 50% of the addition supplemented by cholecalciferol according to each phase + 0,25 µg of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glycoside; 25/75 = 25% of cholecalciferol for each phase + 0,375 µg of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glycoside and 0/100 = 0,50 µg of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glycoside. Determination of initial body weight (IBW, kg), final body weight (FBW, kg), average daily consumption (ADC, kg day<sup>-1</sup>), average daily weight gain (ADWG, kg day<sup>-1</sup>) and the feed conversion rate (FC, kg kg<sup>-1</sup>). Were analyzed as calcium (Ca), phosphorus (P), alkaline phosphatase (AF) and 25(OH)D<sub>3</sub> in the blood. At the end of the experimental period, 24 animals were slaughtered. How the carcasses were eviscerated and collected and weighed was measured from the heart, liver, kidneys, intestines and spleen for the relative weight of the organs and pH of the gastrointestinal organs. The bones were collected for bone morphometric analysis. Comparisons between treatment media were performed using Tukey's test at the level of 5% or 10% probability. The β error of the parameters was used to help explain the values of 5 to 10% probability. The apparent digestibility of nutrients was not influenced (P > 0,05) by the controls, as well as the excretion of Ca<sup>2+</sup> and P. The zootechnical performance of the

piglets shows differences between the tests for ADWG variables ( $P=0,031$ ) and for ADC ( $P=0,060$ ) in the pre-initial phase I, FBW ( $P=0,095$ ) and ADC ( $P=0,032$ ) in the pre-initial phase I + II, ADC in the initial phase, ADC and feed conversion rate (FC) in the total period of the experiment. For plasma samples, or calcium in the pre-initial phase II ( $P=0,058$ ), the highest concentration was in the 50/50 treatment. Alkaline phosphatase has a difference between treatments in the initial phase ( $P<0,001$ ), with treatment 25/75 promoting the lowest plasma value (48163 U/L). A combination of the two forms of vitamin D resulted in a significant 9% increase in plasma calcium concentration in the pre-initial II. Effects were found for the relative weight of the spleen ( $P=0,032$ ) with weight reduction in treatment 0/100 and effect ( $P=0,048$ ) for the concentration of phosphorus in the organ. The heart showed an effect for dry matter ( $P=0,061$ ), with greater concentration in the treatment 100/0. The pH demonstrated an effect ( $P=0,076$ ), with a reduction in pH in the 50/50 treatment, in comparison with the higher pH values in jejunum ( $P=0,000$ ) and ileum ( $P=0,002$ ). The bone morphometry of the metatarsals presents differences in the epiphysis width ( $P=0,013$ ), diaphysis height ( $P=0,068$ ), diaphysis width ( $P=0,049$ ) and size of the growth plate ( $P=0,002$ ). There was an improvement in bone development with an increase of 0,7 mm in the growth plate and 6,6 mm in the width of the diaphysis of the bones of animals fed with an active form of vitamin D. Reduction of the relative weight of the spleen by 25,4% in the treatment with  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  compared to treatment with cholecalciferol. Treatment 50/50 has the highest intestinal pH values. Follow treatment 0/100 which shows a 4,7% reduction in the pH of the jejunum and 7% in the ileum. In this context, the use of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in supplementing analysis for readings is efficient in maintaining stomach and intestinal pH, as well as in bone development of animals. Furthermore, in view of the results found, it is suggested that there is an increase in piglet innate immunity due to the reduction in the size of the spleen, with little importance for this organ.

**KEY-WORDS:** bone development, performance, pig nutrition, vitamin D.

## LISTA DE TABELAS

Capítulo 3.....	Página
Tabela 1. Composição da ração e referência utilizada no ensaio de digestibilidade dos leitões.....	40
Tabela 2. Composição centesimal e química das rações experimentais para leitões (6 a 24 kg) .....	43
Tabela 3. Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e nutrientes digestíveis das rações para leitões suplementadas com colecalciferol ou 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> glicosídeo.....	46
Tabela 4. Desempenho zootécnico de leitões alimentados com rações contendo colecalciferol e/ou 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> glicosídeo .....	48
Tabela 5. Metabólitos sanguíneos de leitões alimentados com colecalciferol e/ou 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> glicosídeo.....	50
Capítulo 4.....	Página
Tabela 1. Composição centesimal e química das rações, contendo diferentes inclusões da vitamina D para leitões em diferentes fases de crescimento.....	63
Tabela 2. Peso relativo de órgãos digestórios e não digestórios de leitões alimentados com diferentes formas e inclusões da vitamina D.....	67
Tabela 3. Composição físico-química de órgãos de leitões alimentados com substituição parcial ou total do colecalciferol pela 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> glicosídeo.....	68
Tabela 4. Valores de pH do conteúdo gastrointestinal de leitões alimentados com substituição parcial ou total do colecalciferol pela 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> glicosídeo.....	70
Tabela 5. Morfometria óssea de metatarsos e metacarpos de leitões alimentados com substituição parcial ou total do colecalciferol pela 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> glicosídeo.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> – 1,25-Dihidroxicolecalciferol
- 25(OH)D<sub>3</sub> – 25-Hidroxicolecalciferol
- Ca – Cálcio
- CDA – Coeficiente de Digestibilidade Aparente
- CMO – Conteúdo Mineral Ósseo
- CRDM – Consumo de Ração Diário Médio
- DBP – Proteína transportadora da vitamina D (*D binding protein*)
- DMO – Densidade Mineral Óssea
- FA – Fosfatase Alcalina
- GPCDM – Ganho de Peso Corporal Diário Médio
- HCl – Ácido Clorídrico
- ID – Intestino Delgado
- KgF – Quilograma Força
- Mg – Magnésio
- MOD – Matéria Orgânica Digestível
- MSD – Matéria Seca Digestível
- N - Newton
- OC – Osteocondrose
- P – Fósforo
- PCI – Peso Corporal Inicial
- PCF – Peso Corporal Final
- RTL – Receptores Toll-Like
- RXR – Receptor Retinóide X
- TCA – Taxa de Conversão Alimentar
- UV – Ultra Violeta
- VDR – Receptor da Vitamina D (*Vitamin D receptor*)

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2	Revisão.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.1	Vitamina D.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2	1,25-Dihidroxicolecalciferol Glicosídeo.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.3	Cálcio e Fósforo.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.4	Vitamina D e o Sistema Imunológico.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.5	Desenvolvimento Ósseo.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.6	Problemas Locomotores dos Suínos.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.7	Referências.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3	USO DA 1,25-DIHDROXICOLECALCIFEROL GLICOSÍDEO NA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL OU TOTAL DO COLECALCIFEROL E SEUS EFEITOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE DE CÁLCIO E FÓSFORO, DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE LEITÕES.....	33
	RESUMO.....	33
3.1	Introdução.....	37
3.2	Material e métodos.....	38
3.3	Resultados e discussão.....	45
3.4	Conclusões.....	52
3.5	Referências.....	53
4	USO DA 1,25-DIHDROXICOLECALCIFEROL GLICOSÍDEO NA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL OU TOTAL DO COLECALCIFEROL E SEUS EFEITOS SOBRE O PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS, PH DO TRATO GASTROINTESTINAL E MORFOMETRIA ÓSSEA DE LEITÕES.....	56
	RESUMO.....	56
4.1	Introdução.....	60
4.2	Material e métodos.....	62
4.3	Resultados e discussão.....	66
4.4	Conclusões.....	74
4.5	Referências.....	75

## 1 INTRODUÇÃO

Os problemas locomotores são os responsáveis pela perda econômica nas granjas suínas, com prevalência de artrites, abscessos e fraturas, que levam o animal a redução no consumo alimentar e emagrecimento, podendo chegar ao óbito (ABCS, 2014). A artrite causada por osteocondrose (OC) pode chegar a 70% da incidência de problemas locomotores encontrados em abatedouros (ALTHAUS et al., 2005), 41,4% da prevalência de claudicação em animais em terminação e responsável por grande parte da dor causada pela claudicação (JENSEN et al., 2012; KRAMER et al., 2015).

A deficiência de vitamina D, cálcio e outros minerais está associada com a incidência de diversos distúrbios articulares nos suínos, como a osteocondrose. As causas para estes problemas locomotores ainda não estão bem esclarecidas, porém foi reconhecido que existe um fator genético para a OC. O rápido crescimento dos animais e a redução da espessura de gordura subcutânea tendem a agravar estes problemas (HILL, 1990; JORGENSEN & ANDERSEN, 2000).

A vitamina D é mais utilizada nas rações na forma de colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>), sua forma inativa, mas já existem no mercado as formas glicosídicas, que são formas sintéticas ou naturais da vitamina D ativa, como a 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) extraída da planta *Solanum glaucophyllum*, que é rica em água, ou seja, é um glicosídeo de forma hidrossolúvel que não necessita do transporte de lipídeos para chegar à corrente sanguínea (SCHLEGEL et al., 2017).

A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é considerada um hormônio calcitrópico, pois apresenta o objetivo principal de manter a concentração plasmática de cálcio (Ca). A produção renal de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é regulada por dois hormônios. O principal hormônio regulador é o paratormônio (PTH) que é secretado pela paratireoide como resultado a hipocalcemia; sua ação é a nível renal com a função de diminuir a excreção de Ca<sup>2+</sup>, inibir a reabsorção de fosfato e estimular a conversão da 25 (OH)D<sub>3</sub> para a sua forma ativa. A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aumenta o transporte ativo de Ca<sup>2+</sup> e fosfato no intestino e estimula a reabsorção de Ca<sup>2+</sup> nos rins (VERSTUYF et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a substituição parcial ou total do colecalciferol pela 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo na alimentação de leitões na fase de creche e os seus efeitos sobre a biodisponibilidade de cálcio e fósforo, bem como o desempenho dos animais, os parâmetros séricos e plasmáticos, a morfometria óssea, o peso relativo de órgãos e o pH estomacal e intestinal.

## 2 Revisão

### 2.1 Vitamina D

As vitaminas são substâncias orgânicas necessárias em pequenas quantidades no organismo animal, porém são indispensáveis para a manutenção da saúde corporal. As vitaminas são classificadas de acordo com a sua solubilidade e podem ser lipossolúveis, como as vitaminas A, D, E e K, ou hidrossolúveis, como as vitaminas do complexo B, ácido nicótico, ácido pantotênico, ácido fólico, ácido ascórbico, biotina e colina. As vitaminas lipossolúveis são hidrofóbicas e, por isso, podem ser armazenadas no organismo animal em grandes quantidades, uma vez que a sua excreção é bastante lenta. Ao contrário, as vitaminas hidrossolúveis não são normalmente armazenadas e podem ser facilmente eliminadas pela urina (MENDONÇA Jr et al., 2010).

A vitamina D ocorre na natureza sob duas formas: o ergocalciferol ou vitamina D<sub>2</sub>, que é proveniente do ergosterol de origem vegetal e o colecalciferol ou vitamina D<sub>3</sub>, que é formada a partir da conversão do colesterol nos tecidos animais (Figura 1). Tanto a vitamina D<sub>2</sub> quanto a D<sub>3</sub> são convertidas na epiderme, mais precisamente na camada de Malpighi (BARRAL et al., 2007).

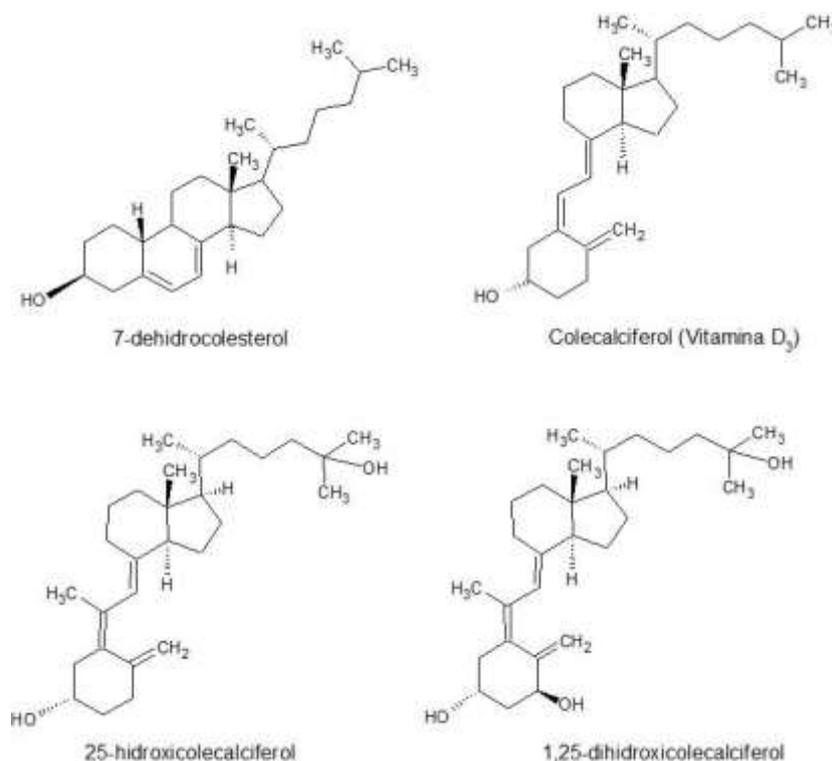


Figura 1. Estruturas químicas do precursor da vitamina D<sub>3</sub> (7-dehidrocolesterol) e das principais formas encontradas no organismo animal.

Fonte: Adaptado de Harvey e Ferrier, 2011.

A reação que ocorre na epiderme promove a fotólise da ligação entre os carbonos 9 e 10 do anel  $\beta$  do ciclo pentanoperidrofenantreno, cuja molécula apresenta um dos anéis rompido. Essa nova substância termoinstável, chamada de pré-vitamina, sofre uma reação de isomerização provocada pelo calor e se torna uma molécula mais estável, o chamado coлекаliferol. A vitamina  $D_3$  é secretada para o meio extracelular e para a corrente sanguínea através da energia estérica promovida pela sua conformação tridimensional (CASTRO, 2011).

A vitamina D em suas formas  $D_2$  e  $D_3$  são moléculas apolares e, por isso, devem ser solubilizadas por incorporação em soluções micelares de sal biliar para serem absorvidas na fase aquosa. A absorção ocorre principalmente no intestino delgado proximal e é influenciada pelas secreções gástricas, pancreáticas e biliares, formação de micelas, absorção na membrana da borda em escova e transporte para fora da célula intestinal (TSIARAS & WEINSTOCK, 2011).

O primeiro passo da ativação metabólica da vitamina D é a hidroxilação que ocorre no fígado (Figura 2) sobre o carbono C-25 do coлекаliferol para formar a 25-hidroxicolecalciferol ( $25(OH)D_3$ ), que é a principal forma circulante da vitamina. Essa hidroxilação é mediada pela enzima 25-hidroxilase, uma enzima microsomal da superfamília do citocromo P450, denominada CYP2R1. Existem dois mecanismos para que este processo ocorra, um é através da enzima associada ao retículo endoplasmático e possui baixa afinidade e alta capacidade e o outro é pela enzima localizada na mitocôndria, que possui alta afinidade e baixa capacidade (BLOMBERG et al., 2010).

A segunda hidroxilação ocorre principalmente nos rins através de um processo altamente regulado, por meio da enzima mitocondrial 1-alfa-hidroxilase ou CYP27B1, que converte a forma  $25(OH)D_3$  com a adição de uma hidroxila no carbono 1, formando a  $1,25(OH)_2D_3$ , a forma hormonal da vitamina D (CASTRO, 2011).

A hidroxilação extrarrenal da vitamina D já foi reconhecida, demonstrando que a vitamina age de forma autócrina e parácrina, inibindo a proliferação celular, promovendo a diferenciação celular e a regulação imunológica. A regulação da hidroxilase extrarrenal é determinada por fatores locais, como a produção de citocinas e fatores de crescimento e pelos níveis de  $25(OH)D_3$ , tornando essa via mais sensível às deficiências de vitamina D (LEVENTIS & PATEL, 2008).

A principal forma de transporte da vitamina D é ligada à glicoproteína do soro, chamada DBP (*D binding protein*). Esta proteína é sintetizada no fígado e apresenta meia vida biológica de 2,5 dias. A quantidade de DBP no organismo é excessivamente

maior do que a quantidade de 25(OH)D<sub>3</sub>, este fator se deve a uma proteção contra a intoxicação causada pela vitamina D livre (SPEECKAERT et al., 2006).

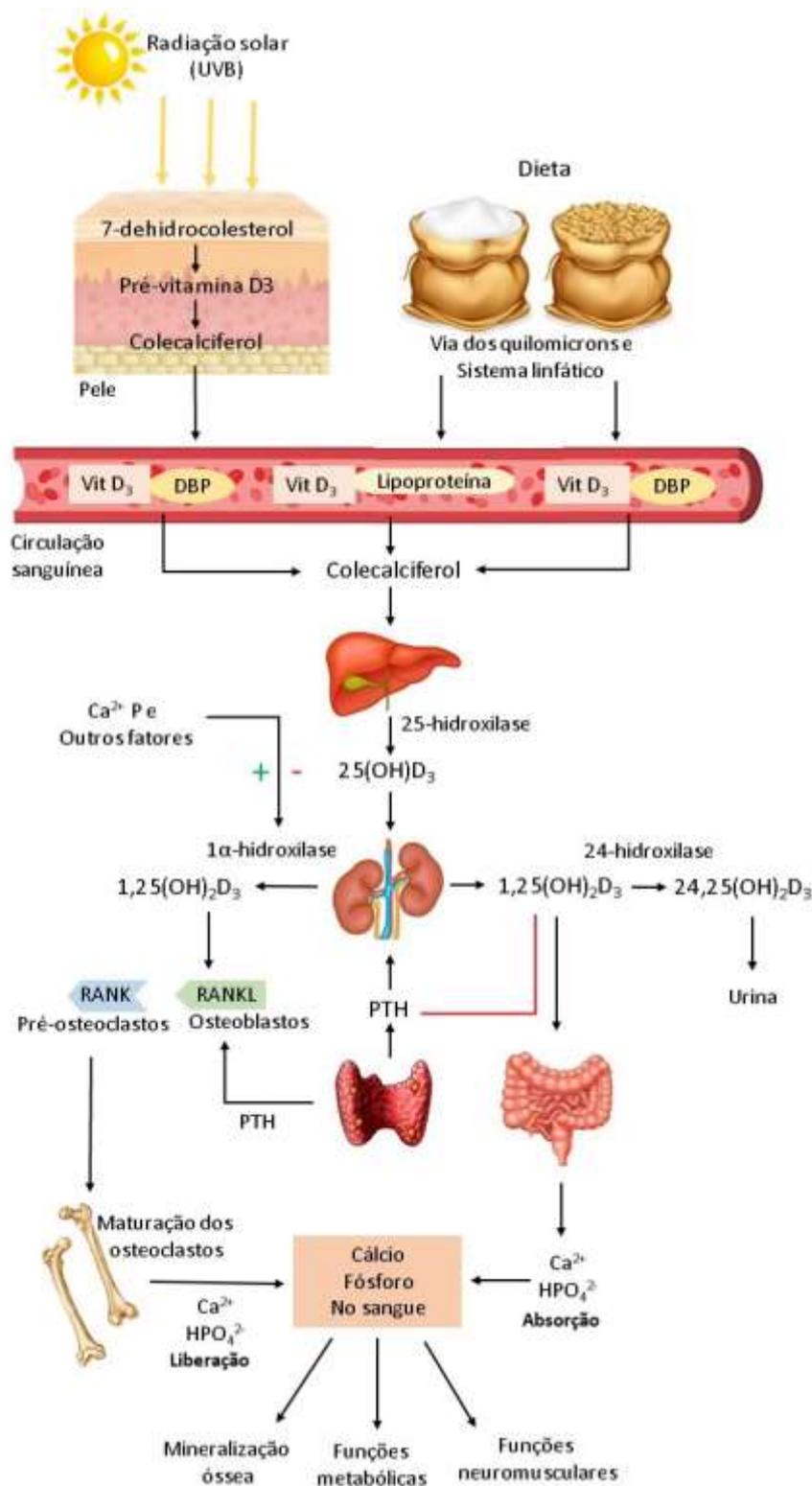


Figura 2. Metabolismo da vitamina D.

Fonte: Adaptado de Holick, 2006.

A forma ativa da vitamina D é considerada um hormônio esteroide, pois suas funções se assemelham a estes hormônios quando estão ligados aos receptores de vitamina D (VDR). Sua estrutura molecular é semelhante a de hormônios como, por exemplo, estradiol, cortisol e aldosterona, pois possuem um anel ciclopentanoperidrofenantreno (NORMAN, 2008).

O VDR atua por meio de uma heterodimerização com uma das três isoformas do receptor retinoide X (RXR). A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se liga ao VDR causando uma mudança na sua conformação e forma um complexo hormônio-receptor. Esse complexo é heterodimerizado com o RXR, o heterodímero  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR se liga a uma sequência específica do DNA nos seus genes-alvos, chamada de VDRE (*vitamin D response element*). Esta ligação leva à transcrição de genes de diversas proteínas, como a osteocalcina, fosfatase alcalina e a proteína transportadora de cálcio, a calbindina (ROCHEL et al., 2000; BARRAL et al., 2007).

O sistema metabólico da vitamina D é conhecido principalmente por ser essencial para a homeostase mineral e para o metabolismo ósseo. O calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) aumenta a absorção intestinal e a reabsorção renal de Ca e P. Estes efeitos são mediados pelo VDR e regulam a expressão de vários genes pela ligação com o elemento responsivo da vitamina D (VDRE) (BERGWITZ e JÜPPNER, 2010; HAUSSLER et al., 2011).

O sistema endócrino da vitamina D é considerado um eixo metabólico, sendo que esse sistema é formado pelos metabólitos da vitamina D, a sua proteína de transporte DBP, o seu receptor VDR e as enzimas que participam das reações de ativação e inativação (CASTRO, 2011).

Em um estudo realizado por Alexander et al. (2017) foram avaliados suínos confinados e animais expostos aos raios solares. Os autores não encontraram diferenças no ganho de peso dos animais, porém a concentração de vitamina D na forma  $25(\text{OH})\text{D}_3$  foi superior nos animais expostos ao sol com o pico de concentração em 24h seguidas de redução, entretanto estes níveis permaneceram elevados durante três semanas após a exposição ao sol, demonstrando o armazenamento. Nas 12 semanas seguintes, a concentração de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  reduziu na mesma medida que seria sustentada apenas pela dieta. Apesar da quantidade de calcidiol estar aumentada, a expressão da enzima 1-hidroxilase não foi alterada, demonstrando um controle rigoroso na conversão da forma ativa. Portanto, mesmo havendo uma maior concentração da  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , não quer dizer

que toda ela será convertida para sua forma hormonal, mas poderá haver um armazenamento da vitamina no tecido adiposo, o principal local de reserva.

Sugiyama et al. (2013) avaliaram a incidência de osteocondrose em suínos alimentados com 25(OH)D<sub>3</sub> no período dos 6 aos 110kg de peso vivo e encontraram menor incidência de lesões relacionadas à osteocondrose nos animais que receberam a vitamina D, sugerindo que houve o aumento da secreção de citocinas nos condrócitos, inibindo o desenvolvimento da osteocondrose e regenerando o tecido da cartilagem danificado.

O catabolismo das formas 25(OH)D<sub>3</sub> e 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é mediado por duas enzimas do citocromo P450. A CYP24, conhecida como 25(OH)D-24-hidroxilase, quebra a 25(OH)D<sub>3</sub> e forma a molécula inativa 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> em 1,24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> principalmente nos rins, enquanto que a CYP3A1 media o catabolismo no fígado e no intestino delgado (ZHOU et al., 2006).

O calcitriol e o PTH estimulam a reabsorção óssea pelos osteoclastos e, com isso, há um aumento da concentração sérica de Ca<sup>2+</sup>. Isso significa que as concentrações baixas de cálcio no sangue induzem ao aumento da 1-alfa-hidroxilase. A liberação da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> também leva ao aumento da absorção intestinal de Ca, P e Mg (BARRAL et al., 2007; SCHLEGEL et al., 2017). A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> estimula a secreção de FGF23 (fator de crescimento de fibroblastos) pelos osteócitos, enquanto o FGF23 inibe a reabsorção renal de fosfato e diminui a produção renal 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, formando um sistema de *feedback* negativo (VERSTUYF et al., 2010).

## 2.2 1,25-Dihidroxicolecalciferol Glicosídeo

Algumas plantas possuem, em sua composição, análogos da vitamina D<sub>3</sub>, como a planta *Solanum glaucophyllun*, que apresenta glicosídeos destes metabólitos, principalmente na forma de 1,25-dihidroxicolecalciferol. Estas plantas foram conhecidas primeiramente em ruminantes por causarem intoxicações em animais que as consomem junto ao pasto, estes animais possuem em seu rúmen bactérias com atividade β-glicosidase. Posteriormente, o mesmo efeito foi encontrado em animais monogástricos, que também apresentam estas bactérias, porém apenas no intestino grosso, principalmente no colón. Os principais sintomas causados pelo excesso do consumo destas plantas são: rigidez, dor ao caminhar e calcificação de artérias, coração, pulmões, timo e rins (ZANUZZI et al., 2012; ZIMMERMAN et al., 2015).

As plantas da família *Solanaceae* possuem efeito calcinogênico, pois apresentam um glicosídeo análogo biologicamente ativo da vitamina D<sub>3</sub>. Este glicosídeo é hidrolisado no intestino e libera a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, podendo causar aumento na absorção intestinal de cálcio e fósforo e, por consequência, hipercalcemia e hiperfosfatemia, além da mineralização dos tecidos moles (MELLO, 2003; ODRIOZOLA et al., 2018).

Entende-se que a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de origem herbal apresenta propriedades farmacocinéticas diferentes da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sintética, exatamente pela sua característica de glicosídeo. A forma sintética, por estar prontamente disponível, apresenta uma rápida absorção intestinal, enquanto que a vitamina encontrada nas plantas precisa sofrer a quebra do glicosídeo, sendo liberada de forma mais lenta (ZIMMERMAN et al., 2003).

A hidrólise do glicosídeo ocorre através de enzimas intestinais e só é absorvida após este processo, o que pode ser mais interessante quando utilizada de forma terapêutica, pois o seu tempo de ação é maior devido ao atraso na absorção intestinal e consequente aumento da janela terapêutica, garantindo, assim, maior tolerância farmacológica (BACHMANN et al., 2013; MATHIS et al., 2014).

Quando utilizada apenas a forma ativa da vitamina D na alimentação de animais de produção, há uma tendência de redução de desempenho, como demonstrado por Alves et al. (2018), que avaliaram a substituição parcial e total do colecalciferol pela 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo em frangos de corte e encontraram resultados semelhantes no que tange ao desempenho e ao desenvolvimento ósseo, ou seja, melhores resultados foram encontrados quando utilizado a substituição parcial com a combinação das duas formas de vitamina D, comparado aos resultados dos tratamentos em que se utilizou apenas uma das formas como fonte única.

A vitamina D de origem herbal pode ser utilizada com mais segurança comparado à fonte sintética devido a sua liberação retardada, resultando em menor concentração de pico plasmático e meia-vida biológica mais longa, com isso, apresenta menores efeitos adversos (MATHIS et al., 2016).

### 2.3 Cálcio e Fósforo

Os ingredientes mais comuns utilizados nas rações dos suínos, como o milho e o farelo de soja, são pobres em cálcio e apresentam o fósforo com baixa biodisponibilidade, não sendo suficientes para atender às exigências nutricionais dos animais. Por isso, a inclusão de fosfato monocálcico ou bicálcico na alimentação é

importante, pois compõe a principal fonte de fósforo inorgânico na dieta. Os minerais são exigidos em pequenas quantidades no organismo, mas são elementos inorgânicos essenciais para o crescimento e a reprodução. O Cálcio é o mineral mais abundante no organismo, seguido pelo fósforo, sendo que cerca de 96 a 99% do total de Ca no organismo e 60 a 80% do P está armazenado nos ossos (SARAIVA et al., 2009; GONZALES-VEGA & STEIN, 2014).

Cerca de 30 e 70% do Ca consumido na dieta é absorvido e cerca de 65 a 95% deste total é retido pelo suíno. O Ca retido é utilizado principalmente para o desenvolvimento e a manutenção do tecido ósseo, mas também é utilizado para a coagulação sanguínea, ativação de enzimas, contração muscular, excitação de neurônios, entre outras funções. O P está envolvido no metabolismo energético, sinalização celular, síntese de ácidos nucleicos e na estabilização das membranas celulares. A maior parte do Ca e P está armazenado nos ossos na forma de cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (TAYLOR & BUSHINSKY, 2009; STEIN et al., 2011).

O desmame é um período crítico na suinocultura, pois o leitão desmamado precocemente apresenta o sistema digestório imaturo e com uma capacidade limitada de digestão e absorção de nutrientes. A mudança que ocorre no lúmen intestinal após o desmame altera a estrutura e a função do intestino delgado, influenciando, principalmente, no tamanho dos vilos e na produção de enzimas digestivas (XU et al., 2000). Em leitões recém-nascidos, o principal acidificante estomacal é o ácido láctico produzido pela fermentação da lactose. A produção de ácido clorídrico (HCl) cresce gradualmente a partir da quarta até a oitava semana de vida, entretanto a sua eficiência não está no seu potencial máximo, ocasionando um pH superior ao desejado (DENCK et al., 2017).

Animais jovens apresentam uma alta taxa de crescimento e, por isso, necessitam de um suprimento de cálcio adequado para promover o desenvolvimento ósseo e suportar o metabolismo corporal. Porém, a absorção de cálcio nesta fase é reduzida devido a secreção insuficiente do ácido gástrico (HCl) necessário para a dissociação dos compostos cálcicos utilizados nas dietas, como o fosfato de cálcio (JIANG et al., 2013).

Os segmentos do trato gastrointestinal como estômago, ceco e cólon apresentam menor relevância na absorção do cálcio, pois mais de 90% da absorção de cálcio diário ocorre no intestino delgado, principalmente nas partes proximais duodeno e jejuno (SCHRÖDER & BREVES, 2006).

A absorção intestinal de Ca é estreitamente regulada pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e pode ocorrer por transporte ativo pela via transcelular ou transporte passivo pela via paracelular. A via paracelular depende da concentração de Ca que se move através de junções no epitélio intestinal, sendo que este processo é passivo e não saturável, favorecido por altas concentrações na ingestão de Ca. A absorção do Ca é afetada pela biodisponibilidade do Ca dietético e pela exigência fisiológica deste mineral, ou seja, uma dieta com baixa concentração de Ca promoverá o aumento na absorção intestinal por meio do aumento da conversão da vitamina D na sua forma ativa (BRONNER, 2003; WASSERMAN, 2004; PEREZ et al., 2008).

Este processo foi comprovado em trabalhos em que leitões alimentados com dietas contendo baixas concentrações de cálcio e fósforo apresentaram a capacidade de regular a expressão gênica de transportadores de cálcio na membrana basolateral do intestino, como a calbindina, aumentando a sua expressão com a intenção de maximizar a absorção de cálcio disponível. O inverso também é encontrado, pois quando os animais são alimentados com grandes concentrações de cálcio há uma redução nos transportadores deste mineral e isso se dá pelo aumento do transporte via paracelular (LI et al., 2014; GONZÁLES-VEGA et al., 2016).

O transporte paracelular é mediado pelos canais de cálcio, os chamados TRPV (*transient receptor potential cation channels*), que além de estarem presentes no intestino, também são encontrados no rim, pâncreas, próstata, glândulas salivares, glândulas mamárias e glândulas sudoríparas. Dentro da célula, o movimento do Ca para a membrana basolateral é dependente da sua ligação com a proteína transportadora, a calbindina (CHRISTAKOS et al., 2007).

A utilização do Ca na dieta durante o período neonatal pode afetar a população de células tronco mesenquimais da medula óssea e alterar o potencial osteogênico com consequências imediatas e a longo prazo para a saúde óssea dos animais. Leitões que receberam uma dieta com deficiência em Ca demonstraram-se menos capazes de realizar a diferenciação osteogênica e mais propensos a realizarem adipogênese do que leitões alimentados com níveis adequados de cálcio (VIGORS et al., 2014).

O P também é absorvido através das vias transcelular e paracelular e assim como o Ca, a via paracelular é dependente da concentração luminal de P, não sendo saturável. A via transcelular tem a sua absorção através de cotransportadores de sódio-fosfato tipo II, que são regulados pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . No plasma, o P pode estar ligado a lipídeos, ésteres ou em sua forma inorgânica (VIRKKI et al., 2007).

O P é responsável por aumentar a conversão da 25(OH)D<sub>3</sub> na sua forma ativa quando a sua concentração plasmática estiver deficiente, isto foi confirmado por Schlegel & Gutzwiller (2015), que encontraram uma maior concentração de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> no plasma de leitões que receberam uma dieta deficiente em fósforo, demonstrando que a conversão da 25(OH)D<sub>3</sub> foi maior nestes animais.

#### 2.4 Vitamina D e o Sistema Imunológico

A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> apresenta a capacidade de regular tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, potencializando a resposta inata (monócitos/macrófagos) e suprimindo a imunidade adaptativa (funções dos linfócitos B e T). A resposta inata promove a primeira linha de defesa contra patógenos e aumenta a resistência contra infecções agudas. A produção intrácina de vitamina D pelas células do sistema imune, na presença da enzima 1-alfa-hidroxilase, estimula a síntese de peptídeos antimicrobianos como, por exemplo, as catelicidinas, que contribuem para a defesa inicial contra patógenos e para a destruição bacteriana (CANTORNA, 2010; WHITE, 2010).

As células imunitárias como macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células apresentadoras de antígenos, produzem a enzima 1-alfa-hidroxilase. Esta enzima é estimulada pela ativação de receptores toll-like (RTL), que são ativados quando reconhecem padrões moleculares típicos de microrganismos patogênicos como, por exemplo, peptideoglicanos, lipopolissacarídeos e lipopeptídeos. A ativação da resposta imunitária mediada pela vitamina D se dá pela conversão da 25(OH)D<sub>3</sub> em 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> no citosol dos macrófagos, assim, se o nível de calcidiol for baixo, a resposta pode ser comprometida (NELSON et al., 2010).

A vitamina D apresenta a capacidade de induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos e o complexo formado por 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-VDR-RXR ativa a transcrição de peptídeos antimicrobianos. Além disso, o calcitriol promove uma diminuição da citocina pró-inflamatório IL-6 produzida por células mononucleares periféricas (HEWISON, 2012; PRIETI et al., 2013).

A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> demonstra os seus efeitos sobre a resposta imunológica específica adquirida pela inibição da proliferação dos linfócitos T, particularmente as células T helper 1 (Th1). Quando mensurado o perfil de citocinas em células humanas tratadas com 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, encontrou-se maior quantidade de células Th2, confirmando

que a vitamina D altera o perfil celular de Th1 para Th2. Desta forma, a principal ação da vitamina D sobre o sistema imune é o controle da imunidade adquirida pela supressão das células T, em particular das células Th1. Os agonistas do VDR também inibem a diferenciação de células dendríticas, células T inflamatórias e pró-patogênicas, como a Th17, favorecendo a conversão de Th2 e, assim, desenvolvendo um perfil de maior tolerância imunológica (HEWISON, 2012).

A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sintetizada pelas células do sistema imune é igual a convertida nos rins, porém a regulação da expressão e atividade são diferentes, enquanto que a enzima renal é regulada principalmente pela calcemia e sinais ósseos, a enzima das células imunitárias é regulada por sinais imunes como, por exemplo, o  $\text{INF-}\gamma$  (Interferon-gama).

## 2.5 Desenvolvimento Ósseo

Durante a ossificação endocondral, a cartilagem é progressivamente erodida e substituída por osso trabecular e medula óssea a partir de centros primários de ossificação. Isto ocorre pela ocupação dos condrócitos, células da cartilagem, pelos osteoblastos e células do tecido ósseo que depositam matriz óssea. Na metáfise, a cartilagem é continuamente substituída por osso trabecular, em um processo que depende de angiogênese e influencia o crescimento longitudinal dos ossos. A epífise apresenta vasos sanguíneos e forma uma rede vascular que age como um centro secundário de ossificação e a cartilagem entre esse centro forma uma placa de crescimento, impulsionando o crescimento longitudinal do osso (DIRCKX et al., 2013).

A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  atua diretamente nos condrócitos da placa de crescimento que expressam a CYP27B1 e neste local a vitamina D ativa as funções autócrinas, como a diferenciação celular, a angiogênese e a osteoclastogênese (NAJA et al., 2009).

O crescimento longitudinal dos ossos longos ocorre através do disco ou placa epifisária, também chamada de placa de crescimento (Figura 3). As células que formam essa placa tomam formas distintas em camadas e representam estágios diferentes da formação do osso. A primeira camada é a zona de repouso, onde há cartilagem, mas não há alteração. Os condrócitos mais distantes da diáfise formam a zona de proliferação, na qual os condrócitos se dividem e formam colunas paralelas no sentido longitudinal ao osso. A zona hipertrófica apresenta muitos condrócitos, a matriz fica reduzida e os condrócitos entram em apoptose. A zona de cartilagem calcificada é o local onde ocorre

a mineralização e termina a apoptose dos condrócitos. A zona de ossificação é onde surge o tecido ósseo e onde as células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, depositando a matriz óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Os cristais de hidroxiapatita são formados pelos osteoblastos, que combinam o colágeno com o cálcio e o fósforo, formando os cristais. A formação destes cristais é necessária para a formação do osso em tamanho e largura. A formação da hidroxiapatita e a regulação e deposição dos minerais no osso é regulada pelas proteínas ligadoras de Ca e P, como a fosfatase alcalina e a osteocalcina (VAN RIET et al., 2013).

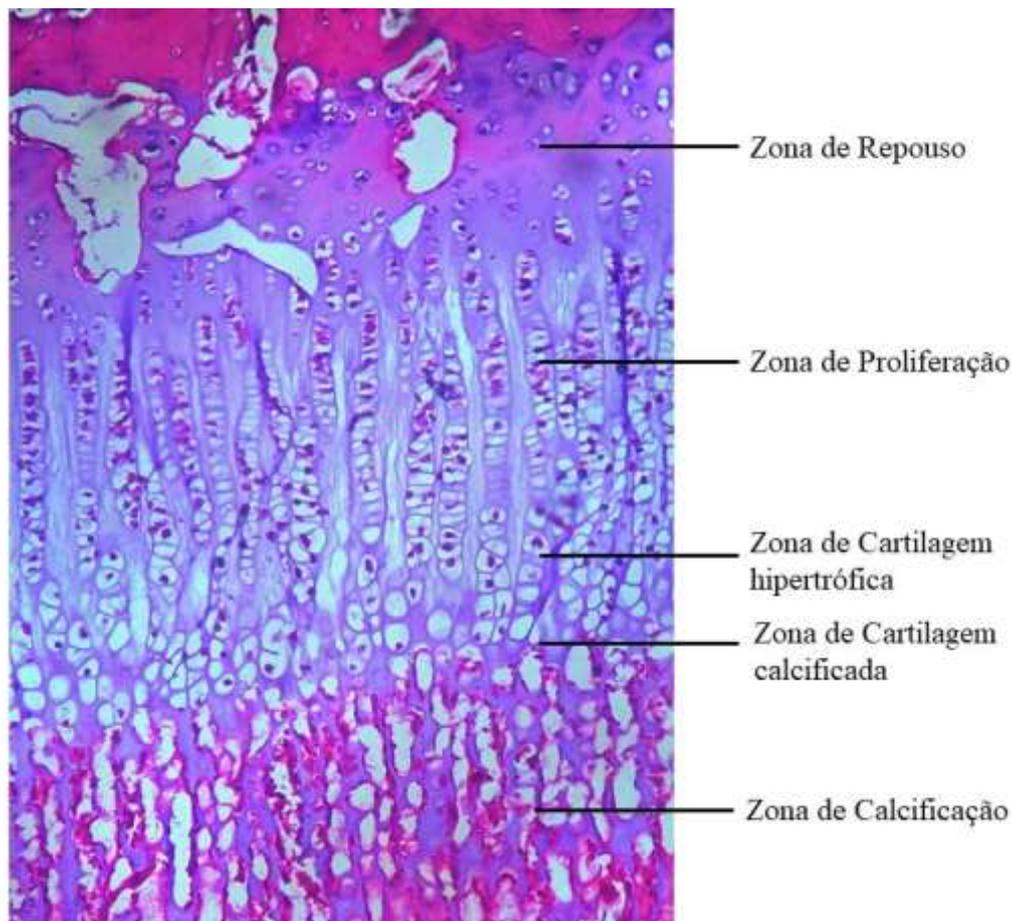


Figura 3. Fotomicrografia do disco epifisário, que mostra as cinco zonas e a formação do tecido ósseo (coloração eosina-hematoxilina, aumento 10x).

Fonte: Arquivo Pessoal.

Durante a reabsorção óssea, a ligação do PTH aos osteoclastos desencadeia a síntese do ligante de osteoprotegerina (RANKL), uma proteína de membrana das células osteoblásticas. Este ligante se liga ao seu receptor, chamado de receptor ativador do fator nuclear kB (RANK), que é expresso nos precursores hematopoiéticos dos osteoclastos e estimula a diferenciação em osteoclastos funcionais. Estas duas proteínas

de superfície celular, RANKL e RANK, são reguladores essenciais para a formação e função dos osteoclastos (FUMOTO et al., 2014).

Durante a primeira fase da remodelação, os pré-osteoclastos são formados e ativados. Na segunda fase ocorre a remoção do osso por estas células reguladas pela vitamina D e pela calcitonina. Esta remoção inclui a secreção de ácidos e enzimas proteolíticas sobre a membrana do osso para que ocorra a digestão da matriz orgânica. A fase de transição resulta na síntese de matriz orgânica e regulação da mineralização pelos osteoblastos. Na última fase ocorre a apoptose dos osteoblastos, formando os osteócitos, que são as células maduras do tecido ósseo (CLARKE, 2008; RALSTON, 2009).

## 2.6 Problemas Locomotores dos Suínos

A domesticação e o confinamento dos animais, junto ao melhoramento genético com a finalidade de aumento da massa muscular, reduziram a função do sistema locomotor na sobrevivência dos suínos. A seleção genética para as características de produção pode ter resultado em uma seleção não intencional, como a predisposição à ocorrência de osteocondrose em suínos (ETTERLIN et al., 2017).

A osteocondrose (OC) é um distúrbio que ocorre devido a uma lesão na placa de crescimento por uma falha na ossificação endocondral, onde a região afetada não é calcificada, podendo ocorrer uma necrose visível histologicamente. A lesão primária da OC articular é causada por uma necrose isquêmica focal da cartilagem de crescimento iniciada pela necrose dos vasos sanguíneos do canal da cartilagem. Como a cartilagem necrótica não sofre mineralização ou penetração vascular, uma falha da ossificação endocondral ocorre próximo da lesão (YTREHUS et al., 2007).

A OC é considerada uma doença multifatorial, pois não existe apenas um fator responsável por todos os aspectos da doença, de modo que os fatores que desempenham um papel importante na doença incluem o rápido crescimento, hereditariedade, características anatômicas, trauma, dieta e um defeito no suprimento vascular da cartilagem epifisária. As lesões da OC são mais comumente encontradas no úmero e no fêmur, mas também podem ocorrer nas articulações do ombro, quadril, ísquio, articulações vertebrais e nas junções costocodrais das costelas. Estas lesões podem ser observadas em análises histológicas de leitões com dois meses de idade, porém estes

animais só irão demonstrar a chamada “fraqueza das pernas” quando atingirem mais peso (YTREHUS et al., 2007).

Os períodos de rápido crescimento são indicações prováveis de crescimento esquelético desequilibrado. Por isso, o período do desmame até os 84 dias de idade é chamado de janela da susceptibilidade, quando a cartilagem em maturação é mais vulnerável ao surgimento de lesões osteocondróticas. Os suínos que apresentaram um rápido crescimento entre 28 e 35 dias de idade obtiveram também osteocondrose grave na idade de abate e entre 56 e 84 dias apresentaram osteocondrose leve, no entanto, após 90 dias de idade o ganho de peso não teve relação com o surgimento da OC (VAN GREVENHOF et al., 2012).

A janela da susceptibilidade nos suínos ocorre aproximadamente entre 8 e 13 semanas de idade, pois é neste período que estão presentes os vasos temporais e vasos recém-formados na cartilagem e é neste local que a interrupção do suprimento sanguíneo resulta em osteocondrose, portanto medidas profiláticas podem ser tomadas neste período de tempo (YTREHUS et al., 2007).

Segundo Toth et al. (2016), os animais nesta fase apresentam a capacidade de regenerar sua estrutura óssea, ou seja, animais de 12 semanas de idade apresentam maior incidência de lesões por OC do que animais de 42 semanas, sendo criados nas mesmas condições de ambiente e manejo nutricional, demonstrando que no período da “janela da susceptibilidade” também pode ocorrer a regeneração do tecido ósseo através da remodelação e crescimento do osso, quando o animal recebe os nutrientes necessários.

Os problemas locomotores são responsáveis por grande parte dos descartes de matrizes suínas, sendo o aprumo defeituoso a principal causa, com 7,27% dos descartes das fêmeas e cerca de 20 a 50% dos descartes de suínos machos para a reprodução devido à fraqueza das pernas (BORDIN et al., 2012; REGASSA et al., 2015).

Além de representar uma preocupação constante com o bem-estar dos animais, os problemas locomotores também significam um aumento nos custos com medicação, assim como as perdas reprodutivas destes animais (CAPELETTO et al., 2016).

Os distúrbios nos processos de remodelação óssea, metabolismo de cartilagem articular e formação dos cascos podem levar a uma condição de claudicação, bem como a composição nutricional, consumo alimentar e disponibilidade dos nutrientes ingeridos podem predispor o animal a problemas locomotores (VAN RIET et al., 2013).

A claudicação nos animais em fase de crescimento é proveniente de diversos fatores e pode ser consequência de doenças de ordem infecciosa ou não infecciosa. As doenças infecciosas mais comumente encontradas são causadas por *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Haemophilus parasuis*. A claudicação por problemas de ordem não infecciosa decorre de doenças metabólicas, degenerativas ou traumas, como o raquitismo, osteomalácia, osteocondrose e fraturas (JENSEN et al., 2012; KRAMER et al., 2015).

Algumas pesquisas têm demonstrado que o aumento significativo no ganho de peso dos animais está relacionado com uma maior ocorrência de OC, pois resulta em uma sobrecarga nos membros e no desenvolvimento de lesões nas articulações (VAN GREVENHOF et al., 2012). Busch e Wachmann (2011) encontraram um aumento de 20% no risco de desenvolvimento de osteocondrose para cada 100 gramas de ganho de peso médio diário do período de desmame até a terminação.

Assmundstad et al. (2013) analisaram a hereditariedade e a correlação genética da OC e o ganho de peso, concluindo que existe uma alta correlação entre a doença e o rápido ganho de peso em suínos, ou seja, os animais que ganharam peso mais rapidamente demonstraram maior incidência de OC.

Etterlin et al. (2017) compararam o suíno doméstico com o javali e observaram uma ocorrência muito maior de OC nos animais domesticados quando comparados aos animais selvagens, estes, por sua vez, não apresentam um ganho de peso tão rápido e carregam a genética ancestral dos animais que precisavam caçar para sobreviver, com características bem adaptadas a atividade física.

A capacidade de cicatrização das lesões subclínicas de OC consiste em avaliações realizadas por tomografia computadorizada em intervalos de duas semanas em que 51 e 69% das lesões subclínicas nas articulações do joelho e cotovelo foram curadas aos 180 dias de idade (OLSTAD et al., 2014).

Sendo assim, a importância do desenvolvimento ósseo adequado no início da vida do suíno é essencial para que os animais adultos não sejam acometidos pelos distúrbios locomotores mais presentes na suínocultura. Diante do exposto, a suplementação de vitamina D se torna essencial nesta fase para que a formação óssea ocorra de forma satisfatória.

## 2.7 Referências

- ABCS, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS; **Produção de suínos: teoria e prática**. Coordenação Técnica Integrall Soluções em Produção Animal, Brasília, DF, 908p., 2014.
- ALEXANDER, B.M.; INGOLD, B.C.; YOUNG, J.L.; FENSTERSEIFER, P.J.; WECHSLER, P.J.; AUSTIN, K.J.; LARSON-MEYER, D.E. Sunlight exposure increases vitamin D sufficiency in growing pigs fed a diet formulated to exceed requirements. **Domestic Animal Endocrinology**, n.59, p.37-42, 2017.
- ALTHAUS, L.K.S.; ALBERTON, G.C.; GUIMARÃES, A.M.S.; FIAMETTI, A. Exame macroscópico das articulações de suínos artríticos no abatedouro. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p.13-19, 2005.
- ASMUNDSTAD, T.; KONGSRO, J.; WETTEN, M.; DOLVIK, N.I.; VANGEN, O. Osteochondrosis in pigs diagnosed with computed tomography: heritabilities and genetic correlations to weight gain in specific age intervals. **Animal**, v. 7, n.10, p.1576-1582, 2013.
- ALVES, O.S.; CALIXTO, L.F.L.; ARAUJO, A.H.B.; TORRES-CORDIDO, K.A.A.; REIS, T.L.; CALDERANO, A.A. Decrease levels of vitamin D3 and supplementation with 125-dihydroxyvitamin D3-glicoside on performance, carcass yield and bone quality in broilers. *Ciência Rural*, v.48, n.8, e20170705, 2018.
- BACHMANN, H.; OFFORD-CAVIN, E.; PHOTIRATH, P.; HORCAJADA, M.N.; ROMEIS, P.; MATHIS, G.A. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-glycoside of herbal origin exhibits delayed release pharmacokinetics when compared to its synthetic counterpart. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.136, p.333-336, 2013.
- BARRAL, D.; BARROS, A.C.; ARAÚJO, R.P.C.; Vitamina D: uma abordagem molecular. **Pesquisa Brasileira de Odontopediatria Clínica Integrada**, n. 7, v.3, p. 309-315, 2007.
- BORDIN, R.A.; GOMES, A.Y.; BUENO, R. Caracterização técnica das principais sintomatologias relacionadas ao descarte de fêmeas suínas reprodutoras. **THESIS**, n. 17, p.44-51, 2012.
- BLOMBERG, M.J.; NIELSEN, J.E.; JORGENSEN, A.; RAJPERT, E.M.; KRISTENSEN, D.M.; JORGENSEN N.; SKAKKEBAEK, N.E.; JUUL, A.; LEFFERS, H. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. **Human Reproduction**, n.25, v.5, p.1303-1311, 2010.
- BRONNER, F. Mechanisms of intestinal calcium absorption. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.88, n.2, 387-393, 2003.
- BUSCH, M.E.; WACHMANN, H.; Osteochondrosis of the elbow joint in finishing pigs from three herds: Associations among different types of joint changes and between osteochondrosis and growth rate. **The Veterinary Journal**, v.188, n.2, p.197-203, 2011.
- CASTRO, L.C.G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, n. 55, v.8, p.566-575, 2011.
- CANTORNA, M.T.; Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. **Proceeding of Nutritional Society**, v.69, n. 3, p.286-289, 2010.
- CAPELETTO, A.; LIMA, M.O.; BENNEMANN, P.E.; Prevalence of locomotor problems and their effect on the longevity of swine matrices. **Scientific Electronic Archives**, v.9, n.5, p.85-94, 2016.

- CHRISTAKOS, S.; DHAWAN, P.; PENG, X.; OBUKHOV, A.G.; NOWYCKY, M.C.; BENN, B.S.; ZHONG, Y.; LIU, Y.; SHEN, Q. New insights into the function and regulation of vitamin D target proteins. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.103, n.3-5,p.405-410, 2007.
- CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical Journal of American Society and Nephrology**, v. 3, n. 3,p.131-139, 2008.
- DIRCKX, N.; VAN HUL, M.; MAES, C. Osteoclast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis and regeneration. **Birth Defects Research**, v.99, n. 3, p.170-191, 2013.
- DENCK, F.M.; HILGEMBERG, J.O.; LEHNEN, C.R. Uso de acidificantes em dietas para leitões em desmame e creche. **Archivos de Zootecnia**, v.66, n.256, p.629-238, 2017.
- DUKES, H.H.; REECE, W.O. **Fisiologia dos animais domésticos**. 12ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 926p.
- ETTERLIN, P.E.; EKMAN, S.; STRAND, R. OLISTAD, K.; LEY, C.J. Osteochondrosis, synovial fossae, and articular indentations in the talus and distal tibia os growing domestic pigs and wild boars. **Veterinary Pathology**, v. 54, p. 445-456, 2017.
- FUMOTO, T.; TAKESHITA, S.; ITO, M.; IKEDA, K. Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.29, n. 4, p.830-842, 2014.
- GONZÁLES-VEGA, J.C.; STEIN, H.H.; Calcium digestibility and metabolism in pigs. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v.27, n.1, p.1-9, 2014.
- GONZÁLES-VEGA, J.C.; LIU, Y.; MCCANN, J.C.; WALK, C.L.; LOOR, J.J.; STEIN, H.H. Requirement for digestible calcium by eleven –to twenty five – kilograms pigs as determined by growth performance, boné ash concentration, calcium and phosphorus balances, and expression of genes involved in transporto f calcium in intestinal and kidney cells, **Journal of Animal Science**, v. 94, n.8, p.3321-3334, 2016.
- HARVEY, R.A.; FERRIER, D. **Bioquímica Ilustrada**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 528p.
- HAUSSLER, M.R.; JURUTKA, P.W.; MIZWICKI, M.; NORMAN, A.W. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1alfa,25(OH)2vitamin D3: genomic and non-genomic mechanism. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.25, p.453-559, 2011.
- HEWISON, M. Vitamin D and the imune system: new perspectives on an old theme. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v.39, n.2, p.365-379, 2012.
- HILL, M.A. Causes of degenerative joint disease (osteoarthritis) and dyschondroplasia (osteochondrosis) in pigs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, n.197, p.107-113, 1990.
- JENSEN, T.B.; KRISTENSEN, H.H.; TOFT, N. Quantifying the impact of lameness on welfare and profitability of finisher pigs uring expert opinions. **Livestock Science**, v.149, n.3, p.209-214, 2012.
- JIANG, H.; WANG, J.; CHE, L.; LIN, Y.; FANG, Z.; Effects of calcium sources and levels on growth performance and calcium bioavailability in weaning piglets. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, n.4, p.613-621, 2013.
- JORGENSEN, B.; ANDERSEN, S. Genetic parameters for osteochondrosis in Danish landrace and Yorkshire boars and correlations with leg weakness and production traits. **Animal Science**, v.71, n.3, p.427-434, 2000.

- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica – texto e atlas**. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013. 538p.
- KRAMER, T.; DONIN, A.G.; ALBERTON, G.C. Problemas locomotores em animais em crescimento: causas e consequências. In: Simpósio Internacional de Produção Suína, 8., **Anais...** Foz do Iguaçu, PR, 2015.
- LEVANTIS, P.; PATEL, S. Clinical aspects of vitamin D in the management of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v.47, n.11, p.1617-1621, 2008.
- LI Y., STAHL, C.H.; Dietary calcium deficiency and excess both impact bone development and mesenchymal stem cell lineage priming in neonatal piglets. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n.12, p.1935-1942, 2014.
- MATHIS, G.A.; TOGGENBURGER, A.; POKORNY, R.; AUTZEN, S.; IBANEZ, R.; ROMEIS, P.; BACHMANN, H. Human pharmacokinetic profile of 1,25-dihydroxyvitamin D3-glycoside of herbal origin. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 144, p.40-43, 2014.
- MATHIS, G.; BOLAND, R.; BACHMANN, H.; TOGGENBURGER, A.; RAMBECK, W. Safety profile of 1,25-dihydroxyvitamin D3 of herbal origin in broiler chicken. *Schweiz Arch Tierheilkd*, v.158, n.12, p.819-826, 2016.
- MELLO, JR.B. Calcinosis – Calcinogenic plants. *Toxicon*, v.41, n.1, p.1-12, 2003.
- MENDONÇA JR, A.F.; BRAGA, A.P.; RODRIGUES, A.P.M.S.; SALES, L.E.M. Vitaminas: uma abordagem prática de uso na alimentação de ruminantes. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.6, n.4, p.1-16, 2010.
- NAJA, R.P.; DARDENNE, O.; ARABIAN, A.; ST ARNAUD, R. Chondrocyte-specific modulation of Cyp27b1 expression supports a role for local synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in growth plate development. **Endocrinology**, v.150, n.9, p.4024-4032, 2009.
- NELSON, C.D.; REINHARDT, T.A.; THACKER, T.C.; BEITZ, D.C.; LIPPOLIS, J.D. Modulation of the bovine innate immune response by production of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) in bovine monocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n.3, p.1041-1049, 2010.
- NORMAN, A.W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 88, p491-499, 2008.
- VAN GREVENHOF, E.M.; HEUVEN, H.C.M.; VAN WEEREN, P.R.; BIJMA, P. The relationship between growth and osteochondrosis in specific joints in pigs. **Livestock Science**, v. 143, n. 1, p.85-90, 2012.
- VAN RIET, M.M.J.; MILLET, S.; ALUWÉ, M.; JANSSENS, G.P.J. Impact of nutrition on lameness and claw health in sows. **Livestock Science**, v.156, n.1-3, p.24-35, 2013.
- VIGORS, S.; SWEENEY, T.; O'SHEA, C.J.; BROWNE, J.A.; O'DOHERTY, J.V. Improvements in growth performance, bone mineral status and nutrient digestibility in pig following the dietary inclusion of phytase are accompanied by modification in intestinal nutrient transporter gene expression. **British Journal of Nutrition**, v.112, n.5, p.688-697, 2014.
- VIRKKI, L.V.; BIBER, J.; MURER, H.; FORSTER, I.C. Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families. **American Journal of Physiology and Renal Physiology**, v.293, n.3, p.F643-F654, 2007.
- ODRIOZOLA, E.R.; RODRÍGUEZ, A.M.; MICHELOUD, J.F.; CANTÓN, G.J.; CAFFARENA, R.D.; GIMENO, E.J.; BODEGA, J.J.; GARDEY, P.; ISEAS, F.B.; GIANNITTI, F. Enzootic calcinosis in horses grazing *Solanum glaucophyllum* in

- Argentina. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.30, n.2, p. 286-289, 2018.
- OLSTAD, K.; KONGSRO, J.; GRINDFLEK, E.; DOLVIK, N.I. Consequences of the natural course of articular osteocondrosis in pigs for the sustainability of computed tomography as a screening tool. **BMC Veterinary Research**, v.10, n.212 p.2-11, 2014.
- PEREZ, A.V.; PICOTTO, G.; CARPENTIERI, A.R.; RIVOIRA, M.A.; PERALTA LOPEZ, M.E.; TOLOSA DE TALAMONI, N.G. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. **Digestion**, v.77, n.1, p.22-34, 2008.
- PRIETI, B.; TREIBER, G.; PIEBER, T.R.; AMREIM, K. Vitamin D and immune function. **Nutrients**, v.5, n. 7, p.2502-2521, 2013.
- RALSTON, S.H. Bone structure and metabolism. **Medicina**, v.37, n. 9, p.469-474, 2009.
- REGASSA, A.; ADHIKARI, R.; NYACHOTI, C.M.; KIM, W.K. Effects of 25-(OH)D<sub>3</sub> on fecal Ca and P excretion, bone mineralization, Ca and P transporter mRNA expression. And performance in growing female pigs. **Journal of Environmental Science and Health**, v.50, p.293-299, 2015.
- ROCHEL, N.; WURTZ, J.M.; MITSCHLER, A.; KLAHOLZ, B.; MORAS, D. The Crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. **Molecular Cell**, n.5, v.1, p.173-179, 2000.
- SARAIVA, A.; DONZELE, J.L.; OLIVEIRA, R.F.M. de; ABREU, M.L.T.; SILVA, F.C. de O.; SANTOS, F. de A. Available phosphorus levels in diets for swine from 15 to 30 kg genetically selected for meat deposition. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n.2, p. 307-313, 2009.
- SCHRÖDER, B.; BREVES, G. Mechanisms and regulation of calcium absorption from the gastrointestinal tract in pigs and ruminants: comparative aspects with special emphasis on hypocalcemia in dairy cows. **Animal Health Research Reviews**, v.7, n.1-2, p.31-41, 2006.
- SCHLEGEL, P.; GUTZWILLER, A. Effet du glycoside de 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> dans um alimente carencé ou non em phosphore, sur les performances de croissance et le statut mineral de porcelets. **Journées Recherche Procine**, v.47, p.123-124, 2015.
- SCHLEGEL, P.; GUGGISBERG, D.; GUTZWILLER, A. Tolerance to 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> glycosides from *Solanum glaucophyllum* by the growing pig. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p.119-124, 2017.
- SPEECKAERT, M.; HUANG, G.; DELANHE, J.R.; TAES, Y.E.C. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. **Clinica Chimica Acta**, v.372, p.33-42, 2006.
- STEIN, H.H.; ADEOLA, O.; CROMWELL, G.L.; KIM, S.W.; MAHAN, D.C.; MILLER, P.S. Concentration of dietary calcium supplied by calcium carbonate does not affect the apparent total tract digestibility of calcium, but decreases digestibility of phosphorus by growing pigs. *Journal of Animal Science*, v.89, n. 7, p.2139-2144, 2011.
- SUGIYAMA, T.; KUSUHARA, S.; CHUNG, T.K.; YONEKURA, H.; AZEM, E.; HAYAKAWA, T. Effects of 25-hydroxy-cholecalciferol on the development of osteochondrosis in swine. **Animal Science Journal**, v.84, n.4, p.341-349, 2013.
- TAYLOR, J.G.; BUSHINSKY, D.A. Calcium e phosphorus homeostasis. **Food Purification**, v. 27, n.4, p.387-394, 2009.

- TSIARAS, W.G.; WEINSTOCK, M.A. Factors influencing vitamin D status. **Acta Dermato- Venereologica**, v. 91, n. 2, p.115-124, 2011.
- TÓTH, F.; TORRISON, J.L.; HARPER, L.; BUSSIERES, D.; WILSON, M.E.; CRENSHAW, T.D.; CARLSON, C.S.; Osteochondrosis prevalence and severity at 12 and 24 weeks of age in commercial pigs with and without organic-complexed trace mineral supplementation. **Journal of Animal Science**, v. 94, n.9, p.3817-3825, 2016.
- VERSTUYF, A.; CARMELIET, G.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. **Kidney International**, v. 78, n. 2, p.140-145, 2010.
- WASSERMAN, R.H. Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. **Journal of Nutrition**, v.134, n.11, p.3137-3139, 2004.
- WHITE, J.H.; Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: past, present and future. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.121, n. 1-2,234–238, 2010.
- YTREHUS B, CARLSON CS, LUNDEHEIM N, ET AL. Vascularisation and osteochondrosis of the epiphyseal growth cartilage of the distal femur in pigs-development with age, growth rate, weight and joint shape. **Bone**, v. 34, n. 3, p.454–465, 2004.
- YTREHUS, B.; CARLSON, C.S.; EKMAN, S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. **Veterinary Pathology**, v.44, n. 4, p.429-448, 2007.
- ZANUZZI, C.N.; NISHIDA, F.; PORTIANSKY, E.L.; FONTANA, P.A.; GIMENO, E.J.; BARBEITO, C.G.; Effects of *Solanumglaucophyllum* toxicity on cell proliferation and apoptosis in the small and large intestine of rabbits. *Research in Veterinary Science*, v.93, n.1, p.336-342, 2012.
- ZIMMERMAN, D.R.; GILL, S.; PAWLAK, E.; DALLORSO, M.E.; HORST, R.L. Isolation and identification of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-glycosides from *Solanumglaucophyllum*, in: 12<sup>th</sup> workshop on Vitamin D, Maastricht, p.94, 2003.
- ZIMMERMAN, D.R.; KOSZEWSKI, N.J.; HOY, D.A.; GOFF, J.P.; HORST, R.L. Targeted delivery of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to colon tissue and identification of a major 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> glycoside from *Solanumglaucophyllum* plant leaves. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v.148, p.318-325, 2015.
- ZHOU, C.; ASSEM, M.; TAY, J.C.; WATKINS, P.B.; BLUMBERG, B.; SCHUETZ, E.G.; THUMMEL, K.E. Steroid and xenobiotic receptor and vitamin D receptor crosstalk mediates CYP24 expression and drug-induced osteomalacia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p.1703–1712, 2006.
- XU, R.J.; WANG, F.; ZHANG, S.H. Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors. **Livestock Production Science**, v.66, n. 2, p.95-107, 2000.

### **3 USO DA 1,25-DIHDROXICOLECALCIFEROL GLICOSÍDEO NA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL OU TOTAL DO COLECALCIFEROL E SEUS EFEITOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE DE CÁLCIO E FÓSFORO, DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE LEITÕES**

#### **RESUMO**

Foram realizados dois experimentos, um ensaio de digestibilidade e um desempenho zootécnico. No ensaio de digestibilidade foram utilizados 36 leitões, machos inteiros, com peso médio de  $18,79 \pm 3,37$  kg, distribuídos em blocos, com quatro tratamentos, nove repetições e um animal por unidade experimental (UE). Os tratamentos experimentais consistiram em quatro tratamentos com quantidades variadas de vitamina D por kg de ração, compondo uma substituição parcial do colecalciferol pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo:  $\text{D}_3 = 1969$  UI de colecalciferol; Controle Negativo (CN) = ração isenta de Vitamina D; 50% =  $984,5$  UI de colecalciferol +  $0,375$   $\mu\text{g}$  de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo e 100% = ração com  $0,750$   $\mu\text{g}$  de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo. Para avaliação do desempenho zootécnico foram utilizados 128 leitões, machos inteiros, com aproximadamente 21 dias de idade e peso corporal médio inicial de  $6,82 \pm 0,38$ kg, distribuídos em um delineamento em blocos casualizados com oito repetições e quatro animais por UE, totalizando 32 animais por tratamento. Foram utilizados quatro tratamentos: 100/0 = 100% da exigência de vitamina D suplementada pelo colecalciferol (2707 UI na fase pré-inicial I, 2405 UI na fase pré-inicial II e 1969 UI na fase inicial); 50/50 = 50% da exigência suplementada pelo colecalciferol de acordo com cada fase de criação +  $0,25$   $\mu\text{g}$  de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo; 25/75 = 25% da exigência de colecalciferol para cada fase +  $0,375$   $\mu\text{g}$  de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo e 0/100 =  $0,50$   $\mu\text{g}$  de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo. Comparações entre médias de tratamentos foram realizadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% ou 10% de probabilidade. O erro  $\beta$  dos parâmetros foi utilizado para ajudar a explicar os valores de p de 5 a 10% de probabilidade. A digestibilidade aparente dos nutrientes não foi influenciada ( $P > 0,05$ ) pelos tratamentos, bem como a excreção de  $\text{Ca}^{2+}$  e P. O desempenho zootécnico dos leitões apresentou diferenças entre os tratamentos para as variáveis GPD ( $P = 0,031$ ) e para o CRD ( $P = 0,060$ ) na fase pré-inicial I, PCF ( $P = 0,095$ ) e CRD ( $P = 0,032$ ) na fase pré-inicial I + II, CRD na fase inicial, CRD e conversão alimentar (CA) no período total do experimento. Na fase pré-inicial I, o GPD foi 16,7% maior no tratamento com apenas a inclusão de colecalciferol do que no tratamento com a

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo, o mesmo foi encontrado para o CRD que apresentou 14,8% maior no tratamento 100/0. Para as concentrações plasmáticas, o cálcio na fase pré-inicial II (P=0,058) apresentou a maior concentração no tratamento 50/50. A fosfatase alcalina apresentou diferença entre os tratamentos na fase inicial (P<0,0001), sendo que o tratamento 25/75 promoveu o menor valor plasmático (481,63 U/L). A combinação das duas formas de vitamina D resultou em um aumento significativo de 9% na concentração plasmática de cálcio na fase pré-inicial II, porém não houve diferença entre os tratamentos no período total do experimento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fosfatase alcalina, Nutrição de suínos, Vitamina D.

### **3 USE OF 1,25-DIHYDROXICOLECALCIFEROL GLYCOSIDE IN PARTIAL OR TOTAL REPLACEMENT OF CHOLECALCIFEROL AND ITS EFFECTS ON CALCIUM AND PHOSPHORUS DIGESTIBILITY, ZOOTECHNICAL PERFORMANCE AND BLOOD METABOLITUS PERFORMANCE**

#### **ABSTRACT**

Two experiments were carried out, a digestibility experiment and a zootechnical performance. In the digestibility experiment, 36 whole male piglets, with an average weight of  $18,79 \pm 3,37$  kg were used, distributed in a block design, with four treatments, nine repetitions and one animal per experimental unit (EU). The experimental treatments consisted of four treatments with varying amounts of vitamin D per kg of feed, comprising a partial replacement of cholecalciferol with  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glycoside: D3 = 1969 IU of cholecalciferol; Negative Control (CN) = Vitamin D-free diet; 50% = 984,5 IU cholecalciferol + 0,375  $\mu\text{g}$  of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glycoside; and 100% = feed with 0,750  $\mu\text{g}$  of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glycoside. To evaluate the zootechnical performance, 128 whole male piglets were used, with approximately 21 days of age and average initial body weight of  $6,82 \pm 0,38$  kg, distributed in a randomized block design, with eight replicates and four animals per EU, totaling 32 animals per treatment. Four treatments were used: 100/0 = 100% of the vitamin D requirement supplemented by cholecalciferol (2707 IU in the pre-initial phase I, 2405 IU in the pre-initial phase II and 1969 IU in the initial phase); 50/50 = 50% of the requirement supplemented by cholecalciferol according to each phase + 0,25  $\mu\text{g}$  of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glycoside; 25/75 = 25% of the cholecalciferol requirement for each phase + 0,375  $\mu\text{g}$  of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glycoside and 0/100 = 0,50  $\mu\text{g}$  of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glycoside. Comparisons between treatment averages were performed using the Tukey test at the level of 5% or 10% probability. The  $\beta$  error of the parameters was used to help explain the p values of 5 to 10% probability. The apparent digestibility of nutrients was not influenced ( $P > 0,05$ ) by the treatments, as well as the excretion of  $\text{Ca}^{2+}$  and P. The zootechnical performance of the piglets showed differences between the treatments for the ADWG ( $P = 0,031$ ) and for the ADC ( $P = 0,060$ ) in the pre-initial I, FBW ( $P = 0,095$ ) and ADC ( $P = 0,032$ ) in the pre-initial I + II phase, ADC in the initial phase, ADC and feed conversion rate (FC) in the total period experiment. In the pre-initial I, the ADWG was 16,7% higher in the treatment with only the inclusion of cholecalciferol than in the treatment with the  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glycoside, the same was found for the ADC that presented 14,8 % higher in 100/0

treatment. For plasma concentrations, calcium in the pre-initial II ( $P=0,058$ ) showed the highest concentration in the 50/50 treatment. Alkaline phosphatase showed a difference between treatments in the initial phase ( $P<0.001$ ), with treatment 25/75 promoting the lowest plasma value (481,63 U/L). The combination of the two forms of vitamin D resulted in a significant increase of 9% in the plasma calcium concentration in the pre-initial II phase, however there was no difference between treatments in the total period of the experiment.

**KEYWORDS:** Alkaline phosphatase, pig nutrition, vitamin D.

### 3.1 Introdução

A vitamina D é encontrada na natureza sob duas formas, a vitamina D<sub>2</sub>, presente nos vegetais, e a vitamina D<sub>3</sub>, presente nos tecidos animais. Nos mamíferos a pré-vitamina D<sub>3</sub>, conhecida como ergocalciferol, pode ser convertida em colecalciferol, através da incidência dos raios solares ultravioletas sobre a epiderme, em uma reação de fotólise que promove a quebra das ligações carbônicas 9 e 10 do anel β do ciclo pentanoperidrofenantreno (BARRAL et al., 2007; CASTRO, 2011).

Um estudo mais recente demonstrou que a vitamina D não é absorvida apenas de forma passiva, mas também pode passar por transportadores de membrana do colesterol. A absorção ocorre principalmente no intestino delgado proximal e é influenciada pelas secreções gástricas, pancreáticas e biliares, formação de micelas, absorção na membrana da borda em escova e transporte para fora da célula intestinal (TSIARAS & WEINSTOCK, 2011; REBOUL et al., 2011).

A vitamina D<sub>3</sub> é considerada um hormônio calcitrópico e, para que sua molécula seja ativada, necessita passar dois processos de hidroxilação no organismo. O primeiro passo da ativação metabólica ocorre no fígado, onde o colecalciferol sofre a adição de uma hidroxila no carbono 25 através da ação da enzima 25-hidroxilase, formando a 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>). O segundo passo ocorre principalmente nos rins, pela ação da 1-alfa-hidroxilase com hidroxilação no carbono 1, formando a 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) (BLOMBERG et al., 2010; CASTRO, 2011).

A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é a principal reguladora do metabolismo de cálcio e fósforo no organismo, pois a sua ativação é regulada pelos níveis destes minerais no organismo. Nos rins, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> apresenta a função de diminuir a excreção de Ca<sup>2+</sup>, aumentar a reabsorção de Ca<sup>2+</sup> e inibir a reabsorção de fosfato, sendo que no intestino ocorre o aumento do transporte ativo de Ca<sup>2+</sup> e fosfato (VERSTUYF et al., 2010).

As plantas da família *Solanaceae* são conhecidas pelo seu efeito calcinogênico, como a *Solanum glaucophyllum*. Estas plantas apresentam glicosídeos análogos aos metabólitos ativos da vitamina D<sub>3</sub>, que são quebrados no intestino dos monogástricos por enzimas β-glicosidases e hidrolisam a estrutura, liberando-a lentamente para ser absorvida. A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> de origem herbal apresenta propriedades farmacocinéticas diferentes da fonte sintética devido a sua estrutura de glicosídeo, visto que a forma sintética apresenta uma rápida absorção intestinal, enquanto que o glicosídeo precisa ser hidrolisado primeiro, sendo liberado mais lentamente. Esta liberação retardada pode

garantir uma maior segurança no fornecimento aos animais, devido ao pico de concentração ser menor e a meia-vida biológica maior (ZIMMERMAN et al., 2015; MATHIS et al., 2016; ODRIOZOLA et al., 2018).

Tousignant et al. (2013) forneceram a vitamina na forma 25(OH)D<sub>3</sub> para leitões aos dois dias de idade e avaliaram o desempenho durante a fase lactente e após o desmame. Os autores observaram que o peso médio corporal foi maior no tratamento com o calcidiol, assim como a concentração sérica de 25(OH)D<sub>3</sub> foi maior aos 26 dias após o desmame. Em frangos, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é utilizada com o objetivo de maximizar o desempenho das aves, pois o uso do metabólito ativo pode reduzir a energia gasta na conversão da forma inativa, que já está disponível para imediata utilização (GARCIA et al., 2013).

O aumento da conversão da Vitamina D para sua forma ativa pode promover um aumento na absorção intestinal em dietas com baixas concentrações de cálcio. Além disso, a absorção do Ca também é afetada pela biodisponibilidade do Ca dietético e pela exigência fisiológica deste mineral (WASSERMAN, 2004).

Neste contexto, a vitamina D pode apresentar melhora sobre o desenvolvimento ósseo, a homeostasia mineral e o desempenho dos animais, mediante as suas funções hormonais após a ativação da vitamina para a forma 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. A ligação do calcitriol ao receptor de vitamina D (VDR) aumenta a transcrição de diversos genes de proteínas como, por exemplo, osteocalcina, fosfatase alcalina e calbindina (BARRAL et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a substituição de duas formas de vitamina D, o colecalciferol e a 1,25-dihidroxicolecalciferol, individualmente ou combinadas, sobre a biodisponibilidade de cálcio e fósforo, desempenho zootécnico e parâmetros sanguíneos de leitões em fase de creche.

### **3.2 Materiais e métodos**

O trabalho foi realizado na fazenda experimental Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon, e resultou em dois experimentos. O primeiro experimento foi um ensaio de digestibilidade e o segundo um desempenho zootécnico, seguindo os regulamentos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIOESTE (Protocolo nº 16/19).

### *Experimento I – Ensaio de digestibilidade*

Foram utilizados 36 leitões híbridos, machos inteiros, com peso corporal médio inicial de  $18,79 \pm 3,37$  kg, distribuídos em delineamento em blocos casualizados, com quatro tratamentos, nove repetições e um animal por unidade experimental. Os blocos foram formados a partir do peso inicial dos leitões. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de metabolismo, com tamanhos adaptáveis para cada animal, feitas de metal com piso de estrado plástico e funil para a coleta da urina, também possuía uma caixa de metal na parte posterior para a coleta de fezes. As gaiolas eram providas de comedouro e bebedouro frontal, semelhantes às descritas por Pekas (1968), distribuídas em sala de alvenaria com piso de concreto e cortinas laterais. Deste modo, os animais permaneceram por aproximadamente 12 dias, sendo sete dias de adaptação às gaiolas e à ração experimental, bem como para regularização do consumo metabólico e cinco dias de coleta total de fezes e urina.

As rações foram formuladas para atender às exigências nutricionais (Tabela 1) recomendadas por Rostagno et al. (2017). Os tratamentos experimentais consistiram em quatro tratamentos com quantidades variadas de vitamina D por kg de ração, compondo uma substituição parcial do colecalciferol pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo:  $\text{D}_3 = 1969$  UI de colecalciferol; Controle Negativo (CN) = ração isenta de Vitamina D; 50% =  $984,5$  UI de colecalciferol +  $0,375$   $\mu\text{g}$  de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo e 100% = ração com  $0,750$   $\mu\text{g}$  de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo.

A quantidade de ração fornecida durante o período de coleta foi determinada em função do consumo na fase de adaptação, ajustado pelo peso metabólico ( $\text{PV}^{0,75}$ ), de acordo com Sakomura e Rostagno et al. (2016). A ração foi dividida em duas refeições diárias, às 08:00 horas e às 16:00 horas, a água foi fornecida à vontade. O óxido de ferro foi utilizado na ração na proporção de 1% como marcador no início e ao final do período de coleta.

As fezes excretadas por cada animal foram coletadas diariamente, pesadas e acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas em freezer até o final do período experimental. Após isso, foram descongeladas, homogeneizadas e uma amostra foi retirada para a pré-secagem em estufa de ventilação forçada a  $55^\circ\text{C}$  por um período de 72 horas. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho tipo bola e armazenadas em potes de polietileno para as análises químicas de cálcio e fósforo e análises de matéria seca, proteína bruta e matéria mineral.

Tabela 1. Composição da ração referência utilizada no ensaio de digestibilidade dos leitões

Ingredientes	Composição centesimal
Milho, 7,88%	58,765
Farelo de soja, 45,4%	33,868
Óleo de soja	3,159
Fosfato bicálcico, 21%	1,894
Calcário calcítico, 37%	0,830
Sal comum	0,484
Premix vitamínico <sup>1</sup>	0,200
L-lisina, HCl 78%	0,415
L-treonina, 99%	0,179
DL-metionina, 98%	0,169
L-triptofano, 99%	0,022
Promotor de crescimento <sup>2</sup>	0,011
<b>Total</b>	<b>100,00</b>
<b>Composição calculada (%)</b>	
Energia metabolizável (Kcal kg <sup>-1</sup> )	3,350
Fibra bruta	3,150
Extrato etéreo	5,627
Cálcio total	0,913
Fósforo disponível	0,450
Fósforo total	0,690
Lisina digestível	1,281
Metionina + cistina digestível	0,730
Treonina digestível	0,833
Triptofano digestível	0,243
Sódio	0,205
Potássio	0,799
FDN <sup>3</sup>	11,509
FDA <sup>4</sup>	4,647
<b>Composição analisada (% MN)</b>	
Matéria seca	96,04
Matéria mineral	7,26
Proteína bruta	18,11

<sup>1</sup> Premix vitamínico e mineral: Vitamina A (mín.) 3.437.500 UI/kg; vitamina E (mín.) 20.000 UI/Kg; vitamina K3 (mín.) 1.500 UI/kg; vitamina B1 (mín.) 500 mg/kg; vitamina B2 (mín.) 1.565 mg/kg; vitamina B6 (mín.) 1.000 mg/kg; vitamina B12 (mín.) 10.000 mcg/kg; niacina (mín.) 15g/Kg; ácido pantotênico (mín.) 7.500 mg/kg; ácido fólico (mín.) 150 mg/kg; biotina (mín.) 50 mg/kg; colina (mín.) 100 g/kg; manganês (mín.) 20 g/kg; zinco (mín.) 55 g/kg; ferro (mín.) 40 g/kg; cobre (mín.) 6.000 mg/kg; iodo (mín.) 500 mg/kg; selênio (mín.) 180 mg/kg.

<sup>2</sup>Tiamulina;

<sup>3</sup>Fibra em detergente neutro;

<sup>4</sup>Fibra em detergente ácido.

A urina foi coletada em baldes contendo 20 mL de uma solução de HCl 1:1 para evitar a proliferação de bactérias. Diariamente, a urina foi coletada e o seu volume mensurado, sendo que uma alíquota de 20% foi retirada e acondicionada em recipiente plástico, identificados e armazenados em freezer até o final do período de coleta,

quando foram homogeneizados e uma amostra de 20% do total foi retirada para a análise de cálcio.

O método utilizado foi o de coleta total de fezes. Foram avaliados os teores de Ca e P na ração e nas fezes e P na urina, o consumo de Ca e P total, a excreção de Ca e P, além dos coeficientes de digestibilidade, de matéria seca, proteína bruta, matéria mineral, matéria orgânica, cálcio e fósforo. Para determinar o coeficiente de digestibilidade foi utilizada a fórmula abaixo, descrita por Sakomura e Rostagno (2016).

Coeficiente de digestibilidade aparente (CDA)

$$\text{CDA (\%)} = \frac{\text{Componente ingerido (g)} - \text{Componente excretado (g)}}{\text{Componente ingerido (g)}} \times 100$$

As análises de matéria seca, proteína bruta, matéria mineral das rações e fezes foram realizadas de acordo com a metodologia de Silva e Queiroz (2009), no laboratório de nutrição animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. As análises de cálcio das rações, fezes e urina foram realizadas por espectrometria de absorção atômica e as análises de fósforo por espectroscopia UV vis, no laboratório de química analítica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Antes de avaliar o resultado da análise de variância (ANOVA), foi procedida à análise dos resíduos padronizados de *Student*, a fim de diagnosticar *outliers*. O critério adotado para identificação de *outliers* foi baseado na curva de distribuição normal, ou seja, valores maiores ou iguais a três desvios-padrão, em valor absoluto, foram considerados como influentes. A normalidade dos erros experimentais e a homogeneidade de variâncias entre os tratamentos para as diversas variáveis foram avaliadas previamente, utilizando, para isso, os testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente.

Para as características avaliadas, o modelo estatístico utilizado foi:  $Y_{ijk} = m + T_i + b_j + \varepsilon_{ijk}$ . Os efeitos dos fatores incluídos no modelo foram descritos por:  $Y_{ijk}$  = observação média da variável dependente em cada parcela, medida na *i*-ésima classe de tratamento; no *j*-ésimo bloco e na *k*-ésima repetição;  $m$  = efeito da média geral;  $T_i$  = efeito das classes de tratamento, para  $i = (1, 2, 3 \text{ e } 4)$ ;  $b_j$  = efeito de bloco, para  $j = (1, 2 \text{ e } 3)$ ;  $\varepsilon_{ijk}$  = erro aleatório da parcela associado ao nível *i*, bloco *j* e repetição *k*.

Os efeitos de tratamento experimental sobre as variáveis dependentes foram verificados por meio da ANOVA. Comparações entre médias de tratamentos foram

realizadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os procedimentos do software estatístico “*Statistical Analysis System*” (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Todos os dados foram apresentados como médias com erro padrão da média.

### *Experimento II – Desempenho zootécnico*

Foram utilizados 128 leitões híbridos, machos inteiros, com aproximadamente 21 dias de idade e peso médio inicial de  $6,82 \pm 0,38$ kg, distribuídos em um delineamento em blocos casualizados, com oito repetições e quatro animais por unidade experimental, totalizando 32 animais por tratamento. Os blocos foram formados com base no peso inicial individual dos animais no momento do alojamento, os mesmos receberam identificação por meio de brincos. Os animais foram alojados em baias de creche suspensas com dimensões de 1,0m x 1,5m e 0,37m<sup>2</sup> por animal, providas de comedouros frontais e bebedouros tipo chupeta.

A temperatura e a umidade relativa do ar foram mensuradas com auxílio de equipamento *datalogger*. As janelas da instalação que ficavam expostas ao sol receberam lonas pretas para evitar a entrada da radiação solar. Durante o período experimental a temperatura variou entre 19,5 a 33,1 °C com média de 26,2 °C e 30% e a 90% de umidade relativa do ar.

As dietas foram formuladas para atenderem às exigências nutricionais. Seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2017), o complexo vitamínico utilizado foi isento de vitamina D (Tabela 2) e o colecalciferol e a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> foram acrescentadas a ração *on top*.

Os tratamentos foram constituídos pela inclusão de colecalciferol e 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo, um em substituição ao outro para completar 100% da recomendação. As fontes de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeos utilizadas foram as folhas secas da planta *Solanum glaucophyllum* (Panbonis®, Herbonis Animal Health), que fornecem 10 mg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> por kg de produto, segundo determinação analítica. A recomendação para a utilização do produto foi de 50 g t<sup>-1</sup>, que equivale a 0,5 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> por kg de ração.

Tabela 2. Composição centesimal e química das rações experimentais para leitões (6 a 24 kg)

Ingredientes (%)	Fases de crescimento		
	Pré-Inicial 1	Pré-Inicial 2	Inicial
Milho, 7,88%	49,880	55,510	57,850
Farelo de soja, 45%	17,470	19,900	30,520
Conc. proteico de soro <sup>1</sup>	11,360	8,000	-
Leite em pó integral	4,000	-	-
Soja micronizada, 36%	8,000	8,000	4,000
Açúcar	4,000	3,000	2,000
Óleo <sup>2</sup>	1,530	2,010	2,420
Fosfato monocálcico, 21%	1,350	1,550	1,690
Calcário calcítico, 37%	0,190	0,370	0,400
Sal comum	0,470	0,500	0,480
Ácido cítrico	0,400	-	-
L-lisina, HCl 78%	0,400	0,420	0,190
L-treonina, 98%	0,140	0,140	0,030
L-triptofano, 98%	0,080	0,080	0,040
DL-metionina, 99%	0,180	0,170	0,090
Premix <sup>3,4</sup>	0,200	0,200	0,200
Aditivo <sup>5</sup>	0,200	-	-
Promotor de crescimento <sup>6</sup>	0,150	0,150	0,050
Sulfato de cobre, 25%	-	-	0,040
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Valores calculados (%)</b>			
Energia metabolizável (Kcal kg <sup>-1</sup> )	3,500	3,450	3,400
Extrato etéreo	6,390	6,070	5,770
Cálcio total	0,500	0,550	0,550
Fósforo disponível	0,450	0,450	0,450
Lisina digestível	1,160	1,150	1,100
Metionina + cistina digestível	0,680	0,680	0,670
Treonina digestível	0,730	0,720	0,690
Sódio	0,300	0,270	0,210
Lactose	10,000	6,000	-
<b>Composição analisada (% MN)</b>			
Matéria seca	95,153	95,273	95,411
Proteína bruta	20,845	20,896	23,525
Matéria mineral	4,713	4,636	4,968

<sup>1</sup>Concentrado proteico de soro de leite em pó; <sup>2</sup>Óleo vegetal refinado: Pré Inicial I; óleo vegetal degomado: Pré Inicial 2 e Inicial; <sup>3</sup>Premix vitamínico e mineral pré inicial I e II: Vitamina A (mín.) 3.850.000 UI/kg; vitamina E (mín.) 22.400 UI/Kg; vitamina K3 (mín.) 1.680 UI/kg; vitamina B1 (mín.) 560 mg/kg; vitamina B2 (mín.) 1.750 mg/kg; vitamina B6 (mín.) 1.120 mg/kg; vitamina B12 (mín.) 11.000 mcg/kg; niacina (mín.) 17g/Kg; ácido pantotênico (mín.) 8.400 mg/kg; ácido fólico (mín.) 168 mg/kg; biotina (mín.) 56 mg/kg; colina (mín.) 112 g/kg; manganês (mín.) 22,50 g/kg; zinco (mín.) 61,50 g/kg; ferro (mín.) 45 g/kg; cobre (mín.) 6.700 mg/kg; iodo (mín.) 560 mg/kg; selênio (mín.) 205 mg/kg; <sup>4</sup>Premix fase Inicial: Vitamina A (mín.) 3.437.500 UI/kg; vitamina E (mín.) 20.000 UI/Kg; vitamina K3 (mín.) 1.500 UI/kg; vitamina B1 (mín.) 500 mg/kg; vitamina B2 (mín.) 1.565 mg/kg; vitamina B6 (mín.) 1.000 mg/kg; vitamina B12 (mín.) 10.000 mcg/kg; niacina (mín.) 15g/Kg; ácido pantotênico (mín.) 7.500 mg/kg; ácido fólico (mín.) 150 mg/kg; biotina (mín.) 50 mg/kg; colina (mín.) 100 g/kg; manganês (mín.) 20 g/kg; zinco (mín.) 55 g/kg; ferro (mín.) 40 g/kg; cobre (mín.) 6.000 mg/kg; iodo (mín.) 500 mg/kg; selênio (mín.) 180 mg/kg; <sup>5</sup>Aditivo nutricional, fonte de nucleotídeos livres e purificados;

<sup>6</sup>Colistina, 8%.

Os tratamentos consistiram em: 100/0 = 100% da exigência de vitamina D suplementada pelo colecalciferol (2707 UI na fase pré-inicial I, 2405 UI na fase pré-inicial II e 1969 UI na fase inicial); 50/50 = 50% da exigência suplementada pelo colecalciferol de acordo com cada fase de criação + 0,25 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; 25/75 = 25% da exigência de colecalciferol para cada fase + 0,375 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo e 0/100 = 0,50 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo.

A ração e água foram fornecidas à vontade durante todo período experimental, as sobras de rações foram recolhidas diariamente, pesadas e descontadas do fornecimento para cálculo do consumo diário. O peso individual dos animais foi registrado no início e ao final de cada fase experimental, sendo divididas em: Pré Inicial I, Pré Inicial II e Inicial. Com base nesses dados, determinou-se o peso corporal inicial (PCI, kg), peso corporal final (PCF, kg), média do consumo de ração diário (CRD, kg dia<sup>-1</sup>), média do ganho de peso diário (GPD, kg dia<sup>-1</sup>) e a conversão alimentar (CA, kg kg<sup>-1</sup>).

No início do experimento e ao final de cada fase foram realizadas coletas de sangue de 16 animais por tratamento, após jejum de 6 horas. O sangue foi coletado através da veia cava cranial, em duplicata, sendo um tubo com heparina e outro sem anticoagulante. O sangue foi centrifugado (Centrilab Model 80-2B analog centrifuge) a 4.000 ppm durante 5 minutos e o soro/plasma transferido para microtubos de polietileno tipo “ependorfes” previamente identificados e congelados. Foram realizadas análises de cálcio (Ca), fósforo (P) e fosfatase alcalina (FA) no plasma por meio de kits comerciais (Elitech) e as leituras foram realizadas em equipamento analisador bioquímico (Flexor EL200). A análise da 25(OH)D<sub>3</sub> no soro foi realizada em laboratório de análises clínicas pelo método de quimioluminescência.

Antes de avaliar o resultado da análise de covariância (ANCOVA) e variância (ANOVA), foi procedida a análise dos resíduos padronizados de *Student*, a fim de diagnosticar *outliers*. O critério adotado para identificação de *outliers* foi baseado na curva de distribuição normal, ou seja, valores maiores ou iguais a três desvios-padrão, em valor absoluto, foram considerados como influentes. A normalidade dos erros experimentais e a homogeneidade de variâncias entre os tratamentos para as diversas variáveis foram avaliadas previamente utilizando os testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente.

Para as características de desempenho zootécnico e metabólitos sanguíneos, o modelo estatístico utilizado foi:  $Y_{ijk} = m + T_i + b_j + \beta (X_{ijk} -) + \varepsilon_{ijk}$ . Os efeitos dos

fatores incluídos no modelo foram descritos por:  $Y_{ijk}$  = observação média da variável dependente em cada parcela, medida na  $i$ -ésima classe de tratamento; no  $j$ -ésimo bloco e na  $k$ -ésima repetição;  $m$  = efeito da média geral;  $T_i$  = efeito das classes de tratamento para  $i = (1, 2, 3 \text{ e } 4)$ ;  $b_j$  = efeito de bloco, para  $j = (1 \text{ e } 2)$ ;  $\beta$  = coeficiente de regressão de  $Y$  sobre  $X$ ;  $X_{ijk}$  = observação média da covariável (peso corporal inicial e *baseline*) em cada parcela, medida na  $i$ -ésima classe de tratamento, no  $j$ -ésimo bloco e na  $k$ -ésima repetição;  $\bar{X}$  = média geral para a covariável  $X$ ;  $\varepsilon_{ijk}$  = erro aleatório da parcela associado ao nível  $i$ , bloco  $j$  e repetição  $k$ .

Os efeitos de tratamento experimental sobre as variáveis dependentes foram verificados por meio da ANCOVA e ANOVA. Comparações entre médias de tratamentos foram realizadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% a 10% de probabilidade. O erro  $\beta$  dos parâmetros foi utilizado para ajudar a explicar os valores de  $p$  de 5 a 10% de probabilidade. Este procedimento foi realizado usando o poder do teste  $(1-\beta)$  do pacote R.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os procedimentos do software estatístico “*Statistical Analysis System*” (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Todos os dados foram apresentados como médias com erro padrão da média.

### 3.3 Resultados e discussões

#### *Coefficientes de digestibilidade aparente e nutrientes digestíveis*

Os resultados mostram que a digestibilidade aparente dos nutrientes não foi influenciada ( $P>0,05$ ) pelos tratamentos, bem como a excreção de  $Ca^{2+}$  e P (Tabela 3). Os coeficientes de digestibilidade aparente do  $Ca^{2+}$  foram semelhantes aos encontrados na literatura em dietas contendo fitase, porém a digestibilidade de P do presente trabalho foi superior a estes, que apresentaram valores entre 24,7 e 28,4% de P (GUGGENBUHL et al., 2007; BENTO et al., 2012; ZENG et al., 2014).

O coeficiente de digestibilidade aparente do cálcio também não apresentou efeito no trabalho de Santana et al. (2018), quando diferentes fontes de cálcio foram utilizadas na dieta de leitões, indicando uma digestibilidade de 65,16% com a utilização de calcário calcítico, sendo superior a este trabalho. Portanto, independente da forma utilizada como fonte de vitamina D, não foi o suficiente para alterar a digestibilidade dos nutrientes.

Durante o início da fase de creche, os leitões apresentaram uma acidificação estomacal pela maior produção de ácido láctico vindo de uma dieta rica em lactose, a redução do pH intestinal pode levar ao aumento da absorção de cálcio pela ação de dissociação de compostos, como o fosfato de cálcio, liberando  $\text{Ca}^{2+}$ . Entretanto, no presente experimento os animais não receberam uma dieta com inclusão de lactose e não houve influências das diferentes formas de vitamina D ofertadas nas dietas sobre a digestibilidade do cálcio, demonstrando que não houve alteração no pH intestinal dos leitões (JIANG et al., 2013; DENCK et al., 2017).

Tabela 3. Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e nutrientes digestíveis das rações para leitões suplementadas com colecalciferol ou  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo

CDA (%)	Tratamentos <sup>1</sup>				Média	EPM <sup>5</sup>	P-value <sup>6</sup>
	D3	CN	50	100			
Matéria seca	74,08	76,16	74,88	70,48	73,905	1,231	0,414
Matéria orgânica	78,16	81,86	79,56	75,75	78,836	0,996	0,175
Proteína bruta	76,91	73,08	76,85	70,94	73,641	1,385	0,361
Cálcio	74,84	70,14	73,89	72,71	72,897	1,508	0,730
Fósforo	69,06	70,64	65,69	66,11	67,880	1,746	0,484
Nutrientes digestíveis							
MSD <sup>3</sup> , %	36,25	35,34	34,93	32,83	35,032	0,602	0,150
MOD <sup>4</sup> , %	74,34	74,35	75,85	76,55	75,279	0,632	0,475
$\text{Ca}^{2+}$ ingerido, g/d	5,24	4,72	4,79	4,67	4,860	0,175	0,674
$\text{Ca}^{2+}$ fecal, g/d	1,26	1,43	1,25	1,25	1,302	0,082	0,855
$\text{Ca}^{2+}$ urinário, g/d	1,18	1,11	1,17	1,05	1,132	0,085	0,947
$\text{Ca}^{2+}$ retido, %	74,53	69,76	73,40	72,29	72,499	1,508	0,727
P ingerido, g/d	6,49	7,08	6,34	5,92	6,462	0,270	0,488
P fecal, g/d	2,00	2,09	2,03	1,93	2,016	0,107	0,900

<sup>1</sup>Dietas experimentais – D<sub>3</sub> = 100% colecalciferol; CN = controle negativo sem vitamina D; 50 = 50% colecalciferol + 50%  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo; 100 = 100%  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo.

<sup>3</sup>MSD = matéria seca digestível;

<sup>4</sup>MOD = matéria orgânica digestível;

<sup>5</sup>EPM: erro padrão da média;

<sup>6</sup>Significância de p.

A excreção de cálcio e fósforo não diferiu entre os tratamentos independentes da forma como a vitamina D foi suplementada. A utilização da  $25(\text{OH})\text{D}_3$  por Duffy et al. (2018) para os suínos, na fase de terminação, também não apresentou efeitos significativos na digestibilidade de nutrientes. Os estudos de Larsen et al. (2000) e Gonzáles-Vega et al. (2016) com suínos demonstram que quanto maior o consumo de cálcio, maior a excreção deste mineral nas fezes e urina, com o aumento na excreção fecal de fósforo e redução nas perdas urinárias pelo aumento na reabsorção renal de P.

A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  pode levar ao aumento na absorção intestinal de cálcio e fósforo com consequente hipercalcemia, hiperfosfatemia e mineralização dos tecidos moles, porém, a utilização do glicosídeo, neste estudo, não influenciou no aumento da absorção, visto que não houve diferença na excreção fecal destes minerais. Como a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo é quebrada lentamente, a sua liberação é retardada, fazendo com que a sua ação se assemelhe ao colecalciferol devido à necessidade de conversão, para que assim não ocorra um pico de absorção de Ca e P, garantindo mais proteção contra o excesso destes minerais no organismo. Deste modo, pode-se concluir que o  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo não exerceu influência sobre a digestibilidade dos nutrientes e na excreção dos minerais cálcio e fósforo (MATHIS et al., 2016; ODRIOZOLA et al., 2018).

#### *Desempenho zootécnico*

O desempenho zootécnico dos leitões (Tabela 4) foi apresentado de forma que demonstra o efeito acumulado entre as fases de criação. Foi encontrado efeito dos tratamentos sobre o GPD ( $P=0,031$ ) e para o CRD ( $P=0,060$ ) na fase pré-inicial I, PCF ( $P=0,095$ ) e CRD ( $P=0,032$ ) no acumulado das fases pré-inicial I + II, CRD ( $P=0,002$ ) e CA ( $P=0,002$ ) no período total do experimento.

Na fase pré-inicial I, o tratamento com apenas colecalciferol (100/0) obteve um GPD 16,7% maior do que no tratamento com a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo (0/100). O mesmo foi encontrado para o CRD, que se apresentou 14,8% maior no tratamento 100/0 quando comparado ao tratamento 0/100. Entretanto, no CRD o tratamento 50/50 foi semelhante ao tratamento 100/0, o que não ocorreu no GPD em que o tratamento 50/50 apresentou redução de 19,2%.

Diversos fatores podem levar a uma queda no desempenho dos leitões, pois o desmame é um período crítico na suinocultura. O leitão desmamado precocemente apresenta o sistema digestório imaturo e com uma capacidade limitada de digestão e absorção de nutrientes. A mudança que ocorre no lúmen intestinal após o desmame altera a estrutura e a função do intestino delgado, principalmente o tamanho dos vilos e a produção de enzimas digestivas. Nesta fase, os leitões não apresentam total maturação do trato gastrointestinal, contendo baixa produção de enzimas que realizam a digestão dos nutrientes das rações, o que resulta no baixo aproveitamento dos nutrientes (XU et al., 2000; JAYARAMAN & NYACHOTI, 2017).

Tabela 4. Desempenho zootécnico de leitões alimentados com rações contendo colecalciferol e/ou 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo

Variáveis <sup>1</sup>	Tratamentos <sup>2</sup>				Média	EPM	P-value	1-β (%) <sup>3</sup>
	100/0	50/50	25/75	0/100				
Fase Pré-inicial I (6,807 a 9,610 kg)								
PCI, kg	6,783	6,810	6,812	6,823	6,807	0,062	-	-
PCF, kg	9,847	9,393	9,731	9,471	9,610	0,151	0,143	37,284
GPD, kg	0,203 <sup>a</sup>	0,164 <sup>b</sup>	0,189 <sup>ab</sup>	0,169 <sup>b</sup>	0,181	0,006	0,031	68,534
CRD, kg	0,256 <sup>a</sup>	0,247 <sup>a</sup>	0,242 <sup>ab</sup>	0,218 <sup>b</sup>	0,240	0,007	0,060	58,152
CA, kg:kg	1,332	1,451	1,337	1,311	1,357	0,027	0,239	35,184
Fase Pré-inicial I + II (6,807 a 14,564 kg)								
PCF, kg	15,066 <sup>a</sup>	14,032 <sup>b</sup>	14,906 <sup>ab</sup>	14,238 <sup>ab</sup>	14,560	0,238	0,095	53,328
GPD, kg	0,301	0,262	0,289	0,268	0,280	0,008	0,104	53,609
CRD, kg	0,427 <sup>a</sup>	0,361 <sup>b</sup>	0,401 <sup>ab</sup>	0,366 <sup>ab</sup>	0,388	0,009	0,032	70,790
CA, kg:kg	1,427	1,403	1,386	1,310	1,381	0,023	0,227	36,048
Período total (6,807 a 21,632 kg)								
PCF, kg	22,801	21,517	21,342	20,870	21,632	0,592	0,120	43,274
GPD, kg	0,346	0,320	0,316	0,305	0,321	0,015	0,154	46,066
CRD, kg	0,553 <sup>a</sup>	0,486 <sup>b</sup>	0,504 <sup>b</sup>	0,492 <sup>b</sup>	0,508	0,014	0,002	95,412
CA, kg:kg	1,615 <sup>a</sup>	1,437 <sup>b</sup>	1,650 <sup>a</sup>	1,670 <sup>a</sup>	1,593	0,038	0,002	93,158

\*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na linha, diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 10% de probabilidade.

<sup>1</sup>PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; GPD: ganho de peso diário médio; CRD: consumo de ração diário médio; CA: conversão alimentar.

<sup>2</sup>Dietas experimentais -100/0 = 100% colecalciferol; 50/50 = 50% colecalciferol + 50% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; 25/75 = 25% colecalciferol + 75% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>glicosídeo; 0/100 = 100% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo.

<sup>3</sup>Poder do teste estatístico considerando alfa = 5%.

Várias alterações estão relacionadas ao período de desmame, dentre elas estão as mudanças histológicas, fisiológicas, bioquímicas, nutricionais e socioambientais. Este é um período de estresse para o leitão pela separação da mãe, transporte até a creche associados ao novo ambiente e contato com outros leitões, além da alteração da alimentação com a substituição da dieta líquida pela sólida com novo perfil nutricional. Estes fatores favorecem o desenvolvimento de bactérias patogênicas e associado à imaturidade intestinal, predispõe o leitão a problemas produtivos, principalmente a diarreia pós-desmame (RAMOS et al., 2016; DENCK et al., 2017).

A 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> possui a capacidade de suprimir a imunidade adaptativa e melhorar a imunidade inata com redução da produção de células linfoides. A conversão da 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> para a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> desencadeia uma resposta imune que não é encontrada quando fornecida, na dieta, apenas a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Portanto, a ativação da resposta imunitária mediada pela vitamina D se dá por esta conversão que ocorre no citosol dos macrófagos e se o nível de 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for baixo, a resposta imune pode ser comprometida (NELSON et al., 2010; ANDRADE et al., 2011). Assim sendo, quando a

dieta possui apenas a forma ativa da vitamina D e não há a conversão da  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  em  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , pode ocorrer um prejuízo no sistema imune, levando a maior susceptibilidade das doenças decorrentes do período de desmame e, com isso, causar redução no consumo alimentar e consequente queda no ganho de peso dos leitões.

Na fase pré-inicial I + II, o maior peso final foi para o tratamento 100/0, seguindo o CRD que também foi maior para este tratamento, com menores valores para os tratamentos 50/50 e 0/100. Já no período total do experimento, o CRD do tratamento 100/0 foi superior aos demais tratamentos. A conversão alimentar foi melhor em suínos, recebendo o tratamento 50/50.

Em outras pesquisas semelhantes com a suplementação de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  na dieta de suínos; também não houve efeito para o desempenho zootécnico em todo o período de creche. A falta de significância para estes resultados sugere que as dietas estavam balanceadas com os demais nutrientes das rações, demonstrando que a inclusão do calcidiol não altera o desempenho, pois o organismo é capaz de regular a sua ativação e inativação de forma controlada (JAKOBSEN et al., 2007; O'DOHERTY et al., 2010; REGASSA et al., 2015).

O tratamento 100/0 com a utilização apenas do colecalciferol resultou no maior consumo de ração (CRD) no período total do experimento e o tratamento com a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo resultou no menor CRD. Resposta semelhante foi encontrada por Garcia et al. (2013) em frangos de corte, demonstrando uma baixa eficiência na utilização exclusiva de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo com consequente redução no desempenho.

Isto posto, a utilização limitada apenas ao  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo na fase de creche, não demonstrou ser interessante pelo baixo desempenho apontado durante o período, com redução do consumo de ração e consequente piora na CA dos leitões.

#### *Metabólitos sanguíneos*

A análise de sangue dos suínos teve efeito na concentração plasmática de cálcio (Tabela 5) na fase pré-inicial II ( $P=0,058$ ) com a maior concentração no tratamento 50/50 (50% colecalciferol + 50%  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo). A fosfatase alcalina apresentou diferença entre os tratamentos na fase inicial ( $P<0,0001$ ), sendo que o tratamento 25/75 (25% colecalciferol +  $37,5\text{g t}^{-1}$  de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo)

demonstrou o menor valor plasmático desta enzima quando comparado aos demais tratamentos.

Tabela 5. Metabólitos sanguíneos de leitões alimentados com colecalciferol e/ou 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>				Média	EPM	P-value
	100/0	50/50	25/75	0/100			
Fase Pré-inicial I (6,807 a 9,610 kg)							
Cálcio, mg/dL	11,148	11,593	11,261	11,718	11,430	0,131	0,413
Fósforo, mg/dL	8,083	8,265	8,021	8,096	8,116	0,101	0,806
Magnésio, mg/dL	2,542	2,518	2,515	2,520	2,523	0,044	0,994
FA <sup>2</sup> , U/L	510,63	504,00	414,75	499,50	482,22	23,381	0,383
25(OH)D <sub>3</sub> , ng/mL	10,235	11,770	10,520	10,493	10,754	0,457	0,837
Fase Pré-inicial II (9,610 a 14,564 kg)							
Cálcio, mg/dL	10,571 <sup>b</sup>	11,372 <sup>a</sup>	10,917 <sup>ab</sup>	10,348 <sup>b</sup>	10,802	0,144	0,058
Fósforo, mg/dL	8,880	8,723	9,062	8,698	8,840	0,113	0,647
Magnésio, mg/dL	2,326	2,387	2,163	2,444	2,330	0,104	0,547
FA, U/L	623,63	656,75	621,13	702,50	651,00	28,291	0,804
25(OH)D <sub>3</sub> , ng/mL	7,540	6,020	5,520	7,918	6,749	0,458	0,600
Fase Inicial (14,564 a 21,632 kg)							
Cálcio, mg/dL	11,407	11,883	11,582	11,209	11,520	0,101	0,138
Fósforo, mg/dL	8,875	8,611	8,567	8,216	8,567	0,152	0,594
Magnésio, mg/dL	2,485	2,492	2,443	2,432	2,463	0,037	0,948
FA, U/L	620,00 <sup>a</sup>	740,00 <sup>a</sup>	481,63 <sup>b</sup>	679,75 <sup>a</sup>	630,34	23,617	<0,001
25(OH)D <sub>3</sub> , ng/mL	4,867	4,503	4,682	4,422	4,618	0,193	0,922

\*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na linha, diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Dietas experimentais – 100/0 = 100% colecalciferol; 50/50 = 50% colecalciferol + 50% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; 25/75 = 25% colecalciferol + 75% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; 0/100 = 100% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo.

<sup>2</sup> FA = Fosfatase alcalina.

Durante a fase de creche há um aumento na concentração de fosfatase alcalina dos animais devido ao crescimento ósseo que ocorre nesta fase até o fechamento da placa de crescimento. A partir disso, a concentração de FA decresce pela redução no desenvolvimento ósseo em animais adultos (AROUCA et al., 2010; VAN GREVENHOF et al., 2012). Isto foi demonstrado por Barros (2010), que encontrou o valor de 253,62 U L<sup>-1</sup> em suínos adultos do tratamento e controle; e 243,31 U L<sup>-1</sup> em suínos alimentados com a vitamina D ativa, assim como Arouca et al. (2010), que estudou os níveis crescentes de fósforo em suínos adultos e encontraram valores entre 197 e 251 U L<sup>-1</sup> de fosfatase alcalina total.

Os tratamentos com a inclusão das duas formas de vitamina D foram os que apresentaram maior concentração plasmática de Ca (P=0,058) na fase pré-inicial II. O

tratamento com apenas  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo não foi superior na concentração sanguínea deste mineral, pois uma das funções conhecidas da vitamina D no metabolismo do cálcio é o aumento na absorção intestinal pela abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , o aumento no transporte celular, bem como o aumento na reabsorção renal de cálcio (HAUSSLER et al., 2011; SCHLEGEL et al., 2017).

O sistema metabólico da vitamina D é conhecido principalmente por ser essencial para a homeostase mineral e metabolismo ósseo. O calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) aumenta a absorção intestinal e reabsorção renal de Ca e P (BERGWITZ e HÜPPNER, 2010). Em condições de baixo consumo de cálcio, o sistema  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$  induz a entrada de cálcio no intestino pelo transportador TRPV6 da membrana apical, bem como o transporte celular no enterócito realizado pela calbindinas (CaBP9k) e Ca-ATPas, promovendo maior absorção intestinal do mineral. Nos rins, induz a reabsorção de cálcio pelo transportador TRPV5 e de fosfato pelo co-transportador de sódio-fosfato (GOLTZMAN et al., 2014)

A concentração sérica de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  não apresentou diferenças nas fases de crescimento e no período total ( $P=0,922$ ), mesmo no tratamento 0/100 em que a suplementação vitamínica foi apenas com  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo. Como a vitamina D é uma vitamina lipossolúvel, o seu armazenamento pode ocorrer no tecido adiposo e principalmente no fígado por aproximadamente três semanas, enquanto que a sua conversão para a forma metabolicamente ativa depende da necessidade do organismo, portanto, neste trabalho, o período de creche não foi tempo suficiente para demonstrar a carência desta vitamina (ALEXANDER et al., 2017).

Salas (2011) encontrou valores séricos de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  entre 5 a  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  em leitões neonatais e Flohr et al. (2014) encontraram valores ainda menores para leitões recém nascidos,  $3,6 \text{ ng mL}^{-1}$ , porém como estes autores não encontraram nenhum sinal de doença óssea ou metabólica, concluíram que a concentração da  $25(\text{OH})\text{D}_3$  foi suficiente para manter a homeostase de cálcio e o desenvolvimento dos ossos, fator que pode explicar os resultados do presente experimento, em que foram encontrados valores entre  $4,56$  a  $18,97 \text{ ng mL}^{-1}$ , no entanto, nenhum distúrbio patológico foi identificado.

Zimmerman et al. (2015) avaliaram a utilização de folhas secas de *Solanum glaucophyllum* em dietas para ratos com concentrações diferentes de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo e verificaram que a oferta de até  $333 \mu\text{g}$  do glicosídeo por dia não diferiu a concentração plasmática de cálcio e de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , sugerindo um risco mínimo de desenvolvimento da hipercalcemia.

Portando, a oferta de dietas com suplementação de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo não alterou o perfil metabólico sanguíneo dos minerais: cálcio, fósforo e magnésio. Assim sendo, mostrou-se semelhante com a utilização do colecalciferol, constatando que não houve risco de aumento da calcemia.

### **3.4 Conclusões**

As dietas para leitões na fase de creche com inclusão de vitamina D, nas formas de colecalciferol ou 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo, individualmente ou combinadas, resultam em digestibilidade similar de cálcio e fósforo. Embora não tenha sido encontrada uma melhora no desempenho do tratamento 0/100, as formas combinadas de vitamina D (tratamentos 50/50 e 25/75) elevam a concentração plasmática de cálcio em leitões na fase pré-inicial II.

### 3.5 Referências

- ALEXANDER, B.M.; INGOLD, B.C.; YOUNG, J.L.; FENSTERSEIFER, P.J.; WECHSLER, P.J.; AUSTIN, K.J.; LARSON-MEYER, D.E. Sunlight exposure increases vitamin D sufficiency in growing pigs fed a diet formulated to exceed requirements. **Domestic Animal Endocrinology**, n.59, p.37-42, 2017.
- ANDRADE, C.; ALMEIDA, V.V.; COSTA, L.B.; BERENCHTEIN, B.; MOURÃO, G.B.; MIYADA, V.S. Levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.4, p.788-796, 2011.
- AROUCA, C.L.C.; FONTES, D.O.; SILVA, F.C.O.; SILVA, M.A.; CAMPOS, F.R.; ALMEIDA, F.R.C.L.; CORREA, G.S.S.; DE PAULA, E.; HAESE, D. Níveis de fósforo disponível para suínos machos castrados dos 60 aos 95 kg. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, p.2646-2655, 2010.
- BARRAL, D.; BARROS, A.C.; ARAÚJO, R.P.C.; Vitamina D: uma abordagem molecular. **Pesquisa Brasileira de Odontopediatria Clínica Integrada**, n. 7, v.3, p. 309-315, 2007.
- BENTO, M.H.L.; PEDERSEN, C.; PLUMSTEAD, P.W.; SALMON, L.; NYACHOTI, C.M.; BIKKER, P. Dose response of a new phytase on dry matter, calcium, and phosphorus digestibility in weaned piglets. **Journal of Animal Science**, v.90, p.245-247, 2012.
- BERGWITZ, C.; HÜPPNER, H.; Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D and FGF-23. **Annual Review of Medicine**, v.61, p.91-104, 2010.
- BLOMBERG, M.J.; NIELSEN, J.E.; JORGENSEN, A.; RAJPERT, E.M.; KRISTENSEN, D.M.; JORGENSEN N.; SKAKKEBAEK, N.E.; JUUL, A.; LEFFERS, H. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. **Human Reproduction**, n.25, v.5, p.1303-1311, 2010.
- CASTRO, L.C.G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, n. 55, v.8, p.566-575, 2011.
- DENCK, F.M.; HILGEMBERG, J.O.; LEHNEN, C.R. Uso de acidificantes em dietas para leitões em desmame e creche. **Archivos de Zootecnia**, v.66, n.256, p.629-238, 2017.
- DUFFY, S.K.; KELLY, A.K.; RAJAURIA, G.; CLARKE, L.C.; GATH, V.; MONAHAN, F.J.; O'DOHERTY, J.V. The effect of 25-hydroxyvitamin D3 and phytase inclusion on pig performance, bone parameters and pork quality in finisher pigs. **Journal of animal. Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n.5, p.1296-1305, 2018.
- FLOHR, J.R.; TOKACH, M.D.; DRITZ, S.S.; DEROUCHÉY, J.M.; GOODBAND, R.D.; NELSEN, J.L.; HENRY, S.C.; TOKASH, L.M.; POTTER, M.L.; GOFF, J.P.; KOSZEWSKI, N.J.; HORST, R.L.; HANSEN, E.L.; FRUGE, E.D. Effects of supplemental vitamin D3 on sérum 25-hydroxycholecalciferol and growth of preweaning and nursery pigs. **Journal of Animal Science**, v.92, p.152-163, 2014.
- GARCIA, A.F.Q.M.; MURAKAMI, A.E.; DUARTE, C.R.A.; ROJAS, I.C.O.; PICOLI, K.P.; PUZOTTI, M.M. Use of vitamin D3 and its metabolites in broiler chicken feed on performance, bone parameters and meat quality. **Asian-Australasian Journal of Animal Science** V. 26, n.3, p.408-415, 2013.
- GOLTZMAN, D.; HENDY, G.N.; WHITE, J.H. Vitamin D and its receptor during late development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1849, n.2, p.171-180, 2015.

- GONZÁLES-VEGA, J.C.; STEIN, H.H.; Calcium digestibility and metabolism in pigs. **Asian- Australasian Journal of Animal Science**, v.27, n.1, p.1-9, 2014.
- GONZÁLES-VEGA, J.C.; LIU, Y.; MCCANN, J.C.; WALK, C.L.; LOOR, J.J.; STEIN, H.H. Requirement for digestible calcium by eleven-to twenty-five- kilogram pigs as determined by growth performance, bone ash concentration, calcium and phosphorus balances, and expression of gene involved in transport of calcium in intestinal and kidney cells. **Journal of Animal Science**, v.94, p.3321-3334, 2016.
- GUGGENBUHL, P.; QUINTANA, A.P.; NUNES C.S. Comparative effects of three phytases on phosphorus and calcium digestibility in the growing pig. **Livestock Science**, v.109, p.258-260, 2007.
- HAUSSLER, M.R.; JURUTKA, P.W.; MIZWICKI, M.; NORMAN, A.W. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub>: genomic and non-genomic mechanism. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinol and Metabolism**, v.25, p.453-559, 2011.
- JAKOBSEN, J.; MARIBO, H.; BYSTED, A.; SOMMER, H.M.; HELS, O. 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> affects vitamin D status similar to vitamin D<sub>3</sub> in pigs- but the meat produce has a lower content of vitamin D. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 5, p.908-913, 2007.
- JAYARAMAN, B.; NYACHITY, C.M. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. **Animal Nutrition Journal**, v.3, n.3, p.205-211, 2017.
- JIANG, H.; WANG, J.; CHE, L.; LIN, Y.; FANG, Z.; Effects of calcium sources and levels on growth performance and calcium bioavailability in weaning piglets. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, n.4, p.613-621, 2013.
- MATHIS, G.; BOLAND, R.; BACHMANN, H.; TOGGENBURGER, A.; RAMBECK, W. Safety profile of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> of herbal origin in broiler chicken. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v.158, n.12, p.819-826, 2016.
- NELSON, C.D.; REINHARDT, T.A.; BEITZ, D.C.; LIPPOLIS, J.D.; In Vivo activation of the intracrine vitamin D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection. **PLoS ONE**, v.5, n. 11, e15469, 2010.
- PEKAS, J.C. Versatile swine laboratory apparatus for physiologic and metabolic studies. **Journal of Animal Science**, v. 2, p. 1303-1306, 1968.
- LARSEN, T.; FERNANDEZ, J.A.; ENGBERG, R.M. Bone turnover in growing pigs fed three levels of dietary calcium. **Journal of Animal Science**, v.80, p.547-557, 2000.
- O'DOHERTY, J.V.; GAHAN, D.A.; O'SHEA, C.; CALLAN, J.J.; PIERCE, K.M. Effects of phytase and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> inclusions on the performance, mineral balance and bone parameters of grower-finisher pigs fed low-phosphorus diets. **Animal**, v.4, n.10, p. 1634-1640, 2010.
- ODRIOZOLA, E.R.; RODRÍGUEZ, A.M.; MICHELOUD, J.F.; CANTÓN, G.J.; CAFFARENA, R.D.; GIMENO, E.J.; BODEGA, J.J.; GARDEY, P.; ISEAS, F.B.; GIANNITTI, F. Enzootic calcinosis in horses grazing *Solanum glaucophyllum* in Argentina. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.30, n.2, p. 286-289, 2018.
- RAMOS, A.C; MILANEZI, A.; COSTA, L.B.; MAITO, C.D.; MELO, A.D.B.; PASCOAL, A.F.L.; MAIORKA, A.; MACHADO JR, P.C.; MAZUTTI, K. Efeito da lincomicina como aditivo melhorado de desempenho sobre a incidência de diarreia e o desempenho de leitões na fase de creche. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 14, p.129-138, 2016.
- REBOUL, E.; GONÇALVES, A.; COMERA, C.; BOTT, R.; NOWICKI, M.; LANDRIER, J.F.; JOURDHEUIL-RAHMANI, D.; DUFOUR, C.; COLLET, X.;

- BOREL, P. Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: evidences for involvement of cholesterol transporters. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 55, n. 5, p.691-701, 2011.
- REGASSA, A.; ADHIKARI, R.; NYACHOTI, C.M.; KIM, W.K. Effects of 25-(OH)D<sub>3</sub> on fecal Ca and P excretion, bone mineralization, Ca and P transporter mRNA expression and performance in growing female pigs. **Journal of Environmental Science and Health**, v.50, n.4, p.293-299, 2015.
- ROSTAGNO, H.S.; **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4<sup>a</sup> Ed. Viçosa:UFV. 2017. 488p.
- SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos**. Jaboticabal-SP – FUNEP, p. 262, 2016.
- SALAS, E. Case report: Hypovitaminosis D in a swine herd. **In: Proceedings**. 52nd Ann, George A Young Swine Health and Management Conference, Sioux City, NE, p.1-5. 2011.
- SANTANA, A.L.A.; CARVALHO, P.L.O.; CRISTOFORI, E.C.; CHAMBO, P.C.S.; BARBIZAN, M.; NUNES, R.V.; GREGORY, C.R.; GENOVA, J.L.; Supplementation of pig diets in the growth and determination phases with different calcium sources. **Tropical Animal Health Production**, v.50, n.3, p.477-484, 2018.
- SAS. 2004. **SAS 9.1.2 for Microsoft Windows**. SAS International, Heidelberg, Germany.
- SCHLEGEL, P.; GUGGISBERG, D.; GUTZWILLER, A. Tolerance to 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> glycosides from *Solanum glaucophyllum* by the growing pig. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p.119-124, 2017.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3<sup>a</sup>ed.Viçosa: UFV, p. 235, 2009.
- TSIARAS, W.G.; WEINSTOCK, M.A. Factors influencing vitamin D status. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 91, n. 2, p.115-124, 2011.
- TOUSIGNANT, S.J.P.; HENRY, S.C.; ROVIRA, S.; MORRISON, R.B. Effect of oral vitamin D<sub>3</sub> supplementation on growth and serum 25-hydroxy vitamin D levels of pigs up to 7 weeks of age. **Journal of Swine Health and Production**, v. 21, n. 2, p. 94-98, 2013.
- VAN GREVENHOF, E.M.; HEUVEN, H.C.M.; VAN WEEREN, P.R.; BIJMA, P. The relationship between growth and osteochondrosis in specific joints in pigs. **Livestock Science**, v. 143, n. 1, p.85-90, 2012.
- VERSTUYF, A.; CARMELIET, G.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. **Kidney International**, v. 78, n. 2, p.140-145, 2010.
- WASSERMAN, R.H. Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. **Journal of Nutrition**, v.134, n.11, p.3137-3139, 2004.
- ZENG, Z.K.; WANG, D.; PIAO, X.S.; LI, P.F.; ZHANG, H.Y.; SHI, C.X.; YU, S.K. Effects of adding super dose phytase to the phosphorus-deficient diets of young pigs on growth performance, bone quality, minerals and amino acids digestibilities. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.27, n.2, p.237-246, 2014.
- ZIMMERMAN, D.R.; KOSZEWSKI, N.J.; HOY, D.A.; GOFF, J.P.; HORST, R.L. Targeted delivery of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to colon tissue and identification of a major 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> glycoside from *Solanum glaucophyllum* plant leaves. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.148, p.318-325, 2015.
- XU, R.J.; WANG, F.; ZHANG, S.H. Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors. **Livestock Production Science**, v.66, n. 2, p.95-107, 2000.

#### **4 USO DA 1,25-DIHIIDROXICOLECALCIFEROL GLICOSÍDEO NA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL OU TOTAL DO COLECALCIFEROL E SEUS EFEITOS SOBRE O PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS, PH DO TRATO GASTROINTESTINAL E MORFOMETRIA ÓSSEA DE LEITÕES**

##### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a suplementação de colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) e 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) na ração de leitões na fase de creche. Foram utilizados 128 leitões híbridos, machos inteiros, com aproximadamente 21 dias de idade e peso médio inicial de 6,82±0,38kg, distribuídos em delineamento em blocos, com oito repetições e quatro animais por unidade experimental. Foram utilizados quatro tratamentos, sendo 100/0 = 100% da exigência de vitamina D suplementada pelo colecalciferol (2707 UI na fase pré-inicial I, 2405 UI na fase pré-inicial II e 1969 UI na fase inicial); 50/50 = 50% da exigência suplementada pelo colecalciferol de acordo com cada fase de criação + 0,25 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; 25/75 = 25% da exigência de colecalciferol para cada fase + 0,375 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo e 0/100 = 0,50 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo. Ao final do período experimental foram abatidos 24 animais, seis repetições por cada tratamento. O pH do conteúdo do estômago e intestino foi mensurado logo após o abate. As carcaças foram evisceradas e coletados e pesados: o coração, fígado, rins, intestinos e baço para obtenção do peso relativo dos órgãos. Os ossos foram coletados para as análises de resistência óssea, densidade mineral óssea, comprimento do osso inteiro, altura da epífise, altura da diáfise, largura da epífise, largura da diáfise, largura da placa de crescimento e índice de Seedor. Os dados foram submetidos ao teste de Student e para avaliar a normalidade dos erros experimentais foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e de Levene. O efeito dos tratamentos foi avaliado pela ANCOVA e ANOVA e as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey a 5% e 10% de probabilidade. Nos resultados obtidos foram encontrados os efeitos para o peso relativo do baço (P=0,032) com redução do peso no tratamento 0/100 e efeito (P=0,048) para a concentração de fósforo no órgão. O coração apresentou efeito para a matéria seca (P=0,061) com a maior concentração no tratamento 100/0. O pH do estômago demonstrou um efeito (P=0,076) com redução do pH no tratamento 50/50, em contrapartida, apresentou os valores mais elevados de pH no jejuno (P=0,000) e íleo (P=0,002). A morfometria óssea dos metatarsos apresentou diferenças para largura da

epífise ( $P=0,013$ ), altura da diáfise ( $P=0,068$ ), largura da diáfise ( $P=0,049$ ) e no tamanho da placa de crescimento ( $P=0,002$ ). Verificou-se uma melhora no desenvolvimento ósseo pelo aumento de 0,7 mm na placa de crescimento e 6,6 mm na largura da diáfise dos ossos dos animais alimentados com a forma ativa da vitamina D. Houve a redução do peso relativo do baço em 25,4% no tratamento com a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  em relação ao tratamento com o colecalciferol. O tratamento 50/50 apresentou os maiores valores de pH intestinal comparado ao tratamento 0/100, que demonstrou redução de 4,7% no pH do jejuno e 7% no íleo. Neste contexto, a utilização da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo na suplementação de rações para os leitões se mostra eficiente na manutenção do pH estomacal e intestinal, bem como no desenvolvimento ósseo dos suínos. Além disso, diante dos resultados encontrados sugere-se que há um aumento na imunidade inata dos leitões pela redução no tamanho do baço, indicando pouca função deste órgão.

**PALAVRAS-CHAVE:** densidade mineral óssea, nutrição de suínos, vitamina D.

#### **4 USE OF 1,25-DIHYDROXICOLECALCIFEROL GLYCOSIDE IN THE PARTIAL OR TOTAL REPLACEMENT OF COLECALCIFEROL AND ITS EFFECTS ON THE RELATIVE WEIGHT OF ORGANS, PH OF THE GASTROINTESTINAL TRACT AND BONE MORPHOMETRY OF PIGLETS**

##### **ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate the supplementation of cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>) and 1,25-dihydroxycholecalciferol glycoside (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) in the diet of piglets in the nursery phase. 128 hybrid piglets, whole males, with approximately 21 days of age and average initial weight of  $6,82 \pm 0,38$ kg were used, distributed in a block design, with eight replicates and four animals per experimental unit (EU). Four treatments were used, with 100/0 = 100% of the vitamin D requirement supplemented by cholecalciferol (2707 IU in the pre-initial I phase, 2405 IU in the pre-initial II phase and 1969 IU in the initial phase); 50/50 = 50% of the requirement supplemented by cholecalciferol according to phase + 0,25 µg of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glycoside; 25/75 = 25% of the cholecalciferol requirement for each phase + 0,375 µg of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glycoside and 0/100 = 0,50 µg of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glycoside. At the end of the experimental period, 24 animals were slaughtered, six replicates for each treatment. The pH of the stomach and intestine contents was measured immediately after slaughter. The carcasses were eviscerated and the heart, liver, kidneys, intestines and spleen were collected and weighed to obtain the relative weight of the organs. The bones were collected for analysis of bone strength, bone mineral density, length of the whole bone, height of the epiphysis, height of the diaphysis, width of the epiphysis, width of the diaphysis, width of the growth plate and Seedor index. The data were submitted to the Student test and to assess the normality of the experimental errors, the Shapiro-Wilk and Levene tests were used. The effect of the treatments was evaluated by ANCOVA and ANOVA and the averages were evaluated by the Tukey test at 5% and 10% probability. In the results obtained, effects were found for the relative weight of the spleen (P=0,032) with reduced weight in the 0/100 treatment and effect (P=0,048) for the phosphorus concentration in the organ. The heart showed an effect for dry matter (P=0,061), with the highest concentration in the 100/0 treatment. The pH of the stomach showed an effect (P=0,076), with a reduction in pH in the 50/50 treatment, in contrast, it presented the highest pH values in the jejunum (P=0,000) and ileum (P=0,002). Bone

morphometry of metatarsals showed differences for epiphysis width ( $P=0,013$ ), diaphysis height ( $P=0,068$ ), diaphysis width ( $P=0,049$ ) and the size of the growth plate ( $P=0,002$ ). There was an improvement in bone development by an increase of 0,7 mm in the growth plate and 6,6 mm in the width of the diaphysis of the bones of animals fed with the active form of vitamin D. There was a reduction in the relative weight of the spleen in 25,4% in the treatment with  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in relation to the treatment with cholecalciferol. The 50/50 treatment showed the highest intestinal pH values compared to the 0/100 treatment, which showed a 4,7% reduction in the pH of the jejunum and 7% in the ileum. In this context, the use of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glycoside in the supplementation of feed for piglets is efficient in maintaining stomach and intestinal pH, as well as in bone development of pigs. Furthermore, in view of the results found, it is suggested that there is an increase in piglet innate immunity due to the reduction in the size of the spleen, indicating little function of this organ.

**KEYWORDS:** bone mineral density, pig nutrition, vitamin D.

## 4.1 Introdução

O sistema metabólico da vitamina D é conhecido principalmente por ser essencial para a homeostase mineral e metabolismo ósseo. O calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) aumenta a absorção, reabsorção renal e intestinal de cálcio (Ca) e fósforo (P). Estes efeitos são mediados pelo VDR (receptor da vitamina D) e regulam a expressão de vários genes pela ligação com o elemento responsivo da vitamina D (VDRE) (BERGWITZ e JÜPPNER, 2010; HAUSSLER et al., 2011).

Dentre as suas funções não calcêmicas, a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  apresenta a capacidade de regular tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, potencializando a resposta inata (monócitos/macrófagos) e suprimindo a imunidade adaptativa (funções dos linfócitos B e T). A resposta inata promove a primeira linha de defesa contra patógenos e aumenta a resistência contra infecções agudas. A produção intrácina de vitamina D pelas células do sistema imune na presença da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase estimula a síntese de peptídeos antimicrobianos como, por exemplo, as catelicidinas, que contribuem para a defesa inicial contra patógenos e para a destruição bacteriana (CANTORNA, 2010; WHITE, 2010).

Os segmentos do trato gastrointestinal como, por exemplo, estômago, ceco e cólon apresentam menor relevância na absorção do cálcio, mais de 90% da absorção de cálcio diário ocorre no intestino delgado, principalmente nas partes proximais duodeno e jejuno (SCHRÖDER & BREVES, 2006).

A absorção intestinal de Ca é estreitamente regulada pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e pode ocorrer por transporte ativo pela via transcelular ou transporte passivo pela via paracelular. A absorção do Ca é afetada pela biodisponibilidade do Ca dietético e pela exigência fisiológica deste mineral, ou seja, uma dieta com baixa concentração de Ca promoverá o aumento na absorção intestinal por meio do aumento da conversão da vitamina D na sua forma ativa (PEREZ et al., 2008; BRONNER, 2003; WASSERMAN, 2004).

Este processo foi comprovado em trabalhos semelhantes de Li et al. (2014) e Ganzáles-Vega et al. (2016), no qual leitões foram alimentados com dietas contendo baixas concentrações de cálcio e fósforo e apresentaram a capacidade de regular a expressão gênica de transportadores de cálcio na membrana basolateral do intestino, como a calbindina, aumentando a sua expressão com a intenção de maximizar a

absorção de cálcio disponível. O inverso também pode ser constatado, quando os animais são alimentados com grandes concentrações de cálcio há uma redução nos transportadores deste mineral, isto se dá pelo aumento do transporte via paracelular.

A maior parte do Ca e P está armazenada nos ossos sob a forma de cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). A formação da hidroxiapatita, a regulação e deposição dos minerais nos ossos são reguladas pelas proteínas ligadoras de Ca e P, como a fosfatase alcalina e a osteocalcina (VAN RIET et al., 2013).

A domesticação e o confinamento dos animais junto ao melhoramento genético com a finalidade de aumento da massa muscular reduziram a função do sistema locomotor na sobrevivência dos suínos. A seleção genética para as características de produção pode ter resultado em uma seleção não intencional, como a predisposição à ocorrência de osteocondrose em suínos (ETTERLIN et al., 2017).

As plantas da família *Solanaceae* apresentam em sua composição um glicosídeo análogo à  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Este glicosídeo é quebrado por bactérias com atividade  $\beta$ -glicosidase presentes no cólon de animais monogástricos para, posteriormente, ser absorvido. Através da planta *Solanum glaucophyllum* este metabólito é extraído e pode ser utilizado como forma de suplementação da vitamina D. A principal diferença farmacocinética entre a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo e a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sintética é a velocidade de absorção, visto que a forma glicosídica precisa ser quebrada para ser absorvida, isto faz com que ocorra um retardo na absorção e um menor pico plasmático metabólico e, conseqüentemente, meia-vida biológica maior, apresentando menor risco de toxicidade (ZIMMERMAN et al., 2015; MATHIS et al., 2016).

Entretanto, quando utilizada apenas a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo na alimentação de animais de produção, como demonstrado por Alves et al. (2018), na substituição parcial e total do colecalciferol em frangos de corte, não foram encontradas diferenças no que tange ao desenvolvimento ósseo entre a utilização exclusiva do colecalciferol e  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo como fonte única. Diante disto, os melhores resultados foram encontrados quando utilizada a substituição parcial com as duas formas de vitamina D.

Resultados semelhantes foram encontrados por Schlegel et al. (2017) em suínos na fase de creche, onde o tratamento com alto nível de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo afetou o metabolismo ósseo com a redução da resistência óssea e a redução da concentração de matéria mineral dos ossos.

Diante do exposto, a vitamina D apresenta a capacidade de regular o desenvolvimento ósseo através das funções osteominerais, mineralização óssea e

resistência, melhorando a utilização dos minerais pelo organismo. Além disso, a ligação do calcitriol com o receptor da vitamina D (VDR) potencializa a resposta imunitária inata. Dessa forma, há um aumento da linha de defesa do organismo contra os agentes patogênicos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a suplementação de duas formas de vitamina D, o colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) e a 1,25-dihidroxicolecalciferol glicosídeo (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), sozinhas ou combinadas, na alimentação de leitões na fase de creche, além de averiguar os seus efeitos sobre o peso relativo de órgãos, pH do conteúdo gastrointestinal e morfometria óssea.

#### **4.2 Materiais e métodos**

O experimento foi conduzido na fazenda experimental Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Marechal Cândido Rondon, no período entre outubro de 2017 e março de 2018, seguindo os regulamentos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIOESTE (Protocolo nº 16/19).

A temperatura e umidade relativa do ar foram mensuradas com *datalogger*, sendo que durante o período experimental a temperatura variou entre 19,5°C a 33,1°C com média de 26,2°C e 30% a 99% de umidade relativa do ar.

Foram utilizados 128 leitões híbridos, machos inteiros, com aproximadamente 21 dias de idade e peso médio inicial de 6,82±0,38kg, distribuídos em um delineamento em blocos casualizados, com oito repetições e quatro animais por unidade experimental, totalizando 32 animais por tratamento. Os blocos foram formados com base no peso inicial individual dos animais e, no momento da chegada, os mesmos receberam identificação por meio de brincos. Os animais foram alojados em baias de creche suspensas, providas de comedouros frontais e bebedouros tipo chupeta. As janelas do lado leste e sudeste da instalação receberam lonas pretas para evitar a entrada da radiação solar.

As dietas foram formuladas para atenderem às exigências nutricionais, seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2017). O complexo vitamínico foi isento de vitamina D (Tabela 1).

Tabela 1. Composição centesimal e química das rações, contendo diferentes inclusões da vitamina D para leitões em diferentes fases de crescimento

Ingrediente	Fases de Crescimento		
	Pré-inicial I	Pré-inicial II	Inicial
Milho, 7,5%	49,880	55,510	57,850
Farelo de soja, 45%	17,470	19,900	30,520
Conc. proteico de soro <sup>1</sup>	11,360	8,000	-
Leite em pó integral	4,000	-	-
Soja micronizada	8,000	8,000	4,000
Açúcar	4,000	3,000	2,000
Óleo de soja <sup>2</sup>	1,530	2,010	2,420
Fosfato monocálcico 21%	1,350	1,550	1,690
Calcário, 37%	0,190	0,370	0,400
Sal Comum	0,470	0,500	0,480
Ácido Cítrico	0,400	-	-
L-lisina, 78%	0,400	0,420	0,190
L-treonina, 98%	0,140	0,140	0,030
L-triptofano, 98%	0,080	0,080	0,040
DL-metionina, 99%	0,180	0,170	0,090
Premix <sup>3,4</sup>	0,200	0,200	0,200
Aditivo <sup>5</sup>	0,200	-	-
Colistina, 8%	0,150	0,150	0,050
Sulfato de cobre, 25%	-	-	0,040
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Composição Calculada</b>			
EM (kcal/kg)	3,500	3,450	3,400
Cálcio (%)	0,500	0,550	0,550
Fósforo disponível (%)	0,450	0,450	0,450
Lisina digestível (%)	1,160	1,150	1,100
Metionina + Cistina digestível (%)	0,680	0,680	0,670
Treonina digestível (%)	0,730	0,720	0,690
Sódio (%)	0,300	0,270	0,210
Lactose (%)	10,000	6,000	-
<b>Composição Analisada</b>			
MS (%)	95,1535	95,2738	95,4118
PB (% MS)	19,8355	19,9085	22,4460
MM (% MS)	4,4855	4,4177	4,7410

<sup>1</sup> Concentrado proteico de soro de leite em pó; <sup>2</sup> Óleo vegetal refinado: Pré Inicial I; óleo vegetal degomado: Pré Inicial 2 e Inicial. <sup>3</sup> Premix vitamínico e mineral pré inicial I e II: Vitamina A (mín.) 3.850.000 UI/kg; vitamina E (mín.) 22.400 UI/Kg; vitamina K3 (mín.) 1.680 UI/kg; vitamina B1 (mín.) 560 mg/kg; vitamina B2 (mín.) 1.750 mg/kg; vitamina B6 (mín.) 1.120 mg/kg; vitamina B12 (mín.) 11.000 mcg/kg; niacina (mín.) 17g/Kg; ácido pantotênico (mín.) 8.400 mg/kg; ácido fólico (mín.) 168 mg/kg; biotina (mín.) 56 mg/kg; colina (mín.) 112 g/kg; manganês (mín.) 22,50 g/kg; zinco (mín.) 61,50 g/kg; ferro (mín.) 45 g/kg; cobre (mín.) 6.700 mg/kg; iodo (mín.) 560 mg/kg; selênio (mín.) 205 mg/kg. <sup>4</sup> Premix fase Inicial: Vitamina A (mín.) 3.437.500 UI/kg; vitamina E (mín.) 20.000 UI/Kg; vitamina K3 (mín.) 1.500 UI/kg; vitamina B1 (mín.) 500 mg/kg; vitamina B2 (mín.) 1.565 mg/kg; vitamina B6 (mín.) 1.000 mg/kg; vitamina B12 (mín.) 10.000 mcg/kg; niacina (mín.) 15g/Kg; ácido pantotênico (mín.) 7.500 mg/kg; ácido fólico (mín.) 150 mg/kg; biotina (mín.) 50 mg/kg; colina (mín.) 100 g/kg; manganês (mín.) 20 g/kg; zinco (mín.) 55 g/kg; ferro (mín.) 40 g/kg; cobre (mín.) 6.000 mg/kg; iodo (mín.) 500 mg/kg; selênio (mín.) 180 mg/kg. <sup>5</sup> Aditivo nutricional fonte de nucleotídeos livres e purificados.

Foram elaborados quatro tratamentos experimentais atendendo às exigências nutricionais recomendadas por Rostagno et al. (2017), com diferentes formas de inclusão *on top* da vitamina D utilizando o colecalciferol e a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo. As fontes de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo utilizadas foram as folhas secas da planta *Solanum glaucophyllum* (Panbonis®, Herbonis Animal Health), que fornecem 10 mg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> por kg de produto, segundo determinação analítica. A recomendação para utilização do produto foi de 50 g t<sup>-1</sup>, que equivale a 0,5 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> por kg de ração. Os tratamentos consistiram em: 100/0 = 100% da exigência de vitamina D suplementada pelo colecalciferol (2707 UI na fase pré-inicial I, 2405 UI na fase pré-inicial II e 1969 UI na fase inicial); 50/50 = 50% da exigência suplementada pelo colecalciferol de acordo com cada fase de criação + 0,25 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; 25/75 = 25% da exigência de colecalciferol para cada fase + 0,375 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo e 0/100 = 0,50 µg de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo.

Ao final do período experimental foram selecionados 24 animais para o abate, sendo seis repetições por cada tratamento. Os animais passaram por um jejum alimentar de 12 horas para posterior abate, seguindo as normas de abate humanitário (BRASIL, 2000). O pH do conteúdo do estômago e intestino foi mensurado *in loco* através de peagâmetro digital logo após o abate. As carcaças foram evisceradas e coletados e pesados: o coração, fígado, rins, intestinos e baço para obtenção do peso relativo dos órgãos em função do peso corporal vivo (% PCV) pela equação:

$$\text{Peso relativo} = (\text{peso órgão/peso vivo}) \times 100$$

As pernas foram coletadas após o abate, acondicionadas em sacos identificados e armazenadas em freezer. As amostras foram autoclavadas a 120 graus e 1 atm durante 10 minutos para remoção da carne conforme a metodologia adaptada de Carter et al. (1996), os ossos limpos foram congelados novamente. O terceiro metacarpo direito foi enviado para análise de densidade óssea na UNESP – Jaboticabal, utilizando o equipamento Hologic Discovery Wi<sup>®</sup> software modo *small animal* e resistência óssea realizado em Máquina Universal de Ensaio Mecânicos (Marca EMIC, modelo DL 10.000, com célula carga-EMIC de 200 KgF). Os dados coletados por computador diretamente acoplado à máquina são expressos em Newton (N) e depois transformados para quilograma-força por centímetro quadrado (kgf/cm<sup>2</sup>).

O segundo metacarpo direito foi utilizado para confecção de lâminas, sendo primeiramente descalcificado com solução de ácido fórmico (50%) e citrato de sódio (20%) durante 25 dias. Deste modo, as lâminas foram confeccionadas, coradas com hematoxilina e eosina, além de fotomicrografadas em microscópio óptico com câmera embutida e as medidas das placas de crescimento foram tomadas utilizando o software de análise de imagens ImagePro Plus.

O terceiro metatarso foi utilizado para as medidas morfológicas externas, para isso, os ossos foram medidos com o auxílio de paquímetro digital. Foram realizadas medidas do osso inteiro (epífise à epífise), comprimento da epífise (ponta da epífise até a placa de crescimento), largura da epífise (meio da epífise), largura da diáfise (meio do osso). O peso foi mensurado utilizando balança semi-analítica. O índice de Seedor foi calculado dividindo o peso do osso em miligramas pelo seu comprimento em milímetros (SEEDOR et al., 1991).

O segundo e terceiro metacarpos esquerdos foram secos em estufa a 65 graus por 72 horas e, posteriormente, desengordurados, utilizando éter de petróleo durante quatro dias. Vale ressaltar que o éter foi trocado no segundo dia. Após a remoção do éter, os ossos foram secos por 24h em estufa a 65 °C, em seguida, moídos em moinho bola para realizar as análises de matéria seca em estufa a 105 graus e matéria mineral utilizando o forno tipo mufla a 600 °C durante quatro horas.

Antes de avaliar o resultado da análise de covariância (ANCOVA) e variância (ANOVA), foi procedida a análise dos resíduos padronizados de *Student*, a fim de diagnosticar *outliers*. O critério adotado para identificação de *outliers* foi baseado na curva de distribuição normal, ou seja, valores maiores ou iguais a três desvios-padrão, em valor absoluto, foram considerados como influentes. A normalidade dos erros experimentais e a homogeneidade de variâncias entre os tratamentos para as diversas variáveis foram avaliadas previamente utilizando os testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente.

Para as características de peso relativo de órgãos e morfometria óssea, o modelo estatístico utilizado foi:  $Y_{ijk} = m + T_i + b_j + \beta (X_{ijk} - \bar{X}_{...}) + \varepsilon_{ijk}$ . Os efeitos dos fatores incluídos no modelo foram descritos por:  $Y_{ijk}$  = observação média da variável dependente em cada parcela, medida na i-ésima classe de tratamento; no j-ésimo bloco e na k-ésima repetição;  $m$  = efeito da média geral;  $T_i$  = efeito das classes de tratamento, para  $i = (1, 2, 3 \text{ e } 4)$ ;  $b_j$  = efeito de bloco, para  $j = (1 \text{ e } 2)$ ;  $\beta$  = coeficiente de regressão de  $Y$  sobre  $X$ ;  $X_{ijk}$  = observação média da covariável (peso de órgãos digestórios e não

digestórios, além de morfometria óssea usando como covariável o peso de abate dos animais) em cada parcela, medida na  $i$ -ésima classe de tratamento, no  $j$ -ésimo bloco e na  $k$ -ésima repetição;  $\bar{X}_{...}$  = média geral para a covariável  $X$ ;  $\varepsilon_{ijk}$  = erro aleatório da parcela associado ao nível  $i$ , bloco  $j$  e repetição  $k$ . Para as características de pH do conteúdo do trato digestório, composição química dos órgãos e resistência e densidade óssea, o modelo estatístico utilizado foi o mencionado anteriormente, sem incluir o efeito de covariável.

Os efeitos de tratamento experimental sobre as variáveis dependentes foram verificados por meio da ANCOVA e ANOVA. Comparações entre médias de tratamentos foram realizadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% a 10% de probabilidade. O erro  $\beta$  dos parâmetros foi utilizado para ajudar a explicar os valores de  $p$  de 5 a 10% de probabilidade. Este procedimento foi realizado usando o poder do teste  $(1-\beta)$  do pacote R.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os procedimentos do software estatístico “*Statistical Analysis System*” (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Todos os dados foram apresentados como médias com erro padrão da média.

#### **4.3 Resultados e discussões**

O peso relativo dos órgãos digestórios e não digestórios (Tabela 2) mostram que o baço apresentou diferença entre os tratamentos ( $P=0,032$ ) com uma redução em 25,4% no seu peso quando foi utilizada a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo. Essa redução no peso do baço pode ter relação com o efeito do receptor da vitamina D (VDR) presente nas células do sistema imune relacionadas a este órgão, que são suprimidas pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , evitando uma excessiva resposta pelo sistema imune e dano tecidual associado (HEWISON, 2012).

Os demais órgãos não demonstraram efeitos dos tratamentos sobre o seu peso e também no comprimento do intestino delgado. O maior peso relativo do baço no tratamento 100/0 pode estar associado a um estímulo no sistema imunitário de leitões. As células imunitárias, como macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células apresentadoras de antígenos, produzem a enzima 1alfa-hidroxilase. Esta enzima é estimulada pela ativação de receptores toll-like (RTL), que são ativados quando

reconhecem padrões moleculares típicos de microrganismos patogênicos como peptidoglicanos, lipopolissacarídeos e lipopeptídeos. A ativação da resposta imunitária mediada pela vitamina D se dá pela conversão da 25(OH)D<sub>3</sub> em 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> no citosol dos macrófagos, deste modo, se o nível de calcidiol for baixo, a resposta pode ser comprometida (NELSON et al., 2010; ANDRADE et al. 2011).

Tabela 2. Peso relativo dos órgãos digestórios e não digestórios de leitões alimentados com diferentes formas e inclusões da vitamina D

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>				Média	EPM	P-value
	100/0	50/50	25/75	0/100			
Coração,%	0,514	0,565	0,535	0,512	0,531	0,011	0,135
Rins,%	0,558	0,582	0,554	0,545	0,559	0,013	0,367
Fígado + vesícula <sup>2</sup> , %	3,106	2,977	3,070	2,978	3,032	0,066	0,797
Estômago vazio, %	0,837	0,829	0,792	0,756	0,803	0,029	0,523
Baço,%	0,228 <sup>a</sup>	0,187 <sup>ab</sup>	0,189 <sup>ab</sup>	0,170 <sup>b</sup>	0,193	0,007	0,032
ID vazio e pâncreas <sup>3</sup> , %	3,970	3,505	3,321	4,207	3,750	0,184	0,354
Intestino grosso,%	2,809	2,569	2,963	2,578	2,729	0,131	0,725
ID vazio (m)	12,800	13,356	12,250	12,583	12,747	0,284	0,713

\*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na linha, diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Dietas experimentais – 100/0 = 100% colecalciferol; 50/50 = 50% colecalciferol + 50% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; 25/75 = 25% colecalciferol + 75% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; 0/100 = 100% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo;

<sup>2</sup>Fígado + vesícula biliar;

<sup>3</sup>ID= Intestino delgado vazio e pâncreas.

Conforme a imunidade adaptativa é suprimida pela 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, há redução na atividade das células imunitárias e a produção de linfócitos pelo baço é reduzida e, com isso, pode ocorrer atrofia ou redução do tamanho do órgão, como encontrado no tratamento 0/100, quando utilizado apenas a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo. Apesar da diferença encontrada nos pesos relativos do baço, os mesmos se encontram dentro da faixa de normalidade encontrada na literatura para suínos nesta fase (POZZA et al., 2010; ANDRADE et al., 2011).

A conversão da 25(OH)D<sub>3</sub> em 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pela 1 $\alpha$ -hidroxilase ocorre em queratinócitos e monócitos pela mediação dos receptores toll-like (RTL). Na presença de infecções, a ativação destes receptores causa um aumento na expressão da CYP27B1 (enzima 1 $\alpha$ -amilase), resultando em conversão da vitamina D ativa com liberação da catelicidina, um peptídeo antimicrobiano (LIU et al., 2006; HATA et al., 2008). Portanto, entende-se que há a necessidade de ocorrer a conversão da vitamina D, do calcidiol para calcitriol, para que os efeitos imunológicos ocorram e quando fornecido apenas a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo na alimentação, verificou-se que ocorre pouca ou

nenhuma conversão da vitamina D proveniente da dieta, resultando em menor tamanho do baço, como encontrado no tratamento 0/100.

Na composição físico-química, o baço também apresentou efeito ( $P=0,048$ ) para a concentração de fósforo no órgão (Tabela 3). O coração apresentou efeito para a matéria seca ( $P=0,061$ ) com a maior concentração de MS no tratamento 100/0 (100% colecalciferol) e a menor no tratamento 50/50 (50% colecalciferol e 50%  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo).

Os valores semelhantes para as variáveis analisadas nos órgãos demonstraram um equilíbrio mineral no organismo dos animais, independente da forma em que se utilizou a vitamina D, os níveis de matéria mineral, cálcio e fósforo não alteraram, com exceção do fósforo no baço. Esta homeostasia mineral demonstra um controle regulado na produção, inativação da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e controle no metabolismo destes minerais.

Tabela 3. Composição físico-química de órgãos de leitões alimentados com substituição parcial ou total do colecalciferol pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>				Média	EPM	P-value
	100/0	50/50	25/75	0/100			
Matéria seca (%)							
Coração	20,308 <sup>a</sup>	19,008 <sup>b</sup>	19,617 <sup>ab</sup>	19,420 <sup>ab</sup>	19,588	0,175	0,061
Baço	19,103	19,235	18,936	18,888	19,040	0,108	0,699
Rins	17,478	17,723	17,111	17,453	17,441	0,147	0,570
Fígado	26,247	25,770	26,568	25,831	26,104	0,230	0,643
Matéria mineral (%)							
Coração	12,070	12,423	11,250	8,577	11,080	0,721	0,245
Baço	11,100	13,511	10,115	10,513	11,309	0,674	0,315
Rins	10,067	9,707	9,131	8,758	9,415	0,306	0,482
Fígado	12,460	10,684	9,535	12,816	11,373	0,818	0,344
Ossos	48,315	49,037	48,825	47,952	48,532	0,393	0,721
Cálcio (g/kg)							
Coração	1,075	0,900	0,833	0,900	0,927	0,051	0,363
Baço	0,708	0,820	0,966	0,933	0,856	0,059	0,451
Rins	0,900	0,833	0,908	1,091	0,933	0,043	0,194
Fígado	0,700	0,783	0,750	0,812	0,761	0,037	0,796
Ossos	167,100	159,367	157,133	159,900	160,875	2,954	0,666
Fósforo (g/kg)							
Coração	53,878	59,186	54,159	59,255	56,619	1,179	0,198
Baço	66,647 <sup>b</sup>	75,546 <sup>ab</sup>	77,033 <sup>a</sup>	66,512 <sup>b</sup>	71,434	1,765	0,048
Rins	74,490	75,712	76,305	77,702	76,052	0,962	0,702
Fígado	73,628	76,886	75,051	75,692	75,314	1,005	0,729
Ossos	216,409	215,691	216,506	216,540	216,286	0,167	0,232

\*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na linha, diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 10% de probabilidade.

<sup>1</sup>Dieta experimental -100/0 = 100% colecalciferol; 50/50 = 50% colecalciferol + 50%  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo; 25/75 = 25% colecalciferol + 75%  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo; 0/100 = 100%  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo.

O baço é um dos órgãos com maior concentração de fósforo em sua composição, assim como o cérebro, fígado e músculos. A absorção deste mineral pode variar em função da idade do animal, estrutura molecular, relação cálcio, fósforo, pH intestinal, níveis dietéticos, entre outros. Não há atividade conhecida da vitamina D sobre a deposição deste mineral no baço, portanto, a diferença na concentração de fósforo ocorrida neste órgão pode ter sido causada por diversos fatores, visto que o fósforo é um dos elementos mais abundantes no organismo, utilizado em diversas reações metabólicas e como fonte de energia (GEORGIEVSKII, 1982; TEIXEIRA et al., 2004; STEIN et al., 2011).

A maior concentração de cálcio e fósforo nos ossos em comparação aos órgãos significa que os animais foram bem suplementados com estes minerais em todos os tratamentos, com formação de hidroxiapatita nos ossos como forma de reserva mineral. O fósforo está presente em muitos tecidos corporais e a incorporação deste mineral nos tecidos e órgãos pode variar e depende da taxa de renovação e fase de crescimento do animal. A troca nos tecidos diminui com a idade e aumenta em períodos reprodutivos com trocas mais intensas entre o osso e a corrente sanguínea (FIGUEIREDO et al., 2001; MOREIRA et al., 2004).

Em estudo realizado por Witschi et al. (2011), o metabólito  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  foi utilizado na alimentação de leitões em fase de creche e comparado ao colecalciferol não foram encontradas diferenças nos teores de cálcio e fósforo dos ossos, bem como na matéria mineral entre os tratamentos utilizando as duas formas de vitamina D. Os autores encontraram a média de valores de MM no osso de 37,56%, enquanto que no presente trabalho valores superiores foram encontrados com média de 48,53%.

O teor de fósforo mensurado no osso foi superior ao cálcio, o que não é encontrado na literatura, visto que a necessidade de cálcio no osso é superior ao fosfato pela constituição da hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), ou seja, são necessárias dez moléculas de cálcio e seis de fosfato para a sua formação. Resultados encontrados na literatura demonstram uma relação Ca:P nos ossos em torno de 2,2:1, corroborando com o valor necessário para a formação da hidroxiapatita, ao contrário, no presente trabalho a relação Ca:P encontrada pela média dos tratamentos foi de 1:1,3 (O'DOHERTY et al., 2010; ZHOU et al., 2016; DUFFY et al., 2018).

O pH do estômago (Tabela 4) demonstrou um efeito ( $P=0,076$ ) com redução de 43,8% do pH no tratamento 50/50, em que foi utilizada 50% da exigência de colecalciferol e 50% da recomendação de utilização da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  quando comparado

ao tratamento 0/100 que apresentou o maior pH estomacal. O tratamento 25/75 foi semelhante tanto ao 50/50 quanto aos demais tratamentos, que apresentaram valores de pH elevados.

O pH do estômago é importante para iniciar o processo de digestão, formar barreira contra patógenos e manter um ambiente adequado para a ativação de enzimas, como a pepsina, responsável pela digestão de proteínas. O pH ideal para que estas funções sejam executadas é entre 2,0 e 3,5, sendo que valores muito elevados podem contribuir para a proliferação de bactérias, como a *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* (CHAMONE et al., 2010).

Os valores de pH do estômago oscilaram consideravelmente entre os tratamentos (P=0,076) com valores entre 1,80 a 3,37. O baixo pH favorece a ação da pepsina no estômago, bem como a dissociação de compostos formados pelo cálcio, liberando os íons  $\text{Ca}^{2+}$  para a absorção intestinal. A maior parte da absorção de cálcio ocorre no intestino delgado, principalmente no duodeno e jejuno (SCHRÖDER & BREVES, 2006; CORASSA et al., 2012). O menor pH do jejuno (P=0,000) para o tratamento com a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo pode ter favorecido a absorção de cálcio neste local.

Tabela 4. Valores de pH do conteúdo gastrointestinal de leitões alimentados com substituição parcial ou total do colecalciferol pela  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>				Média	EPM	P-value	1-β (%) <sup>2</sup>
	100/0	50/50	25/75	0/100				
Estômago	3,305 <sup>a</sup>	1,891 <sup>b</sup>	2,718 <sup>ab</sup>	3,370 <sup>a</sup>	2,821	0,244	0,076	72,683
Duodeno	5,230	6,008	4,893	5,185	5,329	0,214	0,240	46,468
Jejuno	6,601 <sup>ab</sup>	6,691 <sup>a</sup>	6,420 <sup>bc</sup>	6,376 <sup>c</sup>	6,522	0,035	0,000	99,885
Íleo	6,531 <sup>a</sup>	6,685 <sup>a</sup>	6,550 <sup>a</sup>	6,073 <sup>b</sup>	6,459	0,069	0,002	99,391
Ceco	5,633	5,615	5,695	5,476	5,604	0,069	0,766	14,101
Cólon	5,636	5,965	5,816	5,648	5,766	0,063	0,233	47,438

\*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na linha, diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 10% de probabilidade.

<sup>1</sup>Dietas experimentais – 100/0 = 100% colecalciferol; 50/50 = 50% colecalciferol + 50%  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo; 25/75 = 25% colecalciferol + 75%  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo; 0/100 = 100%  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo.

<sup>2</sup>1-β (%) = Poder do teste estatístico considerando alfa = 5%.

Em leitões recém-nascidos o principal acidificante estomacal é o ácido láctico produzido pela fermentação da lactose. A produção de ácido clorídrico (HCl) cresce gradualmente a partir da quarta até a oitava semana de vida. Entretanto, a sua eficiência não está no seu potencial máximo, ocasionando um pH superior ao desejado, por isso, há a necessidade de uso de acidificantes na dieta de leitões (DENCK et al., 2017).

O uso do ácido cítrico como acidificante na dieta experimental da fase Pré-Inicial I pode ter provocado o aumento na produção de HCl com consequente redução

no pH estomacal até o final do experimento. Nesse mesmo sentido, Fernandes e Miranda (2013) utilizando o concentrado de soro de leite em pó, encontraram aumento na produção de ácidos orgânicos como, por exemplo, o láctico, propiônico, acético e butírico. Os menores valores de pH foram encontrados nos tratamentos com a combinação das duas formas de vitamina D, o colecalciferol e a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo.

O inverso foi encontrado no jejuno ( $P=0,000$ ) e íleo ( $P=0,002$ ), onde o tratamento 50/50 apresentou o maior valor de pH comparado ao tratamento 0/100, que demonstrou redução de 4,7% no pH do jejuno e 7% no íleo, sugerindo uma melhora na digestibilidade e absorção do cálcio no tratamento com a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo. O pH aumenta ao longo do trato gastrointestinal pela ausência de HCl e pela secreção pancreática formada pelas enzimas tripsina e quimotripsina, que respondem à acidificação pelo aumento na secreção e consequente melhora na digestibilidade de aminoácidos (CORASSA et al., 2012).

Com relação às variáveis de morfometria óssea dos metatarsos (Tabela 5), foi possível verificar que elas apresentaram diferenças para as variáveis de largura da epífise ( $P=0,013$ ), altura da diáfise ( $P=0,068$ ), largura da diáfise ( $P=0,049$ ) e no tamanho da placa de crescimento ( $P=0,002$ ).

Em suínos, as lesões da osteocondrose são mais comumente encontradas no úmero e no fêmur, mas também podem ocorrer nas articulações do ombro, quadril, ísquio, articulações vertebrais e nas junções costocodrais das costelas. Estas lesões podem ser observadas em análises histológicas de leitões com dois meses de idade, porém, estes animais só irão demonstrar a chamada “fraqueza das pernas” quando atingirem maior peso (YTREHUS et al., 2007). O presente trabalho não teve como objetivo avaliar a incidência de osteocondrose, porém o melhor desenvolvimento ósseo pode contribuir para a redução destes problemas.

A morfometria óssea mostrou que, com a utilização exclusiva da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo, houve maior largura da diáfise ( $P=0,049$ ), porém reduziu seu comprimento ( $P=0,068$ ) e o inverso foi encontrado no tratamento com o colecalciferol. Entretanto, a altura da epífise não se mostrou diferente, contudo, a largura da epífise ( $P=0,013$ ) foi menor com a utilização do colecalciferol. Durante a formação do osso há o crescimento através da zona de proliferação de condrócitos na placa de crescimento, essa multiplicação de condrócitos é que confere o aumento do tamanho do osso em comprimento (WONGDEE et al., 2012). Apesar da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo ter

apresentado o menor comprimento da diáfise, no comprimento total do osso não houve diferença entre os tratamentos e o tratamento com o glicosídeo teve a maior placa de crescimento.

Tabela 5. Morfometria óssea de metatarsos e metacarpos de leitões alimentados com substituição parcial ou total do colecalciferol pela 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>				Média	EPM	P-value
	100/0	50/50	25/75	0/100			
Morfometria óssea (mm)							
Altura epífise	20,465	25,988	20,938	25,628	23,254	1,326	0,292
Largura epífise	17,843 <sup>b</sup>	27,047 <sup>a</sup>	19,063 <sup>ab</sup>	25,063 <sup>ab</sup>	22,239	1,256	0,013
Altura diáfise	41,122 <sup>a</sup>	37,930 <sup>b</sup>	39,525 <sup>ab</sup>	37,237 <sup>b</sup>	38,953	0,557	0,068
Largura diáfise	15,778 <sup>b</sup>	22,605 <sup>a</sup>	16,493 <sup>ab</sup>	22,412 <sup>a</sup>	19,322	1,166	0,049
Comp. total	61,587	65,260	60,463	64,337	62,911	1,455	0,608
Placa de cresc.	6,841 <sup>ab</sup>	5,810 <sup>bc</sup>	5,155 <sup>c</sup>	7,564 <sup>a</sup>	6,342	0,277	0,002
Peso úmido, g	9,435	9,770	10,173	10,545	9,980	0,491	0,554
Resistência e densidade óssea							
Área, cm <sup>2</sup>	4,911	5,072	5,075	4,893	4,987	0,132	0,945
CMO, g	0,835	0,912	0,918	0,798	0,865	0,031	0,507
DMO, g/cm <sup>2</sup>	0,169	0,178	0,181	0,164	0,173	0,003	0,353
Resistência, kgf	21,362	30,510	27,965	27,689	26,881	2,040	0,459
Resistência, N	209,49	299,20	274,24	271,54	263,61	20,011	0,459
Índice de Seedor	208,182	200,066	211,363	222,556	210,541	6,483	0,340

CMO=Conteúdo Mineral Ósseo; DMO=Densidade Mineral Óssea.

\*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na linha, diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 10% de probabilidade.

<sup>1</sup>Dietas experimentais – 100/0 = 100% colecalciferol; 50/50 = 50% colecalciferol + 50% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo; 25/75 = 25% colecalciferol + 75% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>glicosídeo; 0/100 = 100% 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> glicosídeo.

A resistência a quebra (P=0,459) e a densidade mineral óssea (P=0,353) não apresentaram diferenças entre os tratamentos, assim como a deposição de cálcio e fósforo no osso, também não houve alteração na formação da hidroxiapatita que confere a resistência aos ossos. Amundson et al. (2016) encontraram valores superiores de densidade (DMO) nos ossos de leitões de 8 semanas quando foi utilizada a suplementação de colecalciferol em conjunto com 20% de acréscimo no requerimento de fósforo dos animais (0,430 g/cm<sup>2</sup>) e valores maiores quando as matrizes foram suplementadas com o colecalciferol no período gestacional e lactação (0,514 g/cm<sup>2</sup>). A influência dos minerais pode ter contribuído para as diferenças encontradas neste caso, já que calcemia e fosfatemia são importantes reguladores da conversão da vitamina D e da deposição dos minerais nos ossos.

Castro et al. (2018) não encontraram efeito na resistência óssea em aves alimentadas com colecalciferol e 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sintética, porém, quando utilizada 100%

da recomendação de colecalciferol, apresentou um DMO superior ao tratamento que utilizou apenas 50%, demonstrando a necessidade de suplementação adequada desta vitamina para melhorar a densidade mineral óssea. O maior valor de DMO foi quando se utilizou 100% da recomendação com suplementação da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  em conjunto.

Em estudos recentes, Schlegel et al. (2017) utilizou o colecalciferol sozinho ou combinado com níveis crescentes de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo na alimentação de leitões, os autores encontraram diferenças entre os tratamentos sobre a resistência da tíbia, em que o maior nível de suplementação do glicosídeo apresentou resistência semelhante ao tratamento apenas com o colecalciferol, entretanto, a densidade não foi diferente entre os tratamentos.

Os leitões do tratamento 0/100 apresentaram placa de crescimento ( $P=0,002$ ) com 0,7 mm a mais que os leitões do tratamento 100/0, demonstrando um aumento na proliferação de células ósseas, que pode levar ao rápido crescimento e desenvolvimento ósseo (Figura 1). A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  além de exercer funções no metabolismo do cálcio e fósforo, também atua diretamente nos condrócitos da placa de crescimento que expressam a CYP27B1, enzima que converte a  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  em  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . A vitamina D ativa neste local apresenta funções autócrinas, como a diferenciação celular, a angiogênese e a osteoclastogênese (NAJA et al., 2009).

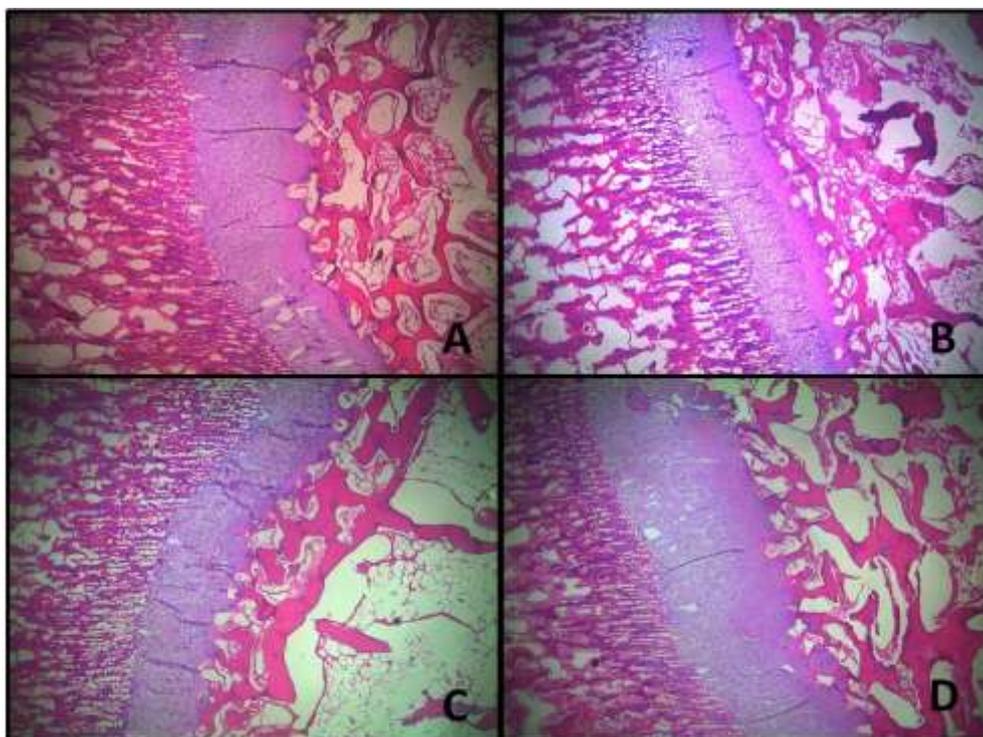


Figura 1. Fotomicrografia de lâminas histológicas da placa de crescimento de metatarsos de leitões (coloração eosina-hematoxilina, aumento 10x).

A ação genômica da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regula o desenvolvimento ósseo e a homeostase de fosfato por via parácrina. Estes genes regulados são essenciais para a vascularização e invasão de osteoclastos na zona de condrócitos hipertróficos e agem de forma indireta no desenvolvimento da placa de crescimento (MASUYAMA et al. 2006).

Os períodos de rápido crescimento são indicações prováveis de crescimento esquelético desequilibrado. Por isso, o período do desmame até os 84 dias de idade é chamado de janela da susceptibilidade, quando a cartilagem em maturação é mais vulnerável ao surgimento de lesões osteocondróticas. Os suínos que apresentaram um rápido crescimento entre 28 e 35 dias de idade, apresentaram osteocondrose grave na idade de abate e entre 56 e 84 dias apresentaram osteocondrose leve, porém, após 90 dias de idade o ganho de peso não teve relação com o surgimento da OC (VAN GREVENHOF et al., 2012).

Diante do exposto, a utilização da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na suplementação de rações para os leitões se mostra eficiente na manutenção do pH estomacal e intestinal, bem como no desenvolvimento ósseo dos suínos. Além disso, diante dos resultados encontrados sugere-se que há um aumento na imunidade inata dos leitões pela redução no tamanho do baço, indicando pouca função deste órgão.

#### **4.4 Conclusões**

A redução do peso relativo do baço em 25,4% no tratamento com a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo em relação ao tratamento com o colecalciferol pode demonstrar uma melhora na imunidade inata dos leitões. O tratamento 50/50 apresentou os maiores valores de pH intestinal comparado ao tratamento 0/100, que demonstrou redução de 4,7% no pH do jejuno e 7% no íleo, sugerindo uma melhora na digestibilidade e absorção do cálcio no tratamento com a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  glicosídeo.

Neste contexto, verificou-se uma melhora no desenvolvimento ósseo pelo aumento de 0,7 mm na placa de crescimento e 6,6 mm na largura da diáfise nos ossos dos animais alimentados com a forma ativa da vitamina D.

#### 4.5 Referências

- ALVES, O.S.; CALIXTO, L.F.L.; ARAUJO, A.H.B.; TORRES-CORDIDO, K.A.A.; REIS, T.L.; CALDERANO, A.A. Decrease levels of vitamin D<sub>3</sub> and supplementation with 125-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-glycoside on performance, carcass yield and bone quality in broilers. **Ciência Rural**, v.48, n.8, e20170705, 2018.
- AMUNDSON, L.A.; HERNANDEZ, L.L.; LAPORTA, J.; CRENSHAW, T.D.; Maternal dietary vitamin D carry-over alters offspring growth, skeletal mineralisation and tissue mRNA expression of genes related to vitamin D, calcium and phosphorus homeostasis in swine. **British Journal of Nutrition**, n.116, p.774-787, 2016.
- ANDRADE, C.; ALMEIDA, V.V.; COSTA, L.B.; BERENCHTEIN, B.; MOURÃO, G.B.; MIYADA, V.S. Levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.4, p.788-796, 2011.
- BERGWITZ, C.; JÜPPNER, H. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23. **Annual Review of Medicine**, v.61, p.91-04, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. **Instrução Normativa Nº3, de 17 de janeiro de 2000**. Regulamento técnico de métodos de insensibilização para abate humanitário de animais de açougue. Diário Oficial da União. Brasília, 24 jan, 2000.
- BRONNER, F. Mechanisms of intestinal calcium absorption. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.88, n.2, 387-393, 2003.
- CANTORNA, M.T.; Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. **Proceedings of the Nutritional Society**, v.69, n. 3, p.286-289, 2010.
- CASTRO, F.L.S.; BAIÃO, N.C.; ECCO, R.; LOUZADA, M.J.Q.; MELO, E.F.; SALDANHA, M.M.; TRIGINELLI, M.V.; LARA, L.J.C. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and reduced vitamin D<sub>3</sub> level on broiler performance and bone quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, e.20170186, 2018.
- CHAMONE, J.M.A.; MELO, M.T.P.; AROUCA, C.L.C.; BARBOSA, M.M.; SOUZA, F.A.; SANTOS, D. Fisiologia digestiva de leitões. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.7, n.5, p.1353-1363, 2010.
- CORASSA, A.; LOPES, D.C.; BELLAVAR, C. Mananoligossacarídeos, ácidos orgânicos e probióticos para leitões de 21 a 49 dias de idade. **Archivos de Zootecnia**, v.61, v.235, p.467-476, 2012.
- DENCK, F.M.; HILGEMBERG, J.O.; LEHNEN, C.R. Uso de acidificantes em dietas para leitões em desmame e creche. **Archivos de Zootecnia**, v.66, n.256, p.629-238, 2017.
- DUFFY, S.K.; KELLY, A.K.; RAJAURIA, G.; CLARKE, L.C.; GATH, V.; MONAHAN, F.J.; O'DOHERTY, J.V. The effect of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and phytase inclusion on pig performance, bone parameters and pork quality in finisher pigs. **Journal of animal. Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n.5, p.1296-1305, 2018
- ETTERLIN, P.E.; EKMAN, S.; STRAND, R. OLSTAD, K.; LEY, C.J. Osteochondrosis, synovial fossae, and articular indentations in the talus and distal tibia os growing domestic pigs and wild boars. **Veterinary Pathology**, v. 54, p. 445-456, 2017.
- FERNANDES, A.; MIRANDA, A.P. Desempenho e ocorrência de diarreia em leitões alimentados com soro de leite. **Archivos de Zootecnia**, v.62, n.240, p.589-594, 2013.

- FIGUEIREDO A.V.; VITTI, D.M.S.S.; LOPES, J.B.; BARBOSA, H.P.; Disponibilidade biológica do fósforo de fontes fosfatadas determinada por intermédio da técnica de diluição isotópica. II. Suínos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1514-1520, 2001.
- GEORGIEVSKII, V.I. The physiological role of macroelements. In: GEORGIEVSKII, V.I.; ANNENKOV, B.N.; SAMOKHIN, V.I. (Eds.) **Mineral nutrition of animals**. 1.ed. London: Butterworths, 1982. P.91-170.
- GONZÁLES-VEGA, J.C.; LIU, Y.; MCCANN, J.C.; WALK, C.L.; LOOR, J.J.; STEIN, H.H. Requirement for digestible calcium by eleven –to twenty five – kilograms pigs as determined by growth performance, bone ash concentration, calcium and phosphorus balances, and expression of genes involved in transport of calcium in intestinal and kidney cells, **Journal of Animal Science**, v. 94, n.8, p.3321-3334, 2016.
- HAUSSLER, M.R.; JURUTKA, P.W.; MIZWICKI, M.; NORMAN, A.W. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ : genomic and non-genomic mechanism. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.25, p.453-559, 2011.
- HATA, T.R.; KOTOL, P.; JACKSON, M.; NGUYEN, M.; PAIK, A.; UDALL, D.; KANADA, K.; YAMASAKI, K.; ALEXANDRESCU, D.; GALLO, R.L. Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.122, n.4, p.829-831, 2008
- HEWISON, M. Vitamin D and the Immune system: New Perspectives on an old theme. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, p.125-139, v. 39, n.2, 2010.
- LI Y., STAHL, C.H.; Dietary calcium deficiency and excess both impact bone development and mesenchymal stem cell lineage priming in neonatal piglets. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n.12, p.1935-1942, 2014.
- LIU, P.T.; STENGER, S.; LI, H.; WENZEL, L.; TAN, B.H.; KRUTZIK, S.R.; OCHOA, M.T. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v.311, n.5768, p.1770-1773, 2006.
- MARQUES, C.D.L.; DANTAS, A.T.; FRAGOSO, T.S.; DUARTE, A.L.B.P. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n.1, p.67-80, 2010.
- MASUYAMA, R.; STOCKMANS, I.; TORREKENS, S.; VAN LOOVEREN, R.; MAES, C.; CARMELIET, P.; BOUILLON, R.; CARMELIET, G. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n. 12, p.3150-3159, 2006.
- MATHIS, G.; BOLAND, R.; BACHMANN, H.; TOGGENBURGER, A.; RAMBECK, W. Safety profile of 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$  of herbal origin in broiler chicken. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v.158, n.12, p.819-826, 2016.
- MOREIRA, J. A.; VITTI, D. M. S. S.; LOPES, J. B.; TRINDADE NETO, M. A. Cinética do fósforo em tecidos de suínos alimentados com dietas contendo enzima fitase. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p.70-80, 2004.
- NAGPAL, S.; NA, S.; RATHNACHALAM, R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. **Endocrine Reviews**, v.26, n.5, p.662-687, 2005.
- NAJA, R.P.; DARDENNE, O.; ARABIAN, A.; ST ARNAUD, R. Chondrocyte-specific modulation of Cyp27b1 expression supports a role for local synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$  in growth plate development. **Endocrinology**, v.150, n.9, p.4024-4032, 2009.

- NELSON, C.D.; REINHARDT, T.A.; BEITZ, D.C.; LIPPOLIS, J.D.; In Vivo activation of the intracrine vitamin D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection. **PLoS ONE**, v.5, n. 11, e15469, 2010.
- O'DOHERTY, J.V.; GAHAN, D.A.; O'SHEA, C.; CALLAN, J.J.; PIERCE, K.M. Effects of phytase and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> inclusions on the performance, mineral balance and bone parameters of grower-finisher pigs fed low-phosphorus diets. **Animal**, v.4, n.10, p. 1634-1640, 2010.
- PEREZ, A.V.; PICOTTO, G.; CARPENTIERI, A.R.; RIVOIRA, M.A.; PERALTA LOPEZ, M.E.; TOLOSA DE TALAMONI, N.G. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. **Digestion**, v.77, n.1, p.22-34, 2008.
- POZZA, P.C.; POZZA, M.S.S.; NUNES, R.V.; PASQUETTI, T.J.; VENTURINI, I.; BUSANELLO, M. Performance, intestinal microorganisms and organs weight of piglets in the initial phase receiving diets with symbiotic and probiotic. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.5, p.1327-1334, 2010.
- ROSTAGNO, H.S.; **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4ª Ed. Viçosa:UFV. 2017. 488p.
- SARNI, R.O.S.; SOUZA, F.I.S.; COCCO, R.R., MALLOZI, M.C.; SOLÉ, D. Micronutrientes e sistema imunológico. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.33, p.8-13, 2010.
- SCHLEGEL, P.; GUGGISBERG, D.; GUTZWILLER, A. Tolerance to 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> glycosides from *Solanum glaucophyllum* by the growing pig. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p.119-124, 2017.
- SCHRÖDER, B.; BREVES, G. Mechanisms and regulation of calcium absorption from the gastrointestinal tract in pigs and ruminants: comparative aspects with special emphasis on hypocalcemia in dairy cows. **Animal Health Research Reviews**, v.7, n.1-2, p.31-41, 2006.
- SEEDOR, J.G. QUARRUCCIO, H.A.; THOMPSON, D.D. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.6, n. 4, p.339-346, 1991.
- SHIMADA, T.; KIKITANI, M.; YAMAZAKI, Y.; HASEGAWA, H.; TAKEUCHI, Y.; FUJITA, T.; FUKUMOTO, S.; TOMIZUKA, K.; YAMASHITA, T. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. **Journal of Clinical Investigation**, v.113, n.4, p.561-568, 2004.
- STEIN, H.H.; ADEOLA, O.; CROMWELL, G.L.; KIM, S.W.; MAHAN, D.C.; MILLER, P.S. Concentration of dietary calcium supplied by calcium carbonate does not affect the apparent total tract digestibility of calcium, but decreases digestibility of phosphorus by growing pigs. **Journal of Animal Science**, v.89, n. 7, p.2139-2144, 2011.
- TEIXEIRA, A.O.; LOPES, D.C.; VITTI, D.M.S.; LOPES, J.B.; GOMES, P.C.; MOREIRA, J.A.; PENA, S.M.; TEIXEIRA, M.P. Estimativas do fluxo de fósforo entre os compartimentos anatômicos e fisiológicos de suínos alimentados com dietas contendo diferentes fontes de fósforo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.5, p.1246-1253, 2004.
- VAN GREVENHOF, E.M.; HEUVEN, H.C.M.; VAN WEEREN, P.R.; BIJMA, P. The relationship between growth and osteochondrosis in specific joints in pigs. **Livestock Science**, v. 143, n. 1, p.85-90, 2012.

- VAN RIET, M.M.J.; MILLET, S.; ALUWÉ, M.; JANSSENS, G.P.J. Impact of nutrition on lameness and claw health in sows. **Livestock Science**, v.156, n.1-3, p.24-35, 2013.
- YTREHUS, B.; CARLSON, C.S.; EKMAN, S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. **Veterinary Pathology**, n.44, p.429-448, 2007.
- WASSERMAN, R.H. Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. **Journal of Nutrition**, v.134, n.11, p.3137-3139, 2004.
- WHITE, J.H.; Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: past, present and future. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.121, n. 1-2, 234–238, 2010.
- WITSCHI, A.K.M.; LIESEGANG, A.; GEBERT, S.; WEBER, G.M.; WENK, C.; Effect of source and quantity of dietary vitamin D in maternal and creep diets on bone metabolism and growth in piglets. **Journal of Animal Science**, v.89, n. 6, p.1844-1852, 2011.
- WONGDEE, K.; KRISHNAMRA, N.; CHAROENPHANDHU, N.; Endochondral bone growth, bone calcium accretion, and bone mineral density: how are they related? **The Journal of Physiological Sciences**, v. 62, p.299-307, 2012.
- ZIMMERMAN, D.R.; KOSZEWSKI, N.J.; HOY, D.A.; GOFF, J.P.; HORST, R.L. Targeted delivery of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to colon tissue and identification of a major 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> glycoside from *Solanum glaucophyllum* plant leaves. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.148, p.318-325, 2015.
- ZHOU, H.; CHEN, Y.; ZHOU, Y.; LV, G.; LIN, Y.; FENG, B.; FANG, Z.; CHE, L.; LI, J.; XU, S.; WU, D. Effects of 25-hydroxycholecalciferol supplementation in maternal diets on milk quality and serum bone status markers of sows and bone quality of piglets. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 3, p.476-483, 2016.