

JOÃO LUIZ PRATTI DANIEL

**AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DA ABSORÇÃO E
METABOLIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS PELO
PROVENTRÍCULO DE BOVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Daniel, João Luiz Pratti.

Avaliação morfofisiológica da absorção e metabolização de ácidos graxos voláteis pelo proventrículo de bovinos / João Luiz Pratti Daniel. -- Lavras : UFLA, 2007.

iv, 147 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: João Chrysostomo de Resende Júnior.

Bibliografia.

1. Rúmen. 2. Omaso. 3. Proventrículo. 4. Estômago de ruminante. 5. Superfície absorptiva. 6. Índice mitótico. 7. Ácido graxo volátil. 8. Absorção. 9. Metabolismo. 10. Valerato. 11. Câmara de difusão tecidual. 12. Bovino. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.208923

JOÃO LUIZ PRATTI DANIEL

**AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DA ABSORÇÃO E
METABOLIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS PELO
PROVENTRÍCULO DE BOVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de “Mestre”.

Aprovada em 11 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. Mário César Guerreiro – UFLA

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa – UFLA

Prof^ª. Dra. Suely de Fátima Costa – UFLA

Prof. Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

Dedico o presente trabalho à minha família.

“Ainda que eu falasse línguas, as dos homens e dos anjos, se eu não tivesse o amor, seria como sino ruidoso ou como címbalo estridente. Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência; ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tivesse o amor, eu não seria nada. Ainda que eu distribuísse todos os meus bens aos famintos, ainda que entregasse o meu corpo às chamas, se não tivesse o amor, nada disso me adiantaria.”

1 Coríntios 13, 1-3

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sabedoria.

Ao professor João Chrysostomo de Resende Júnior, pelo apoio, amizade, incentivo e competência na realização deste trabalho.

Aos amigos Bruno Loiacono, Herta Bezerra, Juliana Costa, Leandra Melo, Ronaldo Lima, Milton Cardoso, Fabíola Meireles, Anselmo Moreira, Régis Ferreira, Mateus Sudano, Micaela Guidotti e Fabiano da Cruz, pela ajuda indispensável.

Ao professor Mário César Guerreiro, pelo apoio nas análises laboratoriais e valiosas sugestões.

Aos professores Suely de Fátima Costa e Raimundo Vicente de Sousa, pelas valiosas sugestões.

A Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos recursos financeiros necessários à realização dos experimentos.

Aos amigos Lucrécio e Zezinho, pela hospitalidade.

Aos meus pais, Valcyr e Sueli, e a minha companheira, Janaína, só resta agradecer.

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 MORFOLOGIA DO PROVENTRÍCULO.....	3
2.1.1 Macroscopia.....	3
2.1.2 Microscopia	5
2.2 DESENVOLVIMENTO DO PROVENTRÍCULO.....	7
2.2.1 Desenvolvimento pré-natal do proventrículo.....	7
2.2.1 Desenvolvimento pós-natal do proventrículo	9
2.3 ABSORÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS PELO PROVENTRÍCULO	29
2.4 ABSORÇÃO DE ÁGUA E ELETRÓLITOS PELO PROVENTRÍCULO..	45
2.5 TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NO EPITÉLIO DO PROVENTRÍCULO	51
2.6 METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NO EPITÉLIO DO PROVENTRÍCULO	65
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
CAPÍTULO 2.....	103
PARTICIPAÇÃO DO RUMINORRETÍCULO E OMASO NA SUPERFÍCIE ABSORTIVA TOTAL DO PROVENTRÍCULO DE BOVINOS	103
CAPÍTULO 3.....	121
AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DA ABSORÇÃO E METABOLIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS PELO RÚMEN E OMASO DE BOVINOS.....	121

RESUMO

DANIEL, João Luiz Pratti. **Avaliação morfofisiológica da absorção e metabolização de ácidos graxos voláteis pelo proventrículo de bovinos.** 2007. 147 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Cerca de 60% dos ácidos graxos voláteis (AGV), produzidos no ruminorretículo, são absorvidos neste compartimento e outros 40% passam com a fase fluida para o omaso e são absorvidos antes do duodeno. Dois experimentos foram realizados para determinar as superfícies absorptivas e as capacidades de absorção e metabolização de AGV dos compartimentos do proventrículo de bovinos. No primeiro experimento, as superfícies absorptivas dos compartimentos do proventrículo de oito bovinos adultos foram mensuradas por meio de captura e análise de imagens. A superfície absorptiva do ruminorretículo ($7,7 \text{ m}^2$) foi maior do que a do omaso ($2,1 \text{ m}^2$). A razão superfície/digesta, entretanto, foi maior no omaso ($0,31 \text{ m}^2/\text{kg}$) do que no ruminorretículo ($0,13 \text{ m}^2/\text{kg}$), representando uma superfície 2,4 vezes maior no omaso por unidade de digesta. A razão superfície absorptiva/superfície de parede de um fragmento do saco ventral do rúmen apresentou correlação positiva e alta ($r = 0,84$) com a superfície absorptiva total do rúmen, indicando ser possível a estimativa da superfície total do órgão por meio de biópsia. No segundo experimento, as capacidades de absorção e metabolismo de AGV pelo rúmen e omaso foram comparadas, *in vitro*. Após o abate, foram coletados fragmentos da parede ruminal e de uma lâmina do omaso de oito bovinos mestiços adultos. Um fragmento de mucosa isolada foi montado em uma câmara de difusão tecidual. Ácido valérico e CrEDTA foram adicionados ao fluido ruminal que foi utilizado no lado da câmara representativo do lúmen. No outro lado da câmara, representativo do sangue, foi utilizada uma solução de Krebs-Ringer bicarbonato. A superfície absorptiva do fragmento do rúmen ($57,6 \text{ cm}^2$) foi maior do que a do omaso ($4,9 \text{ cm}^2$), por causa das papilas ruminais. O índice mitótico do omaso (0,52%) foi maior do que o do epitélio ruminal (0,28%). A taxa fracional de absorção de AGV foi maior no omaso ($4,6\% \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) do que no rúmen ($0,4\% \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$). Acetato, propionato, butirato e valerato apresentaram taxas fracionais de absorção semelhantes, em ambos os fragmentos. A porcentagem de acetato metabolizado (10,9%) foi menor do que a de propionato (31,1%) que foi menor do que a de butirato (39,8%) e a de

¹ **Comitê Orientador:** Prof. Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior – UFLA (Orientador), Prof. Dr. Mário César Guerreiro – UFLA e Prof. Dr. Marcos Neves Pereira – UFLA.

valerato (42,0%). A correlação entre o metabolismo de AGV e o índice mitótico foi positiva, mas a absorção de AGV não foi correlacionada com as outras variáveis no rúmen. No omaso, a correlação entre a absorção de AGV e o índice mitótico foi positiva, entretanto, essas variáveis foram negativamente correlacionadas com o metabolismo de AGV. Apesar da superfície absorptiva do ruminorretículo ser maior do que a do omaso, o potencial de absorção e metabolismo de AGV do omaso é maior do que o do ruminorretículo. As capacidades de absorção de rúmen e omaso variam na mesma direção e existem indicações de que os fatores capazes de estimular a proliferação da parede ruminal também são capazes de estimular a parede do omaso.

ABSTRACT

DANIEL, João Luiz Pratti. **Morphophysiologic evaluation of the absorption and metabolism of volatile fatty acids by bovine forestomach.** 2007. 147 p. Dissertation (Master Program in Veterinary Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

About 60% of volatile fatty acids (VFA) produced in reticulorumen are absorbed in this compartment. The other 40% pass with the fluid phase to the omasum and are absorbed before entering the duodenum. Two experiments were carried out to determine the absorption surfaces and the VFA absorption and metabolism capacity of the bovine forestomach compartments. In the first experiment, the absorption surfaces of the forestomach compartments of the eight adult bovines were measured through image capture and analysis. The reticulorumen absorptive surface (7.7 m²) was larger than the omasum absorptive surface (2.1 m²). The surface/digesta ratio, however, was larger in the omasum (0.31 m²/kg) than in the reticulorumen (0.13 m²/kg), representing an omasum surface for each digest unit 2.4 times larger. The absorption surface/wall surface ratio of one rumen ventral sac fragment showed a positive and high correlation ($r = 0.84$) with the total rumen surface, indicating that it is possible to estimate the rumen surface by biopsy. In the second experiment, the VFA absorption and metabolism capacities of the rumen and omasum were compared, *in vitro*. After the slaughter, fragments of the rumen wall and omasum laminae were taken from eight adult crossbred bovines. An isolated fragment of the mucosa was fitted in a tissue diffusion chamber. Valeric acid and CrEDTA were added to the ruminal fluid and placed on the mucosal side. Krebs-Ringer bicarbonate buffer solution was placed on the serosal side. The absorption surface of the rumen fragment (57.6 cm²) was higher than that of the omasum (4.9 cm²), because of the ruminal papillae. The mitotic index of the omasum (0.52%) was higher than that of the rumen epithelium (0.28%). The VFA fractional absorption rate was higher in the omasum (4.6%.h⁻¹.cm⁻²) than in the rumen (0.4%.h⁻¹.cm⁻²). Acetate, propionate, butyrate and valerate showed similar fractional absorption rates in both fragments. The percentage of metabolized acetate (10.9%) was lower than propionate (31.1%) which was lower than butyrate (39.8%) and valerate (42.0%). The correlation between VFA metabolism and mitotic index was positive, but the VFA absorption was not correlated with other variables in the

¹ **Graduate Committee:** Prof. Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior – UFLA (Advisor), Prof. Dr. Mário César Guerreiro – UFLA and Prof. Dr. Marcos Neves Pereira – UFLA.

rumen. In the omasum, the correlation between VFA absorption and mitotic index was positive, however, those variables were negatively correlated with the VFA metabolism. Despite the reticulorumen absorption surface being higher than that of the omasum, the VFA metabolism and absorption potential of the omasum is higher than the reticulorumen. The rumen and omasum absorption capacities vary in the same way, and there are indications that the factors capable of stimulating the rumen wall are also capable of stimulating the omasum wall proliferation.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A digestão de polissacarídeos estruturais, como a celulose, a hemicelulose e a pectina, não pode ser feita por enzimas oriundas de mamíferos (Van Soest, 1994), exigindo um processo que envolve a colonização do trato gastrointestinal (TGI) por microorganismos simbióticos (Stevens & Hume, 1998). Os ácidos graxos voláteis¹ (AGV) produzidos no TGI como subprodutos do metabolismo microbiano podem prover até 80% da exigência diária de energia dos ruminantes (Bergman, 1990). A remoção (*clearance*) dos AGV do ruminorretículo ocorre por dois processos: absorção pela parede do órgão e passagem com a fase fluida para o omaso (Tamminga & Van Vuuren, 1988). Se a taxa de produção excede a taxa de *clearance*, os AGV acumularão dentro do ruminorretículo, podendo desencadear um distúrbio metabólico conhecido como acidose ruminal (Barker et al., 1995), que tem efeitos negativos sobre o desempenho e a saúde dos animais.

Cerca de 60% do *clearance* ruminal de AGV acontece por absorção pela parede do ruminorretículo e os outros 40% passam para o omaso (Tamminga & Van Vuuren, 1988; Peters et al., 1990a; Voelker & Allen, 2003; Resende Júnior et al., 2006b), conferindo papel extremamente relevante no *clearance* de AGV a este órgão, que parece absorver a maior parte dos AGV que a ele chega.

As superfícies internas do ruminorretículo e, provavelmente, do omaso estão diretamente relacionadas à capacidade de absorção de AGV. A manipulação da morfologia através da dieta e, conseqüentemente, da capacidade de absorção da parede do ruminorretículo, é possível e tem sido preconizada para o controle da acidose ruminal em vacas leiteiras (Dirksen et al., 1985). Há

¹ Os principais AGV - acetato, propionato e butirato - são ácidos carboxílicos normais com dois a quatro carbonos.

indícios de que também seja possível interferir nutricionalmente na morfologia do omaso (Costa, 2003; Baldwin et al., 2004). Os AGV não absorvidos no omaso podem passar ao abomaso (Rupp et al., 1994) e o excesso de AGV na digesta abomasal pode causar hipomotilidade do órgão (Svendsen, 1969; Bolton et al., 1976), que consiste em um dos fatores predisponentes ao deslocamento de abomaso em bovinos. Também já foi demonstrado que os AGV possuem efeitos deletérios sobre o epitélio abomasal (Bödeker et al., 1994).

A atuação sobre a morfologia omasal, uma linha de pesquisa incipiente, pode ser tão efetiva no controle de distúrbios digestivos decorrentes do acúmulo de AGV no rúmen quanto à manipulação da capacidade de absorção da parede ruminal. No entanto, desconhece-se a participação de cada compartimento na superfície absorptiva total do proventrículo e o potencial de absorção e metabolização de AGV dos epitélios de cada um. Estas são informações básicas importantes, uma vez que se têm assumido que as capacidades de absorção do ruminoretículo e omaso são semelhantes. Outro fato importante é que a morfologia e a fisiologia omasal são ainda grandemente desconhecidas, apesar da fundamental importância deste órgão no processo digestório dos ruminantes.

A hipótese deste trabalho é que a superfície absorptiva, bem como os potenciais de absorção e metabolismo de AGV, dos compartimentos do proventrículo, sejam proporcionais à magnitude de absorção atribuída a cada um deles.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MORFOLOGIA DO PROVENTRÍCULO

2.1.1 Macroscopia

O estômago dos ruminantes é constituído por quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso. Os três primeiros constituem a parte aglandular do estômago, denominada proventrículo. O abomaso constitui a parte glandular do estômago, onde é produzida a secreção gástrica e ocorre a ação desta sobre a digesta (Nickel et al., 1979). A similaridade entre a mucosa do proventrículo e do esôfago levou muitos autores a assumirem que a parte aglandular do estômago era uma dilatação do esôfago embrionário. Estudos sobre a organogênese destes órgãos, entretanto, demonstraram que o proventrículo e o abomaso se originam de um mesmo primórdio, semelhantemente ao estômago simples (Warner, 1958; Nickel et al., 1979).

Os dois primeiros compartimentos, o rúmen e o retículo, freqüentemente são considerados uma só câmara, denominada ruminorretículo, devido à ausência de barreira anatômica consistente entre elas. Esse órgão é responsável por cerca de 80% da capacidade de armazenamento do estômago, além de ocupar a maior parte da cavidade abdominal, especialmente o antímero esquerdo (Nickel et al., 1979). O ruminorretículo é o principal local de ação dos microorganismos simbióticos sobre a matéria orgânica da dieta (Van Soest, 1994).

A superfície externa do ruminorretículo é marcada pela presença de sulcos, que estão representados internamente por espessamentos da túnica muscular, os pilares. Os sulcos, externamente, e os pilares, internamente, delimitam os sacos cranial, dorsal, cego caudo-dorsal, cego caudo-ventral e ventral. Entre rúmen e retículo estão a prega ruminorreticular, internamente, e o

sulco ruminoreticular, externamente. A extremidade cranial do saco ventral é denominada recesso do rúmen (Nickel et al., 1979).

A superfície interna do rúmen é caracterizada pela presença de papilas, que são projeções da mucosa que aumentam a superfície de contato deste órgão (Banks, 1992) possibilitando, dentre outros, maior capacidade de absorção de AGV (Dirksen et al., 1985). Assim, a superfície pode variar com a dieta em função da necessidade de absorção de AGV (Sutton et al., 1963a) e os próprios ácidos atuam direta (Sakata & Tamate, 1978b) e indiretamente (Sakata et al., 1980; Shen et al., 2004) na variação do tamanho papilar.

O retículo, o mais cranial dos compartimentos do estômago, é um órgão esférico, ligeiramente achatado cranio-caudalmente, relacionado às funções mecânicas como a motilidade e a seleção de partículas (Van Soest, 1994). Sua superfície interna é caracterizada pela presença de projeções da mucosa anastomosadas denominadas cristas, que delimitam áreas poligonais, as células-do-retículo. Por toda mucosa existem papilas cônicas de tamanho diminuto (Nickel et al., 1979). Na parede, em sentido cranio-medial, encontra-se o sulco do retículo (Nickel et al., 1979), responsável pelo desvio de alimentos fluidos do esôfago para o omaso-abomaso em ruminantes jovens (Orskov et al., 1970) e adultos (Woodford et al., 1984; Garcia et al., 2005). Apesar da sua funcionalidade em adultos, apenas 30% da água de bebida ingerida é desviada do ambiente ruminal (Daniel et al., 2007).

O terceiro compartimento, o omaso, é especializado em absorção (Bueno et al., 1972; Edrize et al., 1986). Sua mucosa apresenta extensas projeções, de diferentes tamanhos, as lâminas do omaso que são sobrepostas umas às outras como as folhas de um livro (Nickel et al., 1979). Encontram-se em número de 89 a 192, com média de 145 (Becker et al., 1963; McSweeney, 1988). Na superfície das lâminas encontram-se pequenas papilas unguiculiformes (Becker et al., 1963). Os espaços entre as lâminas são

denominados recessos interlaminares e ficam preenchidos por digesta. Essa organização morfológica confere a este órgão uma enorme superfície de contato, fundamental para o desempenho de suas funções. Embora alguns autores (Nickel et al., 1979) considerem a existência de uma organização seqüencial no tamanho das lâminas, como exemplo, 1-4-3-4-2-4-3-4¹, em um trabalho realizado com omaso de 86 bezerros da raça Jersey não foi possível verificar esta organização, já que existe uma grande variabilidade entre os animais (Becker et al., 1963). McSweeney (1988), comparando a anatomia do omaso de bubalinos, bovinos, ovinos e caprinos, mostrou que o omaso de grandes ruminantes é mais complexo do que o omaso de pequenos ruminantes, devido a seu maior peso relativo ao peso total do corpo e o maior número de lâminas.

2.1.2 Microscopia

A parede do proventrículo é composta, de uma forma geral, pelas túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa, no sentido do lúmen para a cavidade abdominal, embora existam peculiaridades entre os compartimentos. A parede do rúmen é formada pelas túnicas mucosa, muscular (circular interna, longitudinal externa) e serosa. A mucosa é composta pelo epitélio e pela lâmina própria. O epitélio que reveste internamente a parede do rúmen, do tipo estratificado pavimentoso queratinizado, é formado pelas camadas basal, espinhosa, granulosa e córnea, dispostas nesta ordem da lâmina própria para o lúmen (Banks, 1992; Dellmann & Brown, 1982), e tem como funções: absorção de AGV (Barcroft et al., 1944; Danielli et al., 1945; Gray, 1948), eletrólitos e água (Parthasarathy & Phillipson, 1953), peptídeos e aminoácidos (Matthews & Webb, 1995), e glicose (Aschenbach et al., 2000a,b); metabolização de AGV (Pennington, 1952; Sutton et al., 1963b); e proteção contra a digesta abrasiva e

¹ Lâminas primárias = 1, lâminas grandes; Lâminas secundárias = 2, lâminas médias grandes; Lâminas terciárias = 3, lâminas médias pequenas; Lâminas quaternárias = 4, lâminas pequenas.

microorganismos (Lavker et al., 1969). Por algum tempo a paraqueratose¹ foi considerada uma patologia do epitélio ruminal (Jensen et al., 1958). Entretanto, esta é uma característica normal deste epitélio (Lavker et al., 1969), apesar da maior intensidade de ocorrência em animais consumindo dietas com alto teor de concentrados (Tamate & Kikuchi, 1978). Na camada basal do epitélio está a população de células proliferativas (Ohwada & Tamate, 1979). O tamanho das papilas ruminais está correlacionado à proliferação do epitélio (Sakata & Tamate, 1974; Goodlad, 1981), bem como à intensidade do fluxo sanguíneo no órgão (Tamate et al., 1974).

O tecido conjuntivo, situado entre o epitélio e a túnica muscular é, muitas vezes, denominado lâmina própria-submucosa (Banks, 1992), devido à ausência de demarcação entre esses componentes. Nessa região encontram-se vasos sanguíneos (Schnorr & Vollmerhaus, 1968) e o plexo nervoso submucoso, do qual fazem parte os receptores epiteliais (Leek & Harding, 1975), envolvidos na estase ruminorreticular nos casos de acúmulo de AGV no ambiente ruminal (Crichlow & Chaplin, 1985). Nas camadas musculares, além de vasos sanguíneos (Schnorr & Vollmerhaus, 1968), está o plexo nervoso mioentérico, principalmente no retículo e no saco cranial do rúmen, onde estão os receptores de tensão (Leek & Harding, 1975), que exercem um efeito excitatório sobre a taxa, a amplitude e a forma dos movimentos do ruminorretículo (Iggo & Leek, 1967).

A parede do retículo, semelhantemente à parede do rúmen, é composta pelas túnicas mucosa, muscular e serosa. Porém, observa-se a presença da muscular da mucosa, um aglomerado de musculatura lisa no ápice das cristas do retículo (Banks, 1992). Nos locais onde as cristas do retículo se cruzam, os feixes musculares passam de uma crista para a outra, formando uma malha contínua de músculo liso por toda a mucosa do retículo. A delgada túnica

¹ Paraqueratose: presença de núcleos na camada córnea do epitélio (Lavker et al., 1969).

submucosa, composta de fibras colágenas e elásticas, une-se com a lâmina própria sem qualquer limite evidente. A túnica muscular consiste de duas camadas de fibras musculares lisas que seguem um percurso oblíquo e se cruzam em ângulos retos (Delmann & Brown, 1982).

A parede do omaso é constituída pelas túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa. Na túnica mucosa encontra-se a muscular da mucosa, que tem o sentido das fibras paralelo à borda livre das lâminas. No omaso, a túnica muscular se projeta para o interior das lâminas, com fibras perpendiculares à muscular da mucosa (Yamamoto et al., 1991; Banks, 1992). O epitélio da mucosa do omaso é semelhante ao epitélio ruminal (Delmann & Brown, 1982), e tem como funções: absorção de AGV (Barcroft et al., 1944; Johnston et al., 1961; Bueno et al., 1972), água e eletrólitos (Edrize & Smith, 1977; Sklan & Hurwitz, 1985), e peptídeos e aminoácidos (Matthews & Webb, 1995; McCollum & Webb, 1998); metabolização de AGV (Joyner et al., 1963); e proteção contra a digesta abrasiva e microorganismos.

2.2 DESENVOLVIMENTO DO PROVENTRÍCULO

2.2.1 Desenvolvimento pré-natal do proventrículo

Desde o início da década de 1950, pesquisadores vêm tentando demonstrar o mecanismo pelo qual o estômago dos ruminantes se desenvolve morfofisiologicamente. Becker et al. (1951) realizaram um estudo para acompanhar o desenvolvimento do estômago de bovinos durante a fase fetal. Trinta e quatro conceptos com idade entre 59 e 283 dias, removidos de vacas das raças Jersey ou Guernsey, tiveram o estômago dissecado. No início da vida fetal o rúmen foi o maior dos compartimentos do estômago. Aos seis meses de gestação, rúmen e abomaso apresentavam pesos semelhantes. Nos conceptos a termo, entretanto, o abomaso representou mais da metade do peso do estômago.

Segundo os autores, a túnica muscular e as papilas da parede ruminal não estavam “bem desenvolvidas” nos conceptos a termo. A diferenciação das células do retículo e das lâminas do omaso ocorreu entre 72 e cem dias. Durante o desenvolvimento inicial, o peso do estômago vazio representou aproximadamente 1,8% do peso fetal até os seis meses quando reduziu progressivamente até 1,3% nos conceptos a termo. Quando analisaram o rúmen (55%), o retículo (13%) e o omaso (33%), pôde-se notar que estes órgãos representavam uma proporção constante do peso total do proventrículo ao longo da gestação, demonstrando que o desenvolvimento fetal dos compartimentos do proventrículo provavelmente se dá pelo mesmo estímulo. Becker et al. (1963), para verificar o desenvolvimento normal do omaso, sacrificaram 16 bezerros da raça Jersey recebendo leite, concentrado e feno de alfafa, em grupos de quatro animais aos dez, trinta, noventa, 120 e 150 dias. Os respectivos volumes médios dos órgãos foram 44 mL, 102 mL, 1292 mL, 2441 mL e 2643 mL, ou seja, um aumento de sessenta vezes num período de 140 dias

Outro experimento, visando estudar o desenvolvimento morfológico do ruminoretículo de bovinos, foi realizado no início da década de 1990 (Stallcup et al., 1990). Foram utilizados trinta fetos da raça Holandesa entre cem e 251 dias após a concepção. Quatro bezerros foram abatidos após o nascimento para comparação. Aos cem dias, três a quatro camadas de células na zona basal do epitélio ruminal já se apresentavam diferenciadas. Dos 120 aos 141 dias, foram detectadas ondulações primárias na zona basal do epitélio, na membrana basal e na lâmina própria. Dos 150 aos 166 dias, foram encontradas ondulações secundárias e papilas incipientes, semelhantes às papilas ruminais com formação completa. Nos fetos com idade entre 192 e 215 dias, puderam-se detectar ápices isolados de papilas na massa epitelial. Nos fetos com idade acima de 244 dias, as papilas ruminais já tinham individualidade definida. Ao parto, a porção basal das papilas ruminais ainda permanecia fundida. O desenvolvimento das células do

retículo foi evidente nos fetos com cem dias e progrediu rapidamente com a idade (Stallcup et al., 1990). Assim, fica esclarecido que o desenvolvimento morfológico da parede do proventrículo se dá antes do nascimento.

2.2.1 Desenvolvimento pós-natal do proventrículo

Estudando o desenvolvimento do proventrículo após o nascimento, alguns autores concluíram logo nas primeiras pesquisas, que o desenvolvimento da musculatura era independente do desenvolvimento da mucosa (Brownlee, 1956; Sander et al., 1959; Tamate et al., 1962). Substâncias não fermentáveis foram efetivas em estimular o desenvolvimento muscular do rúmen de novilhas leiteiras (Harrison et al., 1960). Esponjas plásticas introduzidas no rúmen de bezerros aumentaram a capacidade do órgão por promover desenvolvimento da musculatura lisa (Tamate et al., 1962).

Demonstrou-se que o grau de desenvolvimento das papilas do rúmen foi provavelmente determinado pelo teor de energia da dieta, ou pela velocidade com que a dieta era quebrada em frações absorvíveis (Brownlee, 1956). Dieta completamente peletizada, contendo cerca de 50% de grão e 50% de forragem, resultou em bom crescimento papilar em carneiros (Thompson et al., 1958). A infusão de AGV por 12 semanas, na forma de solução de sais de sódio, estimulou o crescimento papilar em uma área limitada do rúmen de bezerros (Flatt et al., 1958). Bezerros recebendo butirato ou propionato de sódio intraruminalmente apresentaram extenso desenvolvimento papilar (Sander et al., 1959). Tamate et al. (1962) constataram evolução no desenvolvimento papilar, entre o nascimento e as 12 semanas de idade, em bezerros da raça holandesa alimentados com leite, feno e concentrado. Em contrapartida, animais alimentados apenas com leite tiveram menor tamanho de papilas do rúmen no mesmo período.

Um dos primeiros trabalhos que relacionou a proliferação do epitélio ruminal com a dieta ingerida foi realizado por Tamate et al. (1974). Neste experimento os autores utilizaram um carneiro alimentado normalmente, submetido a um jejum de três dias, seguido de realimentação. Durante a condição de alimentação regular, o índice mitótico (IM) da camada basal do epitélio ruminal (1,23%) foi maior do que após três dias de jejum (0,11%) e seis horas após a realimentação. Vinte e quatro horas após a realimentação, o IM se recuperou (0,80%).

No mês seguinte, o mesmo grupo de pesquisa, da Universidade de Tohuko no Japão, publicou um trabalho onde avaliaram o efeito da frequência alimentar sobre o IM do epitélio ruminal de dois carneiros (Sakata & Tamate, 1974). Os dois animais consumiram a mesma quantidade de alimentos, porém um era alimentado uma vez a cada três dias e o outro alimentado diariamente, com um terço daquela quantidade fornecida ao primeiro. O IM da camada basal do epitélio ruminal do carneiro alimentado intermitentemente foi maior nas amostras coletadas 24 e 48 horas após a alimentação. Não houve diferença entre as amostras coletadas seis horas após a alimentação.

Sabendo que os produtos da fermentação estimulavam o crescimento papilar (Sander et al., 1959); Sakata & Tamate (1976, 1978b, 1979) estudaram o efeito de injeções intra-ruminais de acetato, propionato ou butirato de sódio sobre o IM do epitélio ruminal de carneiros. No primeiro estudo, dois carneiros foram utilizados, sendo que um deles recebeu infusões diárias de 500 mL de uma solução de butirato de sódio a 10% e o outro recebeu solução salina, como controle (Sakata & Tamate, 1976). Este ensaio foi repetido três vezes com os mesmos animais, trocando-se os tratamentos entre os animais a cada ensaio. Antes de cada ensaio o IM médio foi 0,23%. Nos animais infundidos com butirato, o índice mitótico aumentou até atingir um pico ($\geq 1,22\%$) entre os dias três e seis. Nos animais controle, o IM não ultrapassou 0,42%. No segundo

estudo (Sakata & Tamate, 1978b), os autores testaram a velocidade de infusão de butirato de sódio sobre a proliferação do epitélio ruminal. Um carneiro foi infundido durante dez segundos com uma solução de butirato de sódio 10% (2 g de butirato/kg de peso vivo por dia), outro carneiro foi infundido com a mesma solução, porém com o volume fracionado ao longo de vinte a 24 horas. Este ensaio foi repetido quatro vezes, trocando-se os tratamentos entre os animais, a cada ensaio. Em todos os carneiros o IM foi menor do que 0,48%, encontrado antes de cada ensaio. Durante as infusões de butirato o IM foi significativamente superior ao IM antes das infusões, até o sexto dia. Os animais infundidos rapidamente com butirato, apresentaram maiores picos de IM do que os animais infundidos lentamente. No terceiro estudo, os autores verificaram os efeitos de acetato e propionato sobre a proliferação do epitélio ruminal (Sakata & Tamate, 1979). Uma solução salina foi utilizada nos animais controle. O IM aumentou após infusão intra-ruminal de propionato e acetato até atingir um pico, dois a quatro dias após o início da infusão e, então, declinou. O efeito mitogênico dos ácidos ficou evidente, porém os autores especularam que o efeito do butirato seria maior do que os efeitos de acetato e propionato, já que os valores de IM encontrados neste experimento foram inferiores aos encontrados nos experimentos com butirato.

Na mesma época, alguns experimentos que mensuraram o IM no epitélio do TGI de animais de laboratório observaram variações deste índice ao longo do dia (Pilgrim et al., 1963). Para verificar a presença de ritmo circadiano no IM do epitélio ruminal de carneiros alimentados regularmente, Sakata & Tamate (1978a) realizaram dois ensaios. No primeiro ensaio, foram realizadas seis biópsias do saco ventral do rúmen de dois carneiros, a cada quatro horas, para se ter uma representação das 24 horas do dia. Os animais foram alimentados uma vez ao dia às 11h com feno e concentrado. No segundo ensaio, os animais foram alimentados às 7h e as biópsias realizadas durante três dias, às 8h e 20h do

primeiro dia, às 12h e 24h do segundo dia e às 4h e às 16h do terceiro dia, representando deste modo as 24 horas do dia. No primeiro ensaio o IM foi mais baixo às 12h (0,32%), aumentou até às 20h (0,70%), quando declinou novamente. No ensaio dois, o IM foi mais baixo às 8h (0,29%) e oscilou em níveis mais altos nas outras coletas (0,60% à 0,93%). Apesar da oscilação circadiana no IM, houve uma clara diferença entre os dois ensaios onde os animais foram alimentados em horários diferentes.

Na tentativa de um maior esclarecimento sobre o ritmo circadino do IM, um novo experimento foi realizado por pesquisadores do mesmo grupo (Ohwada & Tamate, 1983). Três carneiros foram utilizados em três ensaios. Os animais foram alimentados apenas com feno no primeiro ensaio, e com feno mais concentrado no segundo ensaio, uma vez ao dia, às 18h. No terceiro ensaio os animais foram alimentados com feno mais concentrado duas vezes ao dia, às 6h e às 18h. As papilas foram coletadas do saco cranial do rúmen, às 3h, às 7h, às 11h, às 15h, às 19h e às 23h. Os resultados indicaram a presença de ritmo circadiano no IM, que variou de 0,14% a 1,32% no ensaio um, 0,28% à 0,95% no ensaio dois, e 0,25% à 1,45% no ensaio três. Quando os animais foram alimentados uma vez ao dia apenas com feno ou feno mais concentrado, o IM apresentou menor valor uma hora após a alimentação, e houve pequenas diferenças entre o IM das outras coletas. Quando os animais foram alimentados duas vezes ao dia, o menor IM apareceu uma hora após a alimentação da manhã e o pico ocorreu cinco horas após a alimentação da tarde. O ritmo circadiano do IM do epitélio ruminal de animais alimentados duas vezes foi menos evidente do que em animais alimentados apenas uma vez por dia. Os autores concluíram que o IM e seu ritmo circadiano provavelmente são relacionados à frequência e ao momento da alimentação.

Goodlad (1981) também estabeleceu uma relação entre a proliferação celular do epitélio ruminal e o crescimento das papilas de carneiros sob três

dietas, as quais foram formuladas para resultar em diferentes proporções de AGV no rúmen. Inicialmente os animais foram alimentados durante sete meses com uma dieta baseada em forragem. Esta dieta foi alterada gradativamente retirando-se forragem e incluindo-se concentrado, até que no quarto dia não havia mais forragem na dieta. Após 62 dias, a dieta baseada em forragem foi re-introduzida. Observou-se um aumento no IM das células basais do epitélio ruminal, que mudou de 0,58% na dieta de forragem para 1,20% no quarto dia do início da mudança da dieta para concentrado. Após este pico, houve um declínio para um novo nível de atividade mitótica, levemente mais alto do que o observado na dieta de forragem. Houve hipertrofia das papilas quando os carneiros foram alimentados com dieta baseada em concentrados, detectada tanto macro, quanto microscopicamente. Quando a dieta foi mudada novamente para forragem houve uma queda acentuada no IM da camada basal do epitélio das papilas ruminais (0,35%).

Em outro ensaio no mesmo experimento, Goodlad (1981) alimentou dois carneiros por um período com forragem, seguindo outro período de alimentação exclusivamente com concentrados por vários meses. A metil^[3H]timidina foi injetada nos animais como marcador de pares de bases do DNA, visando obter uma determinação quantitativa da divisão celular no epitélio ruminal. O marcador foi injetado no período onde recebiam apenas forragem, na transição de forragem para concentrado e após vários meses com dieta exclusiva de concentrado. O IM na transição da dieta de forragem para concentrado atingiu, nos dias cinco e seis após o início da mudança, aproximadamente o dobro do detectado na dieta de forragem. Isto foi seguido por um agudo declínio, atingindo, no dia oito, valores próximos aos observados inicialmente. A técnica utilizada permitiu ao pesquisador estimar a duração do ciclo celular da camada basal, o qual foi de 23,1 horas na dieta de forragem, diminuindo para 17 horas na transição de forragem para concentrado. Após vários meses ingerindo

concentrado, o ciclo celular da camada basal do epitélio ruminal foi 24,4 horas. O tempo de renovação da camada basal na dieta de forragem foi 7,5 dias, baixando para 1,9 dia durante a transição para concentrados. Após vários meses com concentrado, o tempo estimado de renovação da camada basal foi de 4,1 dias. A estimativa de renovação do epitélio inteiro foi 16,5 dias na dieta de forragem, 4,3 dias na transição de forragem para concentrado e 10,9 dias após vários meses comendo concentrado. A taxa de proliferação celular da camada basal do epitélio foi também calculada. Na dieta de forragem, a camada basal proliferou 9,0%. Na transição de forragem para concentrados esta taxa foi de 32,7% e, após vários meses de concentrado, a proliferação foi de 17,3%. Estes dados indicam que o efeito agudo da introdução de concentrados estimula mais a proliferação celular do que o efeito crônico, provavelmente, porque na transição de forragem para concentrado, uma massa celular bem maior deve ser atingida para possibilitar a absorção e metabolização eficiente de AGV. Uma vez atingida esta massa celular, a proliferação epitelial cai a uma taxa capaz de possibilitar a reposição de células metabolicamente ativas.

Estava bem estabelecido que os AGV realmente estimulavam a proliferação do epitélio ruminal, de forma aguda, *in vivo*, mas o mecanismo pelo qual isto acontecia não estava claro. Experimentos evidenciaram que o ácido butírico inibia a proliferação de células de mamíferos, *in vitro* (Ginsburg et al., 1973). Em culturas primárias de epitélio ruminal, o butirato causou diminuição na incorporação de [³H]timidina, um marcador de síntese, ao DNA celular (Gálfí et al., 1981). Essa contradição entre estudos *in vivo* (Sakata & Tamate, 1978b) e *in vitro* (Gálfí et al., 1981), sugeriam a existência de mediadores, não presentes nas preparações *in vitro*.

A insulina é um dos fatores essenciais para a proliferação de células *in vitro* (Bottenstein et al., 1979). Hamilton & Blackwood (1977) observaram uma depressão da proliferação celular do epitélio oral de ratos com diabete induzida

experimentalmente com haloxano¹. Para verificar o efeito da insulina na proliferação do epitélio ruminal Sakata et al. (1980) alimentaram dois carneiros adultos, adaptados com cânulas ruminais, com 300 g de concentrado e 700 g de feno apenas uma vez ao dia em um período pré-experimental. O alimento, a água e a mistura mineral foram removidos uma hora antes do início de cada ensaio experimental. Em cinco ensaios, infundiram insulina (0,125 UI/kg de peso corporal por hora) juntamente com glicose (300 mg/kg de peso corporal por hora) para prevenir hipoglicemia. Em dois ensaios controles, infundiram apenas glicose (300 mg/kg de peso corporal por hora). Em outro ensaio controle, administraram apenas solução salina fisiológica (solução de cloreto de sódio a 0,154 M). As soluções foram infundidas na veia jugular externa direita por seis horas, à taxa de 0,5 mL/minuto, com uma bomba peristáltica. Amostras de sangue da veia jugular externa esquerda foram coletadas uma hora antes da infusão, no momento da infusão e uma, duas, três, quatro, cinco, seis, nove, 12, 24 e 48 horas após o início da infusão. Biópsias de três a cinco papilas do saco cranial foram realizadas através da cânula ruminal às zero, três, seis, 12, 24 e 48 horas após as infusões. O IM dos carneiros que receberam insulina mais glicose aumentou significativamente entre zero e três horas após a infusão, permaneceu alto até as 24 horas e retornou ao valor inicial às 48 horas. Nos carneiros infundidos apenas com glicose, o IM também aumentou significativamente entre seis a 24 horas. O IM do controle com salina não mostrou flutuações marcadas durante o experimento. O aumento no nível do IM dos carneiros infundidos com insulina e glicose foi significativamente mais alto do que naqueles recebendo apenas glicose.

Outro experimento, objetivando esclarecer a contradição entre o efeito do butirato *in vitro* e *in vivo*, foi realizado por Gálfi et al. (1986), utilizando três ovelhas com cânula ruminal alimentadas com feno *ad libitum* e 400 g de

¹ Haloxano: causa morte específica das células β das Ilhotas de Langerhans.

concentrado dividido em duas alimentações diárias. Em duas ovelhas foram feitas infusões intra-ruminais de butirato de sódio (2 g/kg de peso corporal) diariamente, por nove dias. Um dos animais recebeu infusão contínua através de uma bomba peristáltica. O outro recebeu infusão rápida dentro de um a dois minutos, uma vez ao dia. O terceiro animal foi tratado com infusão rápida de solução salina fisiológica. Papilas ruminais foram coletadas diariamente e cultivadas em presença de [³H]timidina ou preparadas histologicamente. Fluido ruminal foi coletado para determinação da concentração de AGV. A ovelha que recebeu infusão contínua de butirato teve uma alta concentração deste AGV no rúmen por volta do segundo dia de infusão, enquanto a incorporação de [³H]timidina pelas papilas ruminais tendeu a diminuir continuamente até o último dia de infusão, alcançando apenas 20% em relação ao controle. O IM da camada basal de células epiteliais foi particularmente baixo do quarto ao nono dia. O número de células da camada córnea foi maior em relação ao controle e as células da camada espinhosa foram menos numerosas. Nas amostras coletadas no nono dia, houve uma marcante diminuição das cunhas epiteliais. A ovelha que recebeu infusão aguda teve um nível médio mais baixo de butirato intra-ruminal em relação àquela com infusão contínua e apresentou um aumento acentuado de incorporação de [³H]timidina pelas papilas ruminais. No nono dia, a incorporação de [³H]timidina foi duas vezes maior em comparação ao controle. Observou-se também um alto IM da camada basal do epitélio das papilas do rúmen. Simultaneamente, foi observado um aumento no número de células da camada espinhosa e, aos nove dias um alongamento das cunhas epiteliais em relação ao controle. Estes resultados mostraram que ocorre inibição de divisão celular na presença contínua de butirato no rúmen, semelhante aos resultados observados nos experimentos *in vitro*.

A partir desses trabalhos pode-se concluir que o efeito prevalente do butirato *in vivo*, anti-proliferativo local ou pró-proliferativo sistêmico, é

determinado pela quantidade de butirato, ou seja, o efeito do butirato é dose-dependente. Nesse contexto, o metabolismo epitelial de butirato desempenha papel fundamental na prevenção dos efeitos indesejáveis deste ácido (Gäbel et al., 2002). Um trabalho aplicado relacionado ao tema foi realizado por pesquisadores húngaros na década de 1980 (Kutas et al., 1983), com o objetivo de verificar o efeito profilático da monensina¹ na ocorrência de paraqueratose ruminal de ovinos de engorda. Dez cordeiros foram alimentados com uma dieta rica em concentrados. A dieta de cinco animais foi suplementada com 10 mg/kg de monensina. Ao final do período experimental o rúmen de cada animal foi examinado macro e microscopicamente. O escore médio de paraqueratose, onde também se levou em conta a hiperqueratose², no grupo controle foi o dobro dos animais que consumiram monensina. Além disso, os escores de papilas aderidas e de papilas com crescimento anormal foram maiores no grupo controle. Isso provavelmente ocorreu pela menor produção de butirato nos animais que consumiram monensina, indicada por menor concentração deste ácido no fluido ruminal (11,8 mM vs 22,5 mM).

Baldwin (1999) comparou os efeitos da insulina, do IGF-1 e do fator de crescimento epidérmico sobre a proliferação de células do epitélio ruminal de ovinos, cultivadas *in vitro*. Os efeitos do butirato e do propionato também foram avaliados. Um grupo de células foi incubado do soro fetal bovino (controle positivo). As taxas de proliferação das células das culturas contendo insulina, IGF-1 e fator de crescimento epidérmico foram, respectivamente, 75%, 96% e 97% da proliferação da cultura contendo soro fetal bovino. Não houve diferença significativa entre os efeitos do fator de crescimento epidérmico e do soro fetal bovino. A presença de butirato ou de propionato reduziu a proliferação celular.

¹ Monensina: antibiótico ionóforo. Modifica a microbiota, resultando em menor produção de metano, maior proporção de propionato e menores proporções de acetato e butirato no total de AGV produzido.

² Hiperqueratose: espessamento da camada córnea do epitélio (Jensen et al., 1958).

A adição de butirato, nas culturas contendo os fatores de crescimento, reduziu a proliferação celular. Neste trabalho ficou demonstrada a importância de fatores de crescimento locais, como o fator de crescimento epidérmico, na proliferação do epitélio ruminal.

Ainda para esclarecer os mecanismos pelos quais os AGV estimulam a proliferação do epitélio ruminal, Shen et al. (2004) testaram a hipótese de que as alterações morfológicas nas papilas ruminais, causadas pelo nível de ingestão e o teor de energia da dieta são acompanhadas por mudanças na concentração plasmática do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e do número de receptores de IGF-1 (IGF-1R) nas papilas ruminais. Vinte e quatro cabritos com idade de três meses, consumindo feno e concentrado (1,5 vezes a manutenção de energia e duas vezes a manutenção de proteína), foram aleatoriamente alocados a um de dois grupos: alto teor de nutrientes (90 g/kg^{0,75} de concentrado e feno *ad libitum*) ou baixo teor de nutrientes (20 g/kg^{0,75} de concentrado e feno *ad libitum*). Os animais receberam concentrado uma vez ao dia. Amostras de sangue foram coletadas um dia antes do início do período de comparação (duração de 42 dias) e depois semanalmente por punção venosa da jugular externa em tubos com heparina. O sangue foi centrifugado e o plasma congelado para análise de IGF-1. Ao final do período experimental, os animais foram sacrificados, amostras de fluido ruminal foram congeladas para determinação da concentração de AGV e biópsias da mucosa ruminal foram realizadas. A concentração de AGV não diferiu entre os grupos. A proporção molar de acetato foi menor e a de butirato foi maior no grupo recebendo maior concentração de nutrientes. O comprimento, a largura e a superfície das papilas foram maiores no grupo que recebeu maior concentração de nutrientes. A concentração plasmática de IGF-1 no grupo que recebeu uma dieta com alto teor de nutrientes foi aproximadamente duas vezes mais alta do que a do grupo que consumiu dieta com menor concentração de nutrientes. A capacidade de ligação máxima dos

receptores de IGF-I nas papilas ruminais foi maior no grupo que consumiu mais nutrientes, entretanto, não houve um efeito da dieta na abundância de mRNA para IGF-1 e para receptores de IGF-1 nas papilas ruminais. Além disso, células do epitélio ruminal, de ambos os grupos incubadas *in vitro* na presença de IGF-1, apresentaram maior síntese de DNA, indicando maior proporção de células proliferativas. Com este experimento, ficaram indícios de que a ação estimuladora da insulina sobre a proliferação do epitélio ruminal, *in vivo* (Sakata et al., 1980), pode ser por meio de IGF-1.

Muitas pesquisas já haviam sido realizadas, utilizando a taxa de mitoses como indicadora da proliferação celular. Mesmo conhecendo a importância da ocorrência de mitoses para regulação da população de células do epitélio ruminal, Tamate & Fell (1977) estudaram a influência da deleção celular (apoptose) na regulação da população de células do epitélio ruminal. É importante citar que a apoptose, descrita por Kerr et al. (1972), era um conceito relativamente moderno na época. Para tal estudo, Tamate & Fell (1977) utilizaram dois carneiros adaptados cirurgicamente com cânulas ruminais. Os animais foram alimentados inicialmente com feno e concentrado para suprir a manutenção e passaram a ser alimentados com feno e concentrado *ad libitum* e, então, tiveram a dieta alterada abruptamente para feno. A maior ingestão foi acompanhada de hiperplasia do epitélio e de aumento no IM, além de escassez de células em apoptose. Quando a dieta foi alterada para feno o índice mitótico diminuiu agudamente. Durante este período, a morte de células por apoptose contribuiu para a extensiva perda celular, principalmente nas regiões das cunhas epiteliais. Fagossomas foram frequentemente vistos na camada basal do epitélio. As principais mudanças nas células apoptóticas, vistas por microscopia eletrônica, foram a agregação e a aderência da cromatina à membrana nuclear, o acúmulo de material elétron-luzente no núcleo picnótico, a formação de pontes de cromatina através do núcleo e a marcada endentação da membrana nuclear.

Apesar de o estudo ter sido qualitativo no que se refere à ocorrência de apoptoses, os autores concluíram que a combinação de supressão das mitoses e aumento da deleção celular é um potente mecanismo para a redução rápida da população de células do epitélio ruminal.

Como supracitado, no início da década de 1960, Sutton et al. (1963a) demonstraram que a capacidade de absorção de AGV pelo epitélio ruminal é positivamente correlacionada com o desenvolvimento papilar. Assim, a manipulação do crescimento papilar em vacas leiteiras periparturientes poderia ser uma estratégia para minimizar a ocorrência de distúrbios metabólicos relacionados ao acúmulo ruminal de AGV. Pensando nisso, dois trabalhos foram realizados na década de 1980. No primeiro trabalho, os pesquisadores avaliaram o tempo necessário para o desenvolvimento das papilas ruminais e o correlacionaram com a capacidade de absorção de AGV (Dirksen et al., 1985). Dois experimentos foram conduzidos. O primeiro, envolvendo o estudo morfológico, foi conduzido utilizando nove vacas da raça holandesa adaptadas cirurgicamente com cânulas ruminais. Biópsias da mucosa ruminal foram realizadas em intervalos de uma ou duas semanas, a partir de oito ou nove semanas pré-parto até oito semanas pós-parto. As amostras foram analisadas macro e microscopicamente. Com o início do período seco a energia da dieta foi reduzida drasticamente. Duas semanas antes do parto os animais passaram a receber uma dieta para vacas em lactação com alto teor energético. Durante o período seco, com a dieta pobre em energia, houve uma redução progressiva da mucosa ruminal, observada tanto macro quanto microscopicamente. Quando os animais passaram a receber uma dieta rica em energia iniciou-se um processo intenso de proliferação da mucosa ruminal, que pôde ser observado até a última semana do experimento (oitava semana pós-parto). O segundo experimento, envolvendo os ensaios de absorção, foi realizado utilizando duas vacas da raça holandesa não lactantes, não gestantes, adaptadas com cânula ruminal, ao final

de três períodos alimentares diferentes: 1) dieta pobre em energia, 2) dieta rica em energia e 3) dieta pobre em energia; com durações de sete a 14 semanas cada. Na ocasião dos ensaios o conteúdo ruminal foi evacuado e o rúmen foi lavado com água. Um tubo de plástico foi inserido no esôfago para prevenir influxo de saliva. O orifício retículo-omasal foi ocluído com um balão inflável. Vinte litros de uma solução tamponada contendo uma mistura de AGV (acetato, propionato e butirato) foi introduzida no ruminorretículo e amostras foram coletadas a cada trinta minutos por quatro a cinco horas, para determinação da concentração de AGV. A concentração de AGV diminuiu mais rápido nos períodos de alta energia do que nos períodos de baixa energia. Com os dados mostrados em um gráfico foi possível estimar a taxa fracional de absorção média dos AGV (k_a). Nos períodos de baixa energia a k_a foi 21,6%/h e nos períodos de alta energia a k_a foi 82,0%/h, ou seja, um aumento de 3,8 vezes na velocidade de absorção de AGV. Esta maior velocidade de absorção também pôde ser observada no tempo necessário para redução da concentração de AGV em 50% da concentração inicial. Nos períodos de baixa energia este tempo foi em média 207 minutos e nos períodos de alta energia foi 56 minutos, ou seja, uma redução de 3,7 vezes no tempo necessário para a concentração inicial de AGV reduzir em 50%. A quantidade de AGV absorvido por minuto, durante a primeira hora do ensaio, foi 2,7 vezes maior nos períodos de alta energia do que nos períodos de baixa energia. Os autores concluíram que, além de contribuir para estabilizar o ambiente ruminal, a adaptação da mucosa contribuiu para maior absorção de energia. No segundo trabalho, os pesquisadores compararam o desenvolvimento morfológico da mucosa ruminal de vacas leiteiras submetidas ou não a uma dieta de transição, 14 dias pré-parto (Liebich et al., 1987). Biópsias de mucosa foram realizadas no saco ventral do rúmen de 11 vacas da raça holandesa, a partir de nove semanas antes do parto até oito semanas após o parto. Seis vacas receberam uma dieta rica em energia 14 dias antes do parto (transição) e as

outras cinco vacas uma dieta pobre em energia. Todas as vacas receberam uma dieta rica em energia após o parto. Os animais apresentaram redução das dimensões da mucosa durante a dieta de vacas secas (pobre em energia). As vacas que receberam a dieta de transição iniciaram um processo de proliferação da mucosa antes do parto com a mudança de dieta, mas o outro grupo apresentou uma redução progressiva da mucosa até o parto. Ao final de oito semanas, após o parto, o desenvolvimento da mucosa ruminal de ambos os grupos superou o nível que os animais apresentavam ao final da lactação.

Uma grande falha destes trabalhos, além do pequeno número de unidades experimentais, é a falta de informações sobre a ingestão de matéria seca. No experimento realizado por Tamate & Fell (1977), a ingestão de matéria seca influenciou significativamente a proliferação do epitélio ruminal. Normalmente vacas leiteiras reduzem 30% a 35% da ingestão de alimentos nas últimas três semanas pré-parto (Grummer, 1995). Num experimento com nove vacas secas gestantes, a diminuição na ingestão de matéria seca iniciou dois dias antes do parto e atingiu, no dia do parto, uma redução de 60% em relação à matéria seca ingerida três dias antes (Vazquez-Añon et al., 1994). Por outro lado, a ingestão de matéria seca aumenta no pós-parto até atingir um pico entre dez e 14 semanas de lactação (NRC, 1989). Nos experimentos de Dirksen et al. (1985) e Liebich et al. (1987) a involução da mucosa ruminal durante o período seco provavelmente se deu pela redução na ingestão de energia. A ingestão de nutrientes é uma função da ingestão de matéria seca e do teor daqueles nutrientes na dieta. Nestes experimentos, quando a dieta foi alterada para alto teor de energia, a ingestão deste nutriente foi maior, levando a uma maior proliferação da mucosa ruminal, a qual responde agudamente ao consumo energético. No trabalho de Goodlad (1981) todo o epitélio ruminal foi renovado em quatro dias, na transição de uma dieta rica em forragem para uma dieta rica em concentrados. Entretanto, como a ingestão de matéria seca no pós-parto

aumenta gradualmente até a décima ou décima quarta semana (NRC, 1989), o maior aporte energético recebido pelas vacas neste período possibilitou uma rápida recuperação das dimensões da mucosa mesmo daquelas vacas que não receberam uma dieta rica em energia no pré-parto (Liebich et al., 1987). Além disso, o aumento papilar até a oitava semana do experimento poderia ser explicado pelo aumento na ingestão de matéria seca (Tamate & Fell, 1977), que proporcionou um maior aporte energético. Logo, a utilização de dietas de transição para vacas leiteiras visando desenvolver a mucosa ruminal e aumentar a capacidade de absorção de AGV no peri-parto deve ter sua eficácia reavaliada. Estudos que comparem as taxas fracionais de absorção de AGV em vacas submetidas ou não à dieta de transição devem ser realizados com um maior número de unidades experimentais e utilizando-se técnicas que possam fornecer essas estimativas em condições próximas das fisiológicas.

Objetivando definir melhor o crescimento visceral durante a lactação, Baldwin et al. (2004) abateram 21 vacas multíparas holandesas em quatro estágios de lactação: 14, noventa, 120 e 240 dias em lactação. Com o estágio de lactação a ingestão de matéria seca aumentou até noventa dias e teve uma redução até o dia 240 pós-parto (efeito quadrático). O peso de carcaça declinou até o dia 120 e então aumentou até 240 dias. Como porcentagem do peso vivo, rúmen, intestino delgado e fígado aumentaram o peso do dia 14 até o dia 120 pós-parto e a partir daí reduziram o peso até o dia 240 (efeito quadrático). Houve uma tendência quadrática ($P = 0,10$) de aumento no peso do omaso como porcentagem do peso vivo, semelhantemente ao rúmen. Mais uma vez ficou evidente a influência da ingestão de matéria seca no desenvolvimento do proventrículo.

Greenwood et al. (1997) trabalharam com 12 bezerros, fornecendo-lhes dietas com os mesmos ingredientes, mas com tamanhos de partículas diferentes. O comprimento das papilas ruminais aumentou quando o tamanho de partículas

de dieta diminuiu, o mesmo acontecendo com o percentual de queratina em relação as demais camadas do epitélio ruminal, o que reduziu a proporção de células epiteliais metabolicamente ativas. O pH ruminal foi mais baixo nas dietas com partículas menores, mas não existiram diferenças significativas entre as concentrações ruminais de AGV. O peso do omaso vazio foi maior nos animais alimentados com menor tamanho de partícula. A concentração ruminal de AGV representa o balanço entre a taxa de produção e a taxa de remoção. Se o pH do rúmen dos animais consumindo a dieta com partículas menores apresentou-se mais baixo, provavelmente a taxa de remoção dos AGV era maior (Danielli et al., 1945; Dijkstra et al., 1993). Se a concentração de AGV foi semelhante e a taxa de remoção, teoricamente, era maior, pode-se especular que a quantidade de AGV produzida foi maior neste grupo, o que culminou em maior desenvolvimento das papilas ruminais e do omaso.

Beharka et al. (1998) estudaram o efeito da forma física da dieta sobre o desenvolvimento morfológico do rúmen. Visualmente não puderam observar diferenças óbvias na forma, distribuição e comprimento das papilas ruminais entre os diferentes tratamentos. Entretanto, o exame microscópico revelou que papilas oriundas do saco cranial apresentaram menos alterações de forma e comprimento como resposta à dieta do que aquelas oriundas de outras regiões do rúmen. Este trabalho indica que o saco cranial do rúmen é menos sensível a alterações da dieta.

McLeod & Baldwin (2000) avaliaram os efeitos da razão forragem:concentrado da dieta e da ingestão de energia metabolizável sobre o crescimento de órgãos viscerais de 28 ovinos. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em um arranjo fatorial 2x2: 75% de forragem ou 75% de concentrado e 0,099 ou 1,81 Mcal de energia metabolizável por kg^{0,75}. Após 52 dias de tratamento, os animais foram abatidos para mensuração da massa dos órgãos viscerais. O peso do trato digestório total (rúmen, retículo, omaso,

abomaso e intestinos) aumentou com a ingestão de energia metabolizável e foi maior nos animais consumindo 75% de forragem do que naqueles consumindo 75% de concentrado. O peso do rúmen não foi afetado pela dieta, mas foi maior nos animais com maior ingestão de energia. Os pesos do retículo e do omaso aumentaram com a maior ingestão de energia, entretanto, foram menores nos animais que consumiram uma dieta com 75% de concentrado. As concentrações de DNA e RNA do epitélio ruminal aumentaram com a maior ingestão de energia, sugerindo que o crescimento ruminal ocorreu via hiperplasia celular. O aumento no peso do omaso parece ter sido estimulado por maior teor de forragem na dieta. Em um estudo realizado por Bueno & Ruckebusch (1974), a motilidade do omaso de carneiros consumindo dieta peletizada foi significativamente menor do que a motilidade daqueles consumindo forragem grosseira. A redução na motilidade do omaso, nos animais consumindo péletes, foi semelhante a de animais submetidos a jejum de 48 horas após consumir feno. Como grande parte do peso do omaso, provavelmente, é representada por tecido muscular, a ingestão de alimentos grosseiros leva ao desenvolvimento da musculatura lisa e ao maior peso deste órgão. Experimentos que demonstrem o desenvolvimento da mucosa e da capacidade absorptiva do omaso devem ser realizados.

Na tentativa de estabelecer um procedimento para amostragem da mucosa ruminal e determinar as regiões do rúmen mais sensíveis a alterações como respostas de tratamentos manipuladores da morfologia ruminal, Lesmeister et al. (2004) utilizaram 42 bezerros holandeses em quatro experimentos. Foram realizadas biópsias de várias regiões do rúmen, incluindo saco cego caudo-dorsal, saco cranial, saco ventral e saco cego caudo-ventral. O comprimento, a largura e a densidade papilar (número de papilas/cm²), assim como a espessura da parede ruminal foram determinadas. Correlações entre regiões do rúmen e entre experimentos foram realizadas. Os resultados

indicaram que papilas obtidas dos sacos cranial e ventral foram melhores para representar o desenvolvimento do rúmen inteiro. Além disso, o comprimento e a largura de papilas foram mais responsivos aos diferentes tratamentos do que a espessura da parede ruminal. A densidade papilar não foi eficiente para refletir as diferenças entre tratamentos.

Costa (2003), avaliando as alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerros, observou que estes AGV induziram aumento no peso do proventrículo em relação aos animais que receberam solução salina. As infusões dos AGV tenderam a aumentar o peso e a proporção de epitélio e conjuntivo subepitelial no saco cranial do rúmen, mas reduziram o número de papilas por cm² de parede ruminal. Embora o butirato tenha sido mais estimulador da secreção de insulina, este AGV foi incapaz de estimular um aumento de superfície ou altura das papilas. Todos os AGV aumentaram a proliferação das células da camada basal do epitélio ruminal, verificada por maiores índices mitóticos. Somente o propionato tendeu a aumentar o tamanho papilar no saco cranial do rúmen. O butirato e o lactato foram mais indutores de alterações patológicas no epitélio ruminal. Os efeitos dos AGV sobre a morfologia da mucosa ruminal e dos outros tecidos queratinizados, levou a autora a sugerir que os danos morfológicos no epitélio ruminal e nos cascos podem ter causa comum, explicando a ocorrência simultânea de anomalias nessas estruturas, em bovinos acometidos por acidose ruminal.

Frequentemente não são observados efeitos simultâneos da dieta sobre a morfologia da mucosa ruminal e a capacidade absorptiva do rúmen (Gäbel et al., 1993; Gäbel & Aschenbach, 2002). Com os objetivos de induzir variações na morfologia da parede ruminal por meio da dieta e estabelecer marcadores morfológicos eficientes para epitélio ruminal, Resende Júnior et al. (2006a) realizaram dois experimentos. No primeiro, sete vacas adaptadas cirurgicamente

com cânula ruminal foram alimentadas com feno de coastcross *ad libitum* e concentrado, fornecido uma ou quatro vezes ao dia, por 19 dias, seguidos por 72 horas de jejum. Papilas ruminais foram coletadas nos dias zero, quatro, 12 e 19 do período de tratamento e 24, 48 e 72 horas após o início do jejum. Baixa frequência de alimentação concentrada foi associada a um aumento da concentração de insulina plasmática ao longo do tempo após a alimentação e a um maior IM, mas não afetou outros parâmetros morfológicos. No experimento dois, foram realizados dois ensaios não-simultâneos com três ovinos canulados no rúmen, consumindo silagem de alfafa e milho moído, os quais foram submetidos abruptamente a 72 horas de jejum. Papilas ruminais foram coletadas no final do período de alimentação e no final do jejum. O IM foi mais alto no período de alimentação do que no período de jejum, mas outros parâmetros morfológicos não foram capazes de responder à variação nutricional. Entre os marcadores morfológicos estudados o IM pareceu ser a melhor variável para avaliação da resposta morfológica do epitélio ao plano alimentar. Os autores citaram que a frequência de alimentação concentrada pode ser uma estratégia para regular a morfologia das papilas ruminais, porém o jejum pode ter efeitos deletérios, de forma aguda, sobre a morfologia da mucosa ruminal.

Já se discutiu anteriormente que o tamanho das papilas ruminais não depende apenas da proliferação epitelial, mas também do fluxo sanguíneo para o órgão (Tamate et al., 1974). Schnorr & Vollmerhaus (1968), fazendo uma descrição macro e microscópica minuciosa da arquitetura vascular do rúmen, citaram a importância da micro-circulação para a mucosa ruminal, por receber os produtos absorvidos e metabolizados pelo epitélio. Neste trabalho também se pôde notar a grande participação dos vasos sanguíneos no volume das papilas ruminais.

Usando micro-esferas radioativas marcadas com ^{141}Ce , ^{51}Cr e ^{85}Sr , Von Engelhardt & Hales (1977) mensuraram o fluxo sanguíneo capilar para o

proventrículo de oito carneiros castrados com um a três anos de idade, pesando 22 a 32 kg. Os animais foram alimentados com 600 g de ração peletizada contendo 60% de alfafa e 40% de aveia. A última alimentação foi fornecida 18 horas antes das observações experimentais. Ao final do período experimental os animais foram abatidos e fragmentos da parede foram coletados do rúmen, do retículo e de uma das lâminas do omaso. O fluxo sanguíneo capilar para o proventrículo total foi em média 7,7 mL/minuto por kilograma de peso vivo e representou 7% do débito cardíaco. Noventa e cinco por cento do fluxo foi para a mucosa e apenas 5% para a túnica muscular. O fluxo sanguíneo para o rúmen foi seis vezes maior do que para o retículo e 4,4 vezes maior do que para o omaso. Do fluxo sanguíneo para a mucosa do proventrículo, 72% se destinaram à mucosa do rúmen, 12% à mucosa do retículo e 16% à mucosa do omaso. Do fluxo sanguíneo para a túnica muscular do proventrículo, 60% se destinaram às camadas musculares do rúmen, 20% às camadas musculares do retículo e 20% às camadas musculares do omaso. O fluxo capilar na mucosa do omaso, por unidade de superfície de parede, foi um terço daquela para o saco ventral do rúmen, que foi aproximadamente o dobro daquele do saco dorsal. Quando os animais foram submetidos à estresse térmico o fluxo sanguíneo para proventrículo diminuiu, principalmente para a mucosa. Além das excelentes informações geradas por este trabalho, pode-se sugerir que animais em estresse térmico teriam menor capacidade de remoção dos produtos finais da fermentação e maior chance de serem acometidos por distúrbios metabólicos.

No experimento de Von Engelhardt & Hales (1977) a distribuição de sangue nos compartimentos do proventrículo foi estudada 18 horas após a remoção dos alimentos. Para estudar o efeito da alimentação nas mudanças de fluxo sanguíneo para as diferentes regiões do canal alimentar, Barnes et al. (1983) utilizaram nove carneiros com pesos entre 27 e 39 kg, que consumiram duzentos gramas de concentrado peletizado e feno *ad libitum*. O fluxo sanguíneo

foi estimado, por injeção de micro-esferas radioativas no ventrículo esquerdo, vinte a trinta minutos antes, três a quatro minutos depois e duas e quatro horas após o início da alimentação. Dentro de três minutos após o início da alimentação, os fluxos sanguíneos para as glândulas salivares e para a musculatura lisa do ruminorretículo aumentaram três vezes. Os fluxos sanguíneos para as mucosas do rúmen e do retículo também aumentaram antes que qualquer efeito da fermentação ruminal possa ter ocorrido. Duas horas após a alimentação, os fluxos para as mucosas do rúmen e do retículo foram duas a quatro vezes maiores do que antes da alimentação. O fluxo sanguíneo para o omaso diminuiu durante a alimentação, mas depois se recuperou. Os fluxos sanguíneos para abomaso, duodeno e íleo não se alteraram durante a alimentação, mas reduziram significativamente duas e quatro horas depois. Não houve alterações no restante do intestino delgado, no intestino grosso, no pâncreas e no baço. Entretanto, o fluxo sanguíneo para o omento e a gordura mesentérica diminuiu abruptamente com a alimentação e atingiu um valor mínimo duas horas após. O fluxo sanguíneo subepitelial para ruminorretículo foi o único a contribuir para um aumento no fluxo sanguíneo portal após a alimentação.

2.3 ABSORÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS PELO PROVENTRÍCULO

O interesse em estudar a produção e a absorção de AGV no TGI dos ruminantes vem de longa data. Um trabalho clássico foi realizado por Barcroft et al. (1944), que demonstraram a absorção de AGV pelo TGI de um carneiro, através de coleta de sangue dos vasos que drenam o rúmen, o retículo, o omaso, o abomaso, o intestino delgado e o ceco. As amostras de sangue dos vasos que drenam o rúmen e o retículo apresentaram as maiores concentrações de AGV. A concentração de AGV no sangue venoso do omaso foi aproximadamente 45%

daquela encontrada do sangue venoso do rúmen e do retículo. As concentrações de AGV no sangue dos vasos que drenam o abomaso e o intestino delgado foram insignificantes. Entretanto, a concentração de AGV no ceco voltou a ser alta e significativa. Os autores também demonstraram que após a infusão de acetato, propionato ou butirato no rúmen evacuado e lavado, a quantidade recuperada foi maior para acetato, seguido de propionato e por último butirato. Naquela data, ainda não se pensava em metabolismo de AGV pela parede do proventrículo, o que levou os autores a concluir erroneamente que a velocidade de absorção de acetato era maior do que a do propionato, que era maior do que a do butirato. Apesar desta conclusão, ficou evidente o papel do proventrículo na absorção dos AGV produzidos no ruminorretículo.

Na mesma época, Danielli et al. (1945) pesquisaram a absorção de AGV pelo rúmen de ovinos adultos. Para isso, o rúmen foi evacuado pela cânula e uma solução de AGV com pH alto (7,4) ou baixo (5,8) foi introduzida no órgão. Os animais foram anestesiados e a cavidade abdominal aberta para aplicação de ligaduras na base do esôfago e na altura do óstio omaso-abomasal (excluindo-se os vasos epiplóicos), para evitar o escape da solução infundida. Os AGV foram absorvidos mais rapidamente em pH baixo do que em pH alto, indicando maior permeabilidade do tecido às formas não dissociadas dos ácidos. Em pH 7,4 houve pequenas diferenças na velocidade de absorção de acetato, propionato e butirato, porém em pH 5,8 a velocidade de absorção seguiu a ordem butirato > propionato > acetato. À medida em que os AGV eram absorvidos, a concentração de sódio diminuía, uma evidência da participação do sódio no transporte epitelial de AGV.

Masson & Phillipson (1951), também investigaram a absorção de AGV pelo rúmen de ovinos. Os autores verificaram que os AGV absorvidos pelo rúmen não apareciam totalmente no sangue que drena o órgão e geraram duas hipóteses: 1) parte dos AGV absorvidos eram carregados pelo sistema linfático; e

2) os AGV eram metabolizados pela parede do rúmen. No mesmo trabalho, verificou-se que esta diferença era maior para o butirato do que para o acetato e o propionato, existindo uma pequena diferença entre os últimos. A concentração sanguínea do butirato foi menos de um quarto da concentração dos outros ácidos. Com isso os autores especularam que o metabolismo de acetato e propionato poderia ser menor do que o de butirato. O acetato foi o único AGV com concentrações significativas no sangue arterial, o que fez pensar que este ácido escapou do metabolismo da parede ruminal e do fígado. Provavelmente, o propionato foi convertido à glicose no fígado. Durante a absorção dos AGV houve aumento na concentração intra-ruminal de cloreto e, principalmente, de CO₂. A relação entre a absorção de AGV e o aumento na concentração de CO₂ foi linear. Os dados deste trabalho sugeriram a possibilidade de trocas entre substâncias do fluido ruminal e do sangue, durante a absorção de AGV.

Estudando a absorção de acetato, propionato e butirato em carneiros alimentados ou submetidos a jejum, Pfander & Phillipson (1953) infundiram soluções com pH próximo a 5,7 e proporções de acetato, propionato e butirato 63:21:15, no rúmen evacuado e lavado, e observaram que a quantidade de moles absorvidos seguiu a ordem acetato > butirato > propionato. Isso provavelmente ocorreu porque o acetato foi infundido em maiores proporções e o butirato apresentou a maior velocidade de absorção entre os ácidos por causa do baixo pH (Danielli et al., 1945). Num outro ensaio, em que os autores avaliaram o efeito da remoção dos alimentos, pôde-se observar uma queda abrupta na absorção de AGV nos animais submetidos a jejum (Pfander & Phillipson, 1953).

A absorção de compostos pelo omaso só pode ser quantificada, *in vivo*, a partir do momento em que se compreenda a dinâmica da digesta neste órgão. Porém, existem algumas dificuldades para estudar o omaso. Primeiramente pela localização do órgão na porção intra-costal da cavidade abdominal, entre o sexto e o décimo primeiro espaços intercostais (Nickel et al., 1979). Segundo, sua

cavidade é preenchida por projeções da mucosa, as lâminas do omaso (Nickel et al., 1979), o que dificulta a inserção de dispositivos, a amostragem da digesta e o implante de cânulas. Por último, é difícil isolar o óstio omaso-abomasal da cavidade abdominal para estudos de absorção.

Na metade do século passado, pesquisadores já tinham dúvida sobre a dinâmica da passagem da digesta pelo omaso. O caminho percorrido pelas fases sólida e líquida da digesta entre o retículo e o abomaso era uma interrogação. Desde então, três teorias passaram a existir (Gray et al., 1954): 1ª) as fases líquida e sólida da digesta, que deixam o retículo, atravessam o omaso de forma semelhante, ou seja, não há seleção da fase sólida no omaso; 2ª) durante a contração reticular, parte da fase fluida da digesta atinge o abomaso sem passar por entre as lâminas do omaso; e 3ª) quando a digesta atinge o omaso, este órgão se contrai e expulsa parte da fase líquida ao mesmo tempo que retém a fase sólida da digesta. Na tentativa de entender o fluxo da digesta pelo omaso, Gray et al. (1954) dosaram as concentrações de AGV, amido, nitrogênio, sólidos e lignina nos vários compartimentos do estômago de sete carneiros, imediatamente após o abate. As razões nitrogênio/lignina no rúmen, no retículo e no omaso foram semelhantes, mostrando que a separação das fases sólida e líquida não existiu. Os autores consideraram o nitrogênio como marcador da fase líquida e a lignina como marcador da fase sólida. Para verificar a hipótese de passagem direta de fluido do retículo para o abomaso, os autores compararam as razões amido/lignina entre os compartimentos. Caso esta hipótese fosse verdadeira, o abomaso receberia uma mistura das digestas do retículo e do omaso. A razão amido/lignina foi muito maior no retículo do que no omaso. Caso houvesse uma mistura das digestas, a razão amido/lignina seria intermediária no abomaso. Entretanto, a razão amido/lignina no abomaso foi semelhante à do omaso, o que levou a exclusão das hipóteses que apoiavam uma partição da digesta no omaso. Outro fato que apóia a conclusão dos autores é que partículas grosseiras

raramente foram encontradas no abomaso, o que poderia ser um indicativo da ausência de passagem direta da digesta do retículo para o abomaso. Desde que não houve partição da digesta, os autores estimaram a porcentagem de água e AGV absorvidos pelo omaso, embora de forma empírica, através do aumento na concentração de lignina e da razão AGV/lignina na digesta, respectivamente. Trinta e três a 64% da água e 40% a 69% dos AGV presentes na digesta que deixou o retículo foram absorvidos no omaso.

Boyne et al. (1956) determinaram as alterações da digesta ao longo do TGI de ruminantes, durante um período de 12 horas após a alimentação. Para isso, 24 ovelhas foram abatidas em intervalos de duas horas, após a alimentação. Aproximadamente dois terços do conteúdo total do TGI encontraram-se no ruminorretículo. O teor de matéria seca da digesta no omaso (21,9%) foi maior do que no ruminorretículo (14,2%) e no abomaso (12,7%), demonstrando que a digesta é desidratada no omaso e reidratada no abomaso. A concentração de AGV no omaso foi aproximadamente dois terços daquela do ruminorretículo e dez vezes maior do que a do abomaso. As concentrações de AGV no rúmen e no omaso aumentaram significativamente e paralelamente até quatro horas após a alimentação e depois diminuíram. A concentração de AGV no abomaso foi constante e baixa ao longo do tempo. Os autores concluíram que os AGV produzidos no ruminorretículo foram absorvidos totalmente antes do abomaso.

Para obter informações sobre a absorção de AGV no TGI de bovinos em desenvolvimento, Conrad et al. (1956) determinaram as concentrações de AGV ao longo do TGI de cinco bezerros, com idades entre cinco e 15 semanas, abatidos quatro a seis horas após a alimentação. A dieta consistia de pêletes contendo dois terços de feno e um terço de concentrado e foi ofertada *ad libitum* desde três dias de idade. A concentração de AGV foi alta no ruminorretículo e baixa no abomaso. Concluiu-se que os AGV foram efetivamente absorvidos antes do abomaso e uma considerável importância foi atribuída ao omaso,

devido às suas numerosas lâminas, que contribuem para sua extensa superfície absorptiva.

Ainda na década de 1950, Badawy et al. (1958) realizaram um estudo para tentar esclarecer melhor a passagem da digesta e a absorção de água e AGV pelo omaso. Quinze ovelhas, consumindo feno e concentrado, foram abatidas. A porcentagem de matéria seca da digesta no omaso (16,03%) foi maior do que no retículo (7,86%) e no abomaso (6,22%). A absorção de água no omaso variou de 48 a 55%. A concentração de AGV no retículo (110,8 mEq/100g) foi maior do que no omaso (38,2 mEq/100g) que foi maior do que no abomaso (22,1 mEq/100g). A razão AGV/cinza insolúvel reduziu 77% do retículo para o omaso e 74% do omaso para o abomaso. A porcentagem de matéria seca da digesta tendeu a aumentar do sulco do omaso para a curvatura maior, porém, não houve uma mudança progressiva na direção do retículo para o abomaso. Estes resultados apontam o omaso como importante sítio de absorção de AGV e de desidratação da digesta. Os autores não tiveram grandes conclusões sobre a passagem de digesta pelo omaso.

Johnston et al. (1961) estudaram a absorção de AGV pelo omaso de bezerros com quatro ou cinco meses de idade, em dois ensaios. No primeiro ensaio, seis bezerros foram sacrificados quatro horas após a alimentação. Durante sete dias antes do abate os animais receberam cápsulas de óxido crômico para ajuste das concentrações de AGV e da umidade da digesta. A concentração de óxido crômico na matéria seca da digesta aumentou do rúmen até o abomaso (rúmen > retículo > omaso > abomaso). Na mesma ordem a concentração de AGV diminuiu. A razão AGV/óxido crômico indicou uma diminuição de AGV em 51% do retículo para o omaso e 83% do omaso para o abomaso. No segundo ensaio, dois bezerros tiveram o omaso exteriorizado e o C¹⁴-1-butirato de sódio foi injetado no lúmen do órgão. Cinco a dez minutos após a infusão houve um pico de butirato no sangue que drena o omaso. Uma

fração considerável do butirato foi metabolizada pelo epitélio omasal. Pôde-se concluir que a absorção de ácidos orgânicos ocorre no omaso e em magnitude considerável.

A absorção de AGV pelo proventrículo estava demonstrada. Para determinar a relação entre a capacidade absorptiva e o desenvolvimento estrutural do rúmen, Sutton et al. (1963a) utilizaram cinco bezerros, que consumiram leite, feno de alfafa e concentrado, ou apenas leite. Além do efeito da dieta, os efeitos de idade dos animais, pH ruminal e substituição da digesta por solução salina foram estudados. As taxas de absorção máximas (miligramas de ácido/100 mL de solução por hora) na primeira, quarta, oitava e décima terceira semanas de idade foram, respectivamente, trinta, 163, 179 e 402 para os bezerros alimentados com leite, feno e concentrado e 21, 26, 22 e 22 para aqueles que receberam apenas leite. A absorção de AGV diminuiu após a substituição do conteúdo ruminal por solução salina durante o período de um dia. A utilização de uma solução de AGV ao invés de salina reduziu a depressão. A absorção de AGV foi maior em pH baixo (5,0-5,5) do que em pH alto (7,5-8,0), tanto em animais que receberam leite, concentrado e feno, quanto naqueles alimentados apenas leite. Em pH baixo, a taxa de absorção aumentou com o maior tamanho da cadeia de carbono dos ácidos. Em pH alto, os resultados não foram conclusivos quanto ao tamanho da cadeia de carbono dos AGV.

Thorlacius & Lodge (1973) estudaram os efeitos da dieta, do tampão, do pH e da concentração sobre a absorção de AGV, em duas vacas holandesas não lactantes, adaptadas com cânula ruminal. A absorção de AGV foi mensurada com o rúmen lavado e temporariamente isolado. A absorção de AGV foi mais rápida nas vacas que consumiram uma dieta rica em concentrado do que nas vacas consumindo feno. Quando as concentrações dos tampões, bicarbonato ou fosfato, foram baixas (50 e 40 mM, respectivamente), estes não influenciaram a absorção de AGV, entretanto, quando as concentrações dos tampões testados

foram altas (90 e 75 mM, respectivamente), a absorção de AGV tendeu ser menor na solução com bicarbonato. A diminuição do pH aumentou a absorção dos AGV. Em pH 7,0, as taxas fracionais de absorção de acetato, propionato e butirato foram semelhantes. Em pH 6,5 a taxa fracional de absorção do propionato foi 1,2 e a do butirato 1,4 vezes maiores do que a taxa fracional de absorção do acetato. Em pH 5,5, as taxas de absorção de propionato e butirato foram, respectivamente, 1,6 e 2,4 vezes maiores do que a taxa fracional de absorção do acetato. As variações nas concentrações de acetato e propionato não influenciaram o *clearance* de AGV.

Como discutido na seção sobre desenvolvimento do proventrículo, dietas com alto teor de concentrados aumentam a intensidade de paraqueratose no epitélio ruminal, além de levar a um espessamento da camada córnea (Tamate & Kikuchi, 1978). Para observar o desenvolvimento de hiperqueratose/paraqueratose no epitélio ruminal e a influência destas sobre a absorção de AGV, Hinders & Owen (1965) conduziram um experimento com quatro novilhos. Os animais foram alimentados com feno de alfafa por 33 dias e depois com péletes de alfafa desidratada por 56 dias. Exames macroscópicos, biópsias de papilas para exames microscópicos e mensuração da taxa de absorção de AGV foram realizados ao final do período de alimentação com feno e com péletes. Durante a alimentação com feno, a mucosa apresentou-se normal. Após a mudança de dieta, a morfologia das papilas ruminais variou de simples hipertrofia à hiperqueratose severa. Na microscopia a hiperqueratose foi confirmada. A absorção de AGV, oito semanas após a alteração da dieta, foi 46% menor em três novilhos e 12% maior em um novilho. A quantidade de AGV absorvida diminuiu com o aumento da severidade da hiperqueratose/paraqueratose ruminal.

Até então, maior enfoque era recebido pelo rúmen, no que se referia à produção e à absorção, apesar da importância do omaso no *clearance* de AGV.

Diante disso, dois experimentos foram realizados nos anos de 1970 visando maior entendimento da absorção de AGV no omaso. Bueno et al. (1972), utilizando quatro carneiros adultos, adaptados com cânulas no rúmen e no abomaso, consumindo péletes de gramínea, avaliaram o efeito da remoção cirúrgica parcial das lâminas do omaso. Cerca de 300 cm² de lâminas foram removidos na cirurgia e aproximadamente 1000 cm² de lâminas foram encontrados na necropsia, três meses depois. Os danos cirúrgicos sobre as lâminas do omaso, provavelmente levou a uma redução significativa da superfície deste órgão, já que nos animais do grupo controle a superfície encontrada foi aproximadamente 2000 cm². Amostras de fluido ruminal e abomasal foram obtidas antes e após o procedimento cirúrgico, 3,5 horas após a alimentação, por quatro dias consecutivos. A concentração total de AGV no abomaso aumentou de 6 mM, uma semana antes, para 10 mM e 11 mM, respectivamente, uma e dez semanas após a laminectomia parcial.

Edrise & Smith (1977) tentaram quantificar a porcentagem de AGV, produzidos no ruminorretículo, absorvida no omaso de novilhos alimentados com 60% de forragem e 40% de concentrado ou 33% de forragem e 67% de concentrado. Amostras de digesta foram obtidas do retículo e de uma manga flexível suturada no óstio omaso-abomasal. O polietileno glicol (PEG) foi utilizado como marcador de fase fluida. A produção de AGV no ruminorretículo foi estimada assumindo-se que 62% da matéria orgânica consumida foram degradadas no rúmen e 80% desta eram convertidas em AGV. O fluxo de AGV para os diferentes sítios do estômago foi estimado pela razão AGV/PEG. Da produção estimada de AGV, cerca de 83% foram absorvidas no rúmen, 11% no omaso e o restante passou para o abomaso. Dos AGV que atingiram o omaso, cerca de 62% foram absorvidos neste órgão. Apesar do mérito pelo pioneirismo, este experimento falhou em alguns aspectos, como a estimativa da produção de

AGV e a implantação de uma cânula no óstio omaso-abomasal, que podem ter prejudicado os resultados.

Com os trabalhos discutidos acima, pôde-se concluir que parte dos AGV produzidos no ruminorretículo são absorvidos pela parede do órgão e o restante passa para o omaso, juntamente com a fase fluida. A diferenciação entre os dois fatores do *clearance* ruminal de AGV (absorção e passagem) e a quantificação da participação de cada fenômeno no processo, em bovinos ingerindo grandes quantidades diárias de matéria seca foi realizada em alguns experimentos no final da década de 1980 e no início da década de 1990.

Tamminga & Van Vuuren (1988) publicaram uma revisão sobre formação e utilização dos produtos finais da degradação da lignino-celulose em ruminantes. Para discutir a remoção dos produtos da fermentação do ruminorretículo de vacas em lactação, os autores trabalharam alguns dados publicados por Robinson et al. (1987a,b). Quando a ingestão de matéria orgânica aumentou de 4,8 para 19,0 kg/d a produção de AGV passou de 26,6 moles/d para 80,3 moles/d e o pH ruminal diminuiu de 6,6 para 6,0. Com o aumento da ingestão de alimentos, a contribuição do *clearance* de AGV por passagem aumentou de 30% para 40% do *clearance* ruminal total. Os autores concluíram que a contribuição do *clearance* de AGV por passagem para o omaso é maior em vacas leiteiras do que em carneiros e bezerros.

Peters et al. (1990b) propuseram determinar o desaparecimento ruminal por absorção e passagem de ácido propiônico em novilhos de corte ingerindo grandes quantidades de matéria seca, os quais tinham alta taxa de produção deste ácido. Aproximadamente 66% do ácido propiônico desapareceram por absorção e 34% passaram do ruminorretículo para os compartimentos subseqüentes do TGI. A absorção e a concentração de propionato no rúmen foram relacionadas linearmente com a sua taxa de produção. A passagem de fluido também foi relacionada à taxa de produção de propionato. Os autores concluíram que o trato

digestivo distal ao ruminorretículo era um importante sítio de absorção de propionato em bovinos, quando a taxa de produção deste ácido era alta.

Num outro estudo, os mesmos autores investigaram o desaparecimento de ácido propiônico antes do intestino delgado e ao longo do intestino delgado de novilhos de corte (Peters et al., 1990a). Independentemente do nível de produção de propionato, o desaparecimento por absorção no ruminorretículo foi 40% a 57% e o restante passou para os compartimentos distais juntamente com a fase fluida. Do propionato que deixou o ruminorretículo por passagem, 97% a 99% desapareceram antes de atingir o duodeno, independente do nível de produção. A concentração de ácido propiônico no duodeno não diferiu do íleo e ambos não diferiram significativamente de zero, não sendo constatada, portanto, absorção de propionato no intestino delgado, a menos que a taxa de produção fosse igual à taxa de absorção. Resultados semelhantes foram observados para outros AGV, exceto para a taxa de isobutirato absorvido antes do duodeno (47 a 63%), a qual foi mais baixa do que a dos outros AGV (acima de 90%). Concluiu-se que a absorção de AGV não parece ser um processo biológico limitante em bovinos de corte e que o aumento da capacidade absorptiva do rúmen não necessariamente significaria aumento da performance animal, embora essa afirmação não leve em conta os benefícios do aumento da absorção do epitélio ruminal no controle da acidose ruminal, o que, indiretamente, poderia aumentar a performance de produção.

Dois anos depois, os mesmos autores estudaram o *clearance* ruminal de ácido acético em novilhos de corte (Peters et al., 1992). Em nível de manutenção, a absorção deste AGV representou cerca de 87% do *clearance*. Quando a concentração de acetato aumentou por infusões de ácido acético não marcado, a quantidade de ácido absorvida também aumentou, porém a participação da absorção no *clearance* total, diminuiu para 46,7% do total. Em média o

clearance por passagem contribuiu para 31,62% da remoção dos AGV do ruminorretículo.

Dijkstra et al. (1993), trabalhando com ruminorretículo evacuado e lavado de duas vacas em lactação, examinaram os efeitos de volume de líquido ruminal (10 ou 30 L), pH (4,5; 5,4; 6,3 ou 7,2) e concentração de AGV (20; 50 ou 100 mM de cada AGV, totalizando 170 mM) nas taxas de absorção de acetato, propionato e butirato. As taxas de absorção foram calculadas pelo desaparecimento de AGV do rúmen corrigido pela taxa de passagem de líquido para o omaso. Um aumento no pH inicial do fluido causou uma redução na taxa fracional de absorção do propionato e do butirato. As taxas fracionais de absorção também foram reduzidas pelo aumento do volume inicial do fluido. A taxa fracional de absorção de acetato foi menor em uma concentração inicial de 20mM do que em uma concentração de 50 mM. A taxa fracional de absorção de propionato tendeu a diminuir quando a concentração deste ácido aumentou. A taxa fracional de passagem não foi afetada pelas soluções. Neste experimento, 25% a 47% do *clearance* ruminal ocorreram por passagem com a fase fluida para o omaso.

Gäbel et al. (1993) mensuraram as taxas de absorção de AGV, sódio, cloreto, magnésio e água pelo rúmen lavado e temporariamente isolado, de seis carneiros alimentados com feno e concentrado ou submetidos a 48 horas de jejum. Ao final de cada ensaio, três papilas de três regiões do rúmen (saco cranial e duas porções do saco ventral) foram coletadas por biópsia e fixadas em solução de formaldeído 4%. Quando comparada a de animais alimentados, a concentração ruminal de AGV dos animais submetidos ao jejum diminuiu (76,2 vs 27,1 mM) e o pH aumentou (6,41 vs 7,44). Em nenhum dos três locais, onde as papilas foram extraídas, o jejum levou a alterações significativas da superfície absorptiva. O jejum diminuiu a absorção de todas as substâncias testadas. A diminuição relativa na absorção dos eletrólitos variou de 47% para o Na, 49%

para o Cl à 55% para o Mg. Para os AGV, houve uma redução de 56% na taxa de absorção de acetato, 44% na absorção de propionato e 43% na absorção de butirato. A diminuição na transferência de solutos foi acompanhada por uma diminuição na absorção de água. Em outro experimento, onde o mesmo grupo de pesquisa estudou o efeito do jejum (48 horas) sobre o transporte de 3-O-metil- α -D-glicose (um análogo da glicose, mais resistente ao metabolismo), também não foram observadas alterações na superfície absorptiva das papilas ruminais, apesar da redução significativa no transporte de 3-O-metil- α -D-glicose (Gäbel & Aschenbach, 2002).

Outro experimento foi realizado na década de 1990 para verificar o efeito da subnutrição na habilidade ruminal em absorver AGV (Perrier et al., 1994). Quatro carneiros adultos, adaptados com cânula no saco dorsal do rúmen e no abomaso, foram alimentados com feno por dois períodos sucessivos de quatro semanas. Em um dos períodos, os animais receberam feno para suprir a exigência de manutenção e, no outro, a quantidade de feno foi fornecida para suprir apenas metade da manutenção. A absorção de AGV foi mensurada ao final de cada período, pela técnica do rúmen evacuado e lavado. Três litros de uma solução com pH 6,3 contendo AGV e CoEDTA (marcador de fluido) foram introduzidos no rúmen e amostras de fluido coletadas regularmente durante três horas. A ordem na velocidade de absorção foi butirato > propionato > acetato. A absorção de água não foi significativamente diferente entre os períodos, porém as taxas de absorção de AGV reduziram significativamente após o período de subnutrição (61,8 vs 41,2 mmol/h).

Objetivando estudar os efeitos da pressão osmótica do fluido ruminal sobre a cinética da água e a absorção de AGV no rúmen de ovinos sustentados por infusão intra-gástrica de todos os nutrientes, López et al. (1994) conduziram dois ensaios em que a pressão osmótica foi alterada por infusão de NaCl no ambiente ruminal. A taxa de passagem de fluido mostrou uma correlação

positiva e linear com a pressão osmótica do fluido ruminal. Por outro lado, a absorção de água apresentou uma correlação negativa e linear com a pressão osmótica. Numa pressão osmótica de 341 mosmol/kg o movimento de água pela parede ruminal foi nulo. Com aumento da pressão osmótica houve um aumento do volume de fluido ruminal e uma diminuição da taxa de absorção de AGV, de 232 mmol/h, em pressão osmótica de 350 mosmol/kg, para 191 mmol/h, em pressão osmótica de 490 mosmol/kg, o que levou a um acúmulo de AGV e uma queda no pH ruminal. Apesar dos autores não descreverem as taxas fracionais de absorção e passagem de AGV elas puderam ser calculadas a partir dos outros dados. A contribuição do *clearance* por passagem no *clearance* total aumentou de 12,5%, em pressão osmótica de 260 mosmol/kg, para 28,7%, em pressão osmótica de 490 mosmol/kg, ou seja, um aumento de 2,3 vezes.

Sabia-se que a maioria dos AGV desaparecia antes do duodeno, mas faltava estabelecer a importância quantitativa de absorção do omaso e do abomaso. Rupp et al. (1994) procederam um experimento para mensurar o desaparecimento de AGV através do abomaso em bovinos, utilizando uma técnica de canulação do omaso e do abomaso. Ficou demonstrado que 37% a 38% dos AGV presentes no rúmen atingiram o abomaso e que 8% a 13% atingiram o duodeno, caracterizando o abomaso como um importante sítio de absorção de AGV, o que poderia ser facilitado pelo baixo pH do lúmen, que aumentaria a proporção de AGV na forma não dissociada, favorecendo a absorção passiva pela parede do órgão. Este experimento primou pela dificuldade e caráter inovador da técnica de canulação do omaso e do abomaso, mas apresentou evidências de participação do abomaso na absorção de AGV.

Voelker & Allen (2003) avaliaram os efeitos da substituição de grão úmido de milho por polpa de beterraba peletizada sobre parâmetros da fermentação ruminal, usando oito vacas holandesas múltiparas com cânulas no rúmen e no duodeno. As dietas experimentais com 40% de forragem (silagem de

milho e silagem de alfafa) e 60% de concentrado continham 0%; 6,1%; 12,1% ou 24,3% de polpa de beterraba substituindo milho de alta umidade com base na matéria seca. A concentração de AGV no fluido ruminal foi similar entre as dietas, mas o tamanho do pool ruminal de AGV aumentou quadraticamente com aumento no teor de polpa de beterraba na dieta, com maior valor para 12% de polpa. A taxa fracional de absorção de valerato foi similar para todos os tratamentos (~ 40%/h). A taxa fracional de passagem de fluido reduziu pela substituição de milho por polpa, provavelmente por aumento na consistência do fluido ruminal. Com isso, a contribuição do *clearance* de AGV por passagem, que variou de 29 a 31% do *clearance* total, reduziu com os maiores níveis de polpa de beterraba na dieta. A correlação entre a taxa de absorção de ácido valérico e a concentração ruminal de AGV foi negativa (-0,69, $P < 0,05$), mostrando que as vacas com maior capacidade absorptiva conseguiram manter um ambiente ruminal menos ácido. Quanto maiores foram as taxas de absorção e passagem de valerato, mais alto foi o pH ruminal, o que confirma a hipótese anterior. Além disso, a maior utilização de combustíveis metabólicos para produção de leite pode ter criado um maior gradiente de concentração de AGV entre fluido ruminal e sangue, demonstrado por um aumento na taxa de absorção de valerato com maior produção de leite ($r = 0,49$; $P < 0,01$).

Resende Júnior et al. (2006b), comparando técnicas para a determinação do *clearance* ruminal de AGV do ruminorretículo em vacas Holandesas alimentadas com azevém e concentrado, constataram que o desaparecimento de AGV por passagem com a fase fluida para o omaso correspondeu a aproximadamente 50% do *clearance* total. As taxas fracionais de *clearance* de acetato, propionato e butirato foram semelhantes (~ 30%/h), porém o propionato apresentou maior taxa fracional de absorção do que o butirato. O volume de líquido ruminal foi negativamente correlacionado com as taxas fracionais de *clearance*, absorção e passagem de AGV. Por outro lado, semelhantemente aos

dados encontrados por Voelker & Allen (2003), aumentos nas taxas de *clearance*, absorção e passagem de AGV resultaram em aumento do pH ruminal. No experimento de Resende Júnior et al. (2006b) não se pôde verificar uma correlação entre a produção de leite e as taxas fracionais de *clearance* ($r = -0,04$; $P = 0,85$) ou absorção ($r = -0,01$; $P = 0,96$) de AGV (Resende Júnior - comunicação pessoal).

Os efeitos do volume e do pH da digesta ruminal sobre a absorção de ácido valérico em vacas leiteiras foram avaliados por Melo (2007). Nove vacas canuladas, em três planos alimentares (vacas produzindo em média 25,9 kg/d de leite alimentadas com dieta completa rica em concentrado; vacas produzindo 12,3 kg/d de leite alimentadas com silagem de milho, pasto e concentrado; e vacas secas alimentadas com pasto), foram utilizadas. Biópsias da mucosa ruminal foram realizadas uma semana antes do início do experimento. Em cada ensaio a digesta era evacuada e os marcadores homogeneizados (ácido valérico + CoEDTA). No tratamento pH baixo, a digesta foi acidificada com ácido sulfúrico, e no tratamento volume baixo, apenas parte da digesta foi retornada ao ruminorretículo. Antes do retorno da digesta ao órgão, o óstio retículo-omasal foi obstruído com uma esponja. Não foi possível detectar diferenças significativas para o efeito do volume da digesta. A taxa fracional de absorção do valerato foi mais alta em pH baixo (35,0%/h) do que em pH alto (23,9%/h). A correlação entre a superfície absorptiva e a absorção média de valerato foi positiva e alta ($r = 0,90$). Apesar desta alta correlação, os animais usados neste trabalho apresentavam uma grande disparidade de morfologia da mucosa ruminal. Em experimentos com animais sob condições fisiológicas semelhantes esta correlação pode ser menor.

2.4 ABSORÇÃO DE ÁGUA E ELETRÓLITOS PELO PROVENTRÍCULO

Nos experimentos realizados por Danielli et al. (1945) e Masson & Phillipson (1951), citados na seção de absorção de AGV, pudemos observar que além de absorver AGV, surgiram evidências de que o proventrículo participa do balanço eletrolítico do animal. Parthasarathy & Phillipson (1953) estudaram o movimento de potássio, sódio, cloro e água através da parede ruminal de ovinos, usando a técnica do rúmen evacuado e lavado. Sódio e potássio foram absorvidos quando suas concentrações no fluido ruminal excederam a concentração sanguínea. A passagem na direção reversa ocorreu quando suas concentrações foram inferiores à do sangue. O cloro foi absorvido pelo rúmen quando sua concentração foi 135 mg/100 mL ou mais alta. O aparecimento de cloro ocorreu quando as concentrações foram inferiores a esta. A absorção de água ocorreu quando as soluções inseridas no rúmen eram hipotônicas em relação ao plasma sanguíneo. Houve influxo de água para o lúmen ruminal quando a solução infundida era hipertônica. Foi concluído que havia relação entre a osmolaridade do conteúdo ruminal e o movimento de água pela parede do órgão.

Ainda nos anos de 1950, Dobson (1959) realizou um trabalho para demonstrar o movimento do sódio, pela parede ruminal de ovinos, contra os gradientes de concentração e eletroquímico. Foi encontrado, na parede ruminal, um mecanismo de transporte ativo de sódio que permite direcioná-lo contra um gradiente de concentração, semelhante ao que ocorre na pele de rã. Outro objetivo era determinar o movimento do cloro. Foi então descoberto que o movimento de cloro do plasma sanguíneo para o conteúdo ruminal pode ocorrer contra um gradiente eletroquímico na presença de alta concentração de potássio e baixa concentração de sódio no conteúdo ruminal.

Willes et al. (1970), utilizando três ovelhas adultas, adaptadas com cânulas no esôfago, no rúmen e no omaso, consumindo feno de alfafa, reportaram taxas de movimento de água marcada com ^3H pela parede ruminal, além de estudar os efeitos do tempo após a alimentação e do pH da digesta sobre este movimento. A taxa de absorção de água variou de 37,1 a 70,8 mL/minuto, o influxo para o rúmen variou de 30,5 a 65,0 mL/minuto e a absorção líquida variou de 5,1 a 13,4 mL/minuto. O movimento de água pela parede do rúmen aumentou duas a três horas após a alimentação e então declinou. A absorção líquida não foi consistentemente afetada pelo tempo após a alimentação, apesar de ter havido a hipotonicidade do fluido ruminal e absorção líquida de água em todos os momentos. Menor pH ruminal, pela adição de HCl, resultou em maior taxa de movimento de água pela parede ruminal. Apesar de não informada pelos autores, usando os dados do trabalho, pôde-se calcular que a taxa fracional de absorção de água nesse experimento foi em média 7,9%/h, em um volume de fluido ruminal médio de sete litros.

Em meados da década de 1970, o ruminorretículo foi caracterizado como principal sítio de absorção de magnésio (Tomas & Potter, 1976). Para estudar os efeitos de alguns fatores sobre a absorção de Mg no rúmen, Care et al. (1984) utilizaram vinte carneiros adaptados cirurgicamente com cânula ruminal. As soluções experimentais continham ^{28}Mg e CrEDTA ou PEG como marcadores e foram introduzidas no rúmen evacuado e lavado. A absorção líquida de Mg contra um gradiente de concentração foi observada. Um aumento na razão K/Na na solução diminuiu a absorção líquida de Mg, por aumentar o influxo de Mg para o rúmen. A adição de cloreto de amônio ao conteúdo ruminal também reduziu a absorção líquida de Mg. Os efeitos da alta razão K/Na e das altas concentrações do íon amônio foram aditivos e diminuíram a absorção líquida de Mg e Na. Observou-se uma relação inversa entre a concentração ruminal de cálcio e a absorção líquida de Mg. A conclusão deste estudo foi que a

absorção de Mg pela parede ruminal depende, ao menos em parte, de um sistema funcional de transporte de Na.

Nos anos de 1980, dois experimentos foram realizados para entender o movimento de minerais e água durante a passagem da digesta pelos compartimentos do TGI de ruminantes. O primeiro deles avaliou a absorção de água e minerais no TGI de ovinos abatidos, utilizando ¹⁴¹Cério como uma substância inabsorvível de referência (Sklan & Hurwitz, 1985). No rúmen, houve secreção de fósforo e sódio, porém, potássio e cálcio foram absorvidos. A água foi absorvida no omaso e secretada no abomaso. O cloro foi secretado no omaso e mais ainda no abomaso. No duodeno, a extensiva secreção aumentou a concentração de sódio e potássio em oito a nove vezes; de cálcio, cloro e fósforo em três a seis vezes; de magnésio em 1,3 vezes e de água em 12 vezes. A reabsorção dos compostos foi rápida no intestino delgado, que se mostrou o maior sítio de absorção de todos os íons. Foi encontrado pequeno desaparecimento líquido de cálcio, fósforo, magnésio e potássio no intestino grosso, entretanto, água, sódio e cloreto desapareceram continuamente. O segundo trabalho (Edrize et al., 1986), avaliou a absorção de água e minerais no estômago de bovinos jovens (sete meses de idade), adaptados com cânulas no rúmen e no abomaso e uma manga flexível fixada no óstio omaso-abomasal, passível de ser exteriorizada pela cânula do abomaso. O PEG foi utilizado como marcador. As amostras de digesta foram coletadas do rúmen, do retículo, da saída do omaso e do abomaso. Em relação à dieta consumida, houve adição de sódio, água, potássio e uma pequena absorção de cloreto, da cavidade da boca até a saída do ruminorretículo. No omaso, quantidades substanciais (40-60%) de água e sódio e uma pequena quantidade de potássio foram absorvidos, além de uma secreção considerável de cloro. Os pH das digestas do rúmen (6,80) e do omaso (6,78) foram muito semelhantes. No abomaso, houve adição de cloro, sódio e água, além de uma queda abrupta do pH (3,09).

Estudos sobre absorção de eletrólitos e água no ruminorretículo de animais saudáveis já haviam sido realizados. Entretanto, a influência das alterações no fluido ruminal, em animais acometidos por acidose aguda, sobre a absorção destes compostos ainda não era conhecida. Objetivando determinar os efeitos agudos de hipertonicidade, baixo pH e ácido lático na absorção de sódio, cloro, magnésio e água, pelo ruminorretículo temporariamente isolado, Gaebel et al. (1987b) utilizaram seis carneiros com cânulas no rúmen, alimentados com feno. A presença de lactato (0 vs 10 mM) não alterou a absorção de Na, Cl, Mg e água. A hipertonicidade (422 mOsm/L) causou influxo de água, mas não afetou a absorção de Na, Cl e Mg. O pH baixo (4,79 vs 6,78) diminuiu a absorção de Na para 75% e Cl para 52% e levou a uma secreção de Mg pelo rúmen. Os efeitos do baixo pH foram intensificados pela aplicação simultânea de lactato e aumento da osmolaridade. Concluiu-se que a acidose ruminal aguda prejudica os mecanismos de absorção do epitélio ruminal.

No mesmo ano do trabalho anterior, o mesmo grupo de pesquisa gerou outra publicação sobre os efeitos da dieta, do pH intra-ruminal e da osmolaridade sobre a absorção de Na, Cl e Mg pelo ruminorretículo evacuado e lavado de ovinos (Gaebel et al., 1987a). Seis carneiros adultos, com cânulas no rúmen, receberam quatro dietas diferentes, por períodos de 15 dias cada, oferecidas na sequência: 1) feno (controle), 2) 36% feno e 64% concentrado, 3) 10% feno e 90% concentrado e 4) feno. A superfície das papilas ruminais foi determinada. As dietas com maiores proporções de concentrado resultaram em aumento da superfície absorptiva das papilas ruminais e elevaram a absorção de Na, Cl e Mg. A hipertonicidade (422 mosmol/L) causou influxo de água para o rúmen, mas não alterou a absorção de eletrólitos, independentemente da dieta. O abaixamento do pH reduziu a absorção de Na, Cl e Mg e esses efeitos negativos do pH foram menores quando os animais receberam dietas com maiores teores de concentrado. Quando os animais receberam apenas feno, após o período de

alimentação com uma dieta contendo 90% de concentrado, a superfície absorptiva, a capacidade de absorção e a resistência ao abaixamento de pH retornaram aos níveis controle. Os achados deste trabalho demonstraram que houve resposta adaptativa reversível do epitélio ruminal às diferentes dietas.

Mais informações dos efeitos do pH sobre a absorção de eletrólitos pela mucosa ruminal foram obtidas por Gaebel et al. (1989), que realizaram um experimento, *in vitro*, para investigar a relação entre o pH e a absorção de Na e Cl. Carneiros adultos, abatidos em um matadouro local, foram usados para prover pedaços de mucosa que foram incubados em uma Câmara de Ussing¹. Fragmentos de mucosa, obtidos antes e após a incubação, foram fixados e incluídos em resina para estudo histológico. Em pH baixo (5,5) os movimentos de Na e Cl no sentido mucosa-serosa foram menores do que em pH alto (7,4), o que levou a uma menor absorção líquida. À microscopia foi possível identificar tumefação das células e especialmente de suas mitocôndrias após exposição ao meio ácido. As alterações foram mais severas nas células das camadas superiores do epitélio, especialmente a camada granulosa, que apresentou grandes vacúolos (degeneração hidrópica). Estes dados indicam que o abaixamento do pH causa alterações no transporte de Na e Cl, predominantemente afetando os mecanismos de transporte celular.

Zhao et al. (1995), usando quatro carneiros sustentados por nutrição intra-gástrica, estudaram a secreção de saliva e a relação entre a pressão

¹ A Câmara de Ussing é um equipamento usado para mensurar a corrente de curto-circuito e indicar o transporte iônico em um epitélio. Este aparelho é assim designado em homenagem ao fisiologista dinamarquês Hans Ussing (1911-2000), que o inventou na década de 1950. Sua primeira utilização foi para demonstrar o transporte ativo de sódio na pele de rã. A Câmara de Ussing consiste de duas hemi câmaras que são fixadas após a acomodação do tecido entre elas (epitélio ou monocamada de células cultivadas sobre um suporte permeável). A outra parte funcional é o circuito elétrico. Atualmente, diferentes modelos têm sido desenvolvidos e além de mensurações de resistência, corrente e voltagem, pode-se aferir parâmetros mais complexos como impedância e capacitância (Ussing, 1981; Hug, 2002).

osmótica no rúmen e o transporte líquido de água pela parede ruminal. Diferentes soluções foram infundidas no rúmen para alterar a pressão osmótica. A secreção de saliva foi estimada pela entrada de fósforo no fluido ruminal. O transporte líquido de água através da parede ruminal foi calculado como a diferença entre a entrada e a saída de água do rúmen. A correlação entre a pressão osmótica e a absorção de água foi linear e negativa ($r^2 = 0,83$). Por outro lado, a correlação entre a pressão osmótica e a taxa de passagem de fluido foi linear e positiva ($r^2 = 0,56$). Concluiu-se que a pressão osmótica pode ser um fator chave na dinâmica da água no ruminorretículo.

López et al. (2003) avaliaram a cinética da água e a absorção de AGV pelo rúmen de três carneiros, adaptados com uma cânula no rúmen e um catéter no abomaso, sustentados por nutrição intra-gástrica. No dia do ensaio, os animais receberam AGV a uma taxa de infusão basal (271 mmol/h), durante as primeiras duas horas. A partir daí, cada animal recebeu AGV a diferentes taxas (135, 394 ou 511 mmol/h) pelas próximas 7,5 horas. Usando marcadores de fase fluida (PEG e CrEDTA), o volume de fluido, a taxa de passagem de fluido, a absorção aparente de água e a taxa de absorção de AGV foram estimados. Não houve efeitos significativos da taxa de infusão de AGV no volume de fluido e na cinética da água. Quando a taxa de infusão aumentou, a concentração de AGV e a osmolaridade aumentaram e o pH diminuiu. A resposta da taxa de passagem de fluido em relação à taxa de infusão de AGV foi bifásica. Ambas variáveis aumentaram juntas até uma concentração total de AGV de 80,1 mM. Além desta concentração, a taxa de passagem permaneceu constante. A taxa de absorção de AGV aumentou junto com a taxa de infusão.

Niebuhr (2003) estudou, *in vitro*, a absorção de bicarbonato pelo epitélio omasal de ovinos, utilizando o método da Câmara de Ussing. O transporte de HCO_3^- dependeu dos gradientes de concentração de HCO_3^- e Cl^- entre os lados da mucosa e da serosa. A eliminação total ou parcial do Cl^- do lado da mucosa

resultou em uma diminuição significativa da taxa de transporte mucosa-serosa de HCO_3^- . A adição do ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-disulfônico (DIDS¹) no lado da serosa causou uma redução da absorção de HCO_3^- . A absorção paracelular de HCO_3^- , provavelmente, foi pequena, já que o aumento da permeabilidade paracelular, por aumento da pressão osmótica no lado da mucosa, não alterou o transporte de HCO_3^- . A aplicação de bumetanida² no lado da serosa reduziu o transporte de HCO_3^- , o que pode indicar a presença de co-transporte $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (NKCC) na membrana basolateral das células do epitélio omasal. Pôde-se concluir que a absorção de HCO_3^- e a secreção de Cl^- no epitélio omasal são mediadas por anti-transporte iônico.

2.5 TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NO EPITÉLIO DO PROVENTRÍCULO

Nos estudos iniciais sobre absorção de AGV pelo rúmen, os pesquisadores acreditavam que estes compostos eram absorvidos apenas sob a forma não dissociada (HAGV) (Danielli et al., 1945; Gray, 1948). Entretanto, logo surgiram evidências de que formas dissociadas (AGV^-) também poderiam ser absorvidas (Masson & Phillipson, 1951; Ash & Dobson, 1963; Stevens, 1970). Os pKa dos AGV estão em torno de 4,8 (Fukushima, 1995) e o pH do ambiente ruminal, normalmente, apresenta-se entre 5,8 a 7,2. Pela equação de Henderson-Hasselbalch³, pode-se observar que a maioria dos AGV estão sob a forma AGV^- no fluido ruminal (> 90%). Quando o pH do rúmen diminui, ocorre um grande aumento na proporção de formas HAGV, porém isso é refletido em um pequeno aumento do *clearance* de AGV (Stevens, 1970; Gäbel, 1995), ou seja, a taxa de absorção não é proporcional à concentração de HAGV. Além disso, caso os AGV fossem absorvidos apenas sob a forma HAGV, a velocidade

¹ DIDS: inibidor do anti-transporte $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ e de outras trocas iônicas.

² Bumetanida: inibidor do co-transporte $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ e $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$.

³ $\text{pH} = \text{pK}_a + \log_{10}([\text{A}^-]/[\text{AH}])$

de absorção deveria ser fortemente correlacionada com a habilidade de cada ácido permear membranas lipídicas. De acordo com Walter & Gutknecht (1986), a habilidade do butirato permear através de uma membrana de fosfatidilcolina é 2,7 vezes maior do que do propionato, que é 5,1 vezes maior do que do acetato. Porém, em pH próximo da neutralidade as velocidades de absorção dos AGV têm se mostrado muito semelhantes (Dijkstra et al., 1993; Resende Júnior et al., 2006b). Então, esta discrepância poderia ser explicada por (Gäbel et al., 2002): 1) os mecanismos de transporte das células epiteliais podem prover prótons adicionais, criando um micro-ambiente ácido na periferia das células epiteliais, facilitando a transferência de HAGV; e 2) os AGV podem ser absorvidos sob a forma AGV⁻.

O influxo de substâncias para o lúmen ruminal durante a absorção dos AGV, como por exemplo CO₂/HCO₃⁻ (Masson & Phillipson, 1951; Ash & Dobson, 1963), e o isolamento da anidrase carbônica no epitélio ruminal (Carter, 1971) fortaleceram a hipótese que a forma AGV⁻ também poderia ser absorvida. Por outro lado, a absorção de sódio na mesma direção dos AGV (Danielli et al., 1945), poderia indicar uma possível fonte adicional de prótons, com a captação apical de Na⁺ através de anti-porte com H⁺ (NHE) (Martens et al., 1991). Os prótons lançados para fora da célula poderiam ser usados para converter AGV⁻ à HAGV, que por sua vez poderiam permear facilmente a membrana das células.

Holtenius (1991) estudou a absorção de AGV pelo epitélio ruminal de quatro cabras não lactantes e não gestantes, submetidas ou não a jejum. As concentrações plasmáticas (veia jugular externa) de acetato e de sódio diminuíram e o pH ruminal aumentou após o jejum. A absorção de acetato foi maior quando os autores infundiram uma solução com pH 4,9 do que quando o pH usado foi 7,4. A concentração plasmática de sódio aumentou após a infusão de uma solução contendo AGV, nas cabras submetidas a jejum. Os resultados indicaram que a absorção de AGV estimulou a absorção ruminal de sódio.

Martens et al. (1991) estudaram os mecanismos de transporte de ^{22}Na e ^{36}Cl pelo rúmen de carneiros, *in vitro*, com epitélios isolados e montados em Câmara de Ussing. A maior parte do sódio foi transportado por um mecanismo eletricamente neutro. A ausência de cloro ou bicarbonato na solução do lado da mucosa reduziu a absorção de sódio. Por outro lado, a ausência de sódio na solução do lado da mucosa inibiu completamente a absorção líquida de cloro. A substituição de potássio por colina, na solução do lado da mucosa, não alterou o fluxo de sódio, contrariando a hipótese da presença de um co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$. A interação entre sódio, cloreto e bicarbonato foi testada por inibidores de transporte iônico. A adição de furosemida¹ ou bumetanida não alterou significativamente o fluxo de sódio. A hidroclorotiazida² também não influenciou o fluxo de sódio. Por outro lado, altas concentrações de amilorida³ reduziram significativamente o transporte de sódio e cloro. Esta considerável inibição da absorção de sódio indica que a maior parte da absorção líquida de sódio pode ser mediada pelo anti-transporte $\text{Na}^+\text{-H}^+$. Também foi determinado o efeito do DIDS sobre o transporte de cloro. A absorção de cloro não foi alterada pela adição de DIDS na solução do lado da mucosa. Neste trabalho pôde-se confirmar a adição apical de prótons pelas células do epitélio ruminal, o que poderia culminar na formação de um micro-ambiente ácido.

Gäbel et al. (1991) investigaram as influências de dieta (feno ou 81% de concentrado), AGV, lactato e cloreto sobre o movimento de bicarbonato pela parede do ruminorretículo evacuado e lavado, de seis carneiros, adaptados com cânula ruminal. A substituição de AGV por gluconato e manitol, na solução infundida no rúmen, reverteu a secreção para absorção de bicarbonato e esta reversão não pôde ser prevenida pela presença de lactato na solução. A remoção simultânea de cloro e AGV aumentou a absorção líquida de bicarbonato. A

¹ Furosemida e bumetanida: inibidores do co-transporte $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ e $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$.

² Hidroclorotiazida: inibidor do co-transporte $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$.

³ Amilorida: inibidor do anti-transporte $\text{Na}^+\text{-H}^+$ e $\text{Na}^+\text{-K}^+$.

absorção de AGV e a secreção de bicarbonato foram maiores nos animais que consumiram concentrado do que naqueles que consumiram apenas feno. Pôde-se concluir que a secreção de bicarbonato pelo ruminorretículo depende da presença de AGV no lúmen. Além disso, os autores citaram que a secreção de bicarbonato pela parede ruminal pode ser um fator importante para alcalinizar a digesta, especialmente nos animais consumindo dietas com alto teor de concentrados.

Kramer et al. (1996) também estudaram a absorção de AGV em carneiros, *in vivo*, com o rúmen evacuado e lavado, e *in vitro*, com epitélio ruminal isolado e montado em Câmara de Ussing (usando ^{14}C -propionato e ^{36}Cl). *In vitro*, o abaixamento do pH de 7,5 para 6,5 levou a um aumento de aproximadamente dez vezes na concentração de propionato não dissociado, mas o fluxo mucosa-serosa de propionato aumentou apenas duas vezes. Para examinar a influência do anti-porte $\text{Na}^+\text{-H}^+$ sobre a absorção de AGV, o efeito da amilorida foi investigado. A adição de amilorida no lado da mucosa não alterou a absorção de propionato, sugerindo que os AGV também poderiam ser absorvidos sob a forma AGV^- . A adição de DIDS no lado da mucosa reduziu significativamente a absorção de cloro. Para estudar o efeito do DIDS apenas sobre a absorção de propionato, os autores bloquearam o transporte de cloro com um derivado do estilbeno. Nestas condições o DIDS reduziu significativamente o fluxo de propionato. A substituição de gluconato por nitrato¹ levou a efeitos similares ao do DIDS. Uma elevação da concentração de cloro no lado da mucosa resultou em uma redução significativa da absorção de propionato. Por outro lado, o transporte de cloro foi reduzido quando a concentração de propionato aumentou no lado da mucosa. *In vivo*, a teofilina foi utilizada como agente bloqueador do anti-porte $\text{Na}^+\text{-H}^+$, já que a amilorida é tóxica. No rúmen lavado e evacuado, a teofilina causou diminuição da absorção de sódio, porém a

¹ Nitrato: inibidor de anti-porte iônico.

absorção de AGV (mistura de acetato, propionato e butirato) não foi afetada. Quando o sódio foi totalmente substituído por colina, também não houve alteração na absorção de AGV. Por outro lado, um aumento na concentração de cloro levou à redução da absorção de AGV. Os resultados obtidos sugerem que os AGV são absorvidos tanto sob a forma AGV^- quanto na forma HAGV. Pôde-se também concluir que os AGV^- competem com Cl^- pelos sítios de ligação de um mecanismo de anti-porte ou que são absorvidos pelo anti-porte $AGV^-HCO_3^-$ (AE).

Ainda na década de 1990, três trabalhos envolvendo transporte ruminal de AGV, *in vitro*, foram publicados por um grupo de pesquisadores dinamarqueses. No primeiro experimento, Sehested et al. (1996) estudaram o transporte de ^{22}Na , *in vitro*, pelo epitélio ruminal isolado de bovinos e suas interações com AGV, ^{36}Cl e HCO_3^- , usando a técnica da Câmara de Ussing. A presença de acetato, propionato e butirato na solução estimulou o transporte ativo de sódio. A adição de análogos de AGV de ocorrência natural (isobutirato e 2-etil-butirato) não estimulou o transporte ativo de sódio, mas inibiu o efeito estimulador do butirato. O efeito do butirato foi dependente da concentração e mostrou um máximo com 20 mM. Após esta concentração, o transporte de sódio diminuiu com aumento na concentração de butirato. Isso sugere que houve um limite na quantidade de butirato a ser trabalhada pelo epitélio. A adição de ouabain¹ no lado da serosa aboliu o fluxo líquido de sódio, confirmando que o anti-porte Na^+-K^+ ATPase na membrana basolateral é essencial para o transporte de sódio. O anti-porte Na^+-H^+ na membrana apical foi envolvido em aproximadamente 60% a 70% do transporte ativo de sódio na presença de AGV. O transporte ativo de sódio aumentou com o aumento nas concentrações de cloro e foi significativamente reduzido com a substituição de Cl^- por gluconato. O transporte de cloro foi estimulado pelo butirato e reduzido pela adição de

¹ Ouabain: inibidor do anti-porte Na^+-K^+ ATPase.

amilorida. Não houve efeito do DIDS sobre o transporte de sódio. A adição de HCO_3^- e CO_2 não alterou significativamente o fluxo de sódio, mas a adição de acetazolamida na presença de HCO_3^- e CO_2 reduziu significativamente o transporte ativo de sódio. Concluiu-se que os AGV podem estimular o transporte ativo de sódio e cloro como resultado do seu metabolismo. No segundo trabalho, Sehested et al. (1999a) estudaram os efeitos do tamanho da cadeia de carbono, do pH e do metabolismo sobre o transporte dos AGV. A correlação entre a afinidade lipídica e a taxa de fluxo dos ácidos, apesar de positiva, foi baixa. A diminuição do pH aumentou o fluxo de todos os AGV, porém não proporcionalmente ao aumento das formas HAGV na solução. Quando o pH baixou de 7,3 para 6,0 houve um aumento de 19 vezes nas formas HAGV, mas um aumento de apenas duas vezes na taxa de fluxo. Não foi possível determinar relação entre o metabolismo e o transporte de AGV. A maior parte do CO_2 produzido pelo metabolismo dos AGV apareceu no lado da mucosa, e isso foi pronunciado com a presença dos AGV. A proporção de butirato e propionato metabolizados foi 95% e 78%, respectivamente. Houve produção líquida de acetato pelo epitélio ruminal. No terceiro estudo, Sehested et al. (1999b) avaliaram a absorção de ^{14}C -butirato e suas interações com sódio, cloro e bicarbonato. A absorção de butirato pela via paracelular foi insignificante, ou seja, os AGV são absorvidos pela via transcelular, majoritariamente sem alterar a carga elétrica celular. Houve correlação positiva e linear entre a absorção de sódio e de butirato. Quando a concentração de sódio foi reduzida o fluxo de butirato reduziu significativamente. A adição de amilorida, entretanto, não inibiu o fluxo de butirato. A concentração de cloro não influenciou o transporte de butirato, porém em condições livre de cloro, o fluxo de butirato por uma via DIDS sensível tendeu ser maior. A remoção do bicarbonato das soluções aboliu a absorção líquida de butirato. Não houve efeitos significativos da

acetazolamida¹ sobre a absorção de butirato, mas na presença de bicarbonato a absorção líquida de butirato tendeu ser menor. Com os resultados destes estudos pôde-se concluir que os AGV são absorvidos nas formas HAGV e AGV. Durante o transporte dos AGV há interação, ao menos, com sódio, cloro e bicarbonato.

Desde as primeiras pesquisas demonstrou-se que a quantidade de AGV absorvida não se refletia na quantidade de AGV que atingia o sangue portal (Masson & Phillipson, 1951). Posteriormente várias pesquisas demonstraram o metabolismo de AGV pelo epitélio ruminal (Sutton et al., 1963b; Weigand et al., 1975; Baldwin & Jesse, 1992). Como supracitado, Sehested et al. (1999a) não encontraram correlação entre a absorção e o metabolismo de AGV. Mesmo assim, a hipótese de que o metabolismo epitelial de AGV poderia aumentar a absorção, persistia. Na tentativa de mostrar esta relação, Gäbel et al. (2001) compararam o transporte epitelial do *n*-butirato (“facilmente metabolizado”) com aquele do *iso*-butirato (“resistente ao metabolismo”), em condições *in vivo* (ruminorretículo evacuado e lavado) e *in vitro* (Câmara de Ussing). *In vivo*, a absorção do *n*-butirato foi significativamente maior do que a do *iso*-butirato. Os experimentos, *in vitro*, demonstraram maior fluxo na direção mucosa-serosa de *n*-butirato e conseqüentemente maior absorção líquida de *n*-butirato. A adição do 2,4-dinitrofenol (DNP²) aboliu o fluxo líquido de *n*-butirato. Os autores concluíram que o metabolismo e/ou a disponibilidade de ATP estimulou a absorção líquida de *n*-butirato e com isso, o epitélio poderia ter uma influência regulatória sobre a absorção de *n*-butirato. Nos estudos *in vitro*, o efeito do DNP não foi significativo sobre o acetato e o propionato, provavelmente porque estes ácidos são pouco metabolizados pelo epitélio ruminal (Kristensen et al., 2000a; Kristensen & Harmon, 2004b).

¹ Acetazolamida: inibidor da anidrase carbônica.

² DNP: desacoplador da fosforilação oxidativa - inibe a produção de ATP.

Como visto anteriormente, a absorção de sódio, por via eletroneutra, pode ocorrer através de anti-porte com H^+ . A ocorrência de uma via eletrogênica (canal), através de condutância não seletiva de cátions (Na^+ , Ca^{++} e Mg^{++}), foi descrita (Martens & Gäbel, 1988). Para estudar os efeitos do cloreto sobre o pH do micro-ambiente epitelial e a absorção eletrogênica de sódio pelo epitélio ruminal de ovinos e caprinos, Leonhard-Marek et al. (2006) usaram a técnica da Câmara de Ussing. A absorção de Na^+ , Ca^{++} e Mg^{++} aumentou com o aumento na concentração de Cl^- . O pH da superfície epitelial também aumentou com o Cl^- , o que pode justificar a maior absorção de cátions. O aumento do pH pode ser explicado por um aumento da atividade do anti-porte¹ $Cl^-HCO_3^-$ ou Cl^-OH^- . A hipótese da presença de condutância de Cl^- na membrana apical das células também foi testada através de implante de micro-eletrodos. Caso esta hipótese fosse verdadeira, o aumento luminal na concentração de Cl^- levaria a uma hiperpolarização das células. Ao contrário da hipótese, um aumento da concentração luminal de Cl^- não hiperpolarizou, mas despolarizou o epitélio ruminal. Esta observação fortalece os argumentos contra a presença de canais de cloreto na membrana apical, sugerindo que eles estejam na membrana basolateral das células do epitélio ruminal.

Em outro trabalho, Leonhard-Marek et al. (2007) demonstraram os efeitos dos ânions cloreto, gluconato, sulfato e AGV^- sobre as taxas de fluxo de cálcio através do epitélio ruminal de ovinos, em Câmara de Ussing. O gluconato, o sulfato e os AGV^- reduziram a concentração de Ca^{++} nas soluções. Aumentos nas concentrações de cloro e AGV^- estimularam a absorção de cálcio significativamente, porém estes efeitos puderam ser antagonizados pelo gluconato. As vias transcelulares de absorção de cálcio, eletroneutra (anti-porte

¹ Três proteínas transportadoras caracterizadas, com base na estrutura molecular e características funcionais, são candidatas a este conjunto de troca iônica: *anion exchanger (AE)*, *down-regulated in adenoma (DRA)* e *putative anion transporter (PAT)* (Bilk et al., 2005).

$\text{Ca}^{++}-2\text{H}^+$) e eletrogênica (canal de Ca^{++}), foram confirmadas. Ficou sugerida a absorção paracelular de cálcio. Os autores especularam que o mecanismo estimulatório dos AGV sobre a absorção de cálcio seriam pelo aumento de H^+ intracelular, o que facilitaria o anti-porte $\text{Ca}^{++}-2\text{H}^+$ e o fornecimento de ATP após o metabolismo.

A absorção de AGV pode se dar sob as formas HAGV ou AGV⁻. Embora ambos os caminhos sejam benéficos para a homeostase do pH ruminal, eles representam uma “ameaça” para o ambiente citosólico das células epiteliais (Gäbel et al., 2002). A absorção de HAGV diminui diretamente o pH intracelular (pH_i), como resultado da liberação intracelular de prótons. O anti-porte $\text{AGV}^- - \text{HCO}_3^-$ leva à acidificação indireta, desde que HCO_3^- ($\text{pK}_a = 6,1$) é substituído por AGV^- ($\text{pK}_a = 4,8$), diminuindo a capacidade tampão do citosol (Gäbel et al., 2002). Consequentemente, mecanismos alcalinizantes eficientes são necessários para evitar uma acidificação intracelular letal.

O anti-porte $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ na membrana apical das células é, provavelmente, um dos principais mecanismos que ajudam a manter o pH_i (Müller et al., 2000). Entretanto, a presença do anti-porte $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ na membrana apical, apesar de benéfico, apresenta algumas desvantagens, como a acidificação do ambiente ruminal e a possibilidade de reciclagem de prótons para as células epiteliais. Portanto, existem suspeitas de que mecanismos adicionais para controlar o pH_i estejam localizados na membrana basolateral. Os mais prováveis desses mecanismos são um anti-porte $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ secundário e um mecanismo de captação de bicarbonato (Müller et al., 2000). Gäbel et al. (2007) sugerem que a importação de bicarbonato seja feita via isoforma 1 do co-transportador $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ (NBC1). Além disso, suspeita-se da ocorrência de exportação ativa de íons H^+ pela membrana apical da célula (Gäbel et al., 2007).

Após a captação apical, os AGV podem ser lançados para fora da célula no sentido da membrana baso-lateral ou então metabolizados. O catabolismo

intra-celular leva à produção de corpos cetônicos (acetoacetato e 3-OH-butirato) e lactato, que são mais hidrofílicos do que os AGV (Leo et al., 1971) e não podem atravessar a membrana por difusão passiva, necessitando de proteínas transportadoras específicas. Müller et al. (2002) demonstraram a presença de mRNA e da proteína isoforma 1 do transportador monocarboxilato (MCT1) em células intactas ou cultivadas, do epitélio ruminal de ovinos. Por meio de imunohistoquímica pôde-se mostrar que o MCT1 é expresso na camada basal do epitélio ruminal. A adição de lactato, 3-OH-butirato ou acetoacetato no meio de cultura levou a um abaixamento rápido do pH_i . A presença do ácido *p*-cloromercuribenzóico (*p*CMBA) e do floretin¹ reduziu a acidificação intracelular. Fisiologicamente, o lactato, o 3-OH-butirato e o acetoacetato são transportados de dentro para fora da célula. Para verificar o papel do MCT1 na exportação destes compostos, as células cultivadas foram carregadas com estes ácidos monocarboxílicos e o pH_i foi registrado após a remoção extracelular dos ácidos. A remoção dos ácidos resultou em uma rápida recuperação do pH_i . A presença de *p*CMBA e floretin inibiu a recuperação do pH_i . Concluiu-se que o MCT1 funciona como um mecanismo importante de remoção de corpos cetônicos e lactato juntamente com prótons, do citossol para o sangue. Então, além da exportação de prótons pelo anti-porte $\text{Na}^+\text{-H}^+$, o MCT1 é um mecanismo importante de regulação do pH_i .

Os mecanismos de transferência de AGV, do lúmen para o citoplasma das células do epitélio ruminal, são bem conhecidos. Entretanto, os mecanismos de transferência dos AGV, pela membrana basolateral, do citoplasma para o sangue, não haviam sido identificados. Existe a possibilidade dos AGV atravessarem a membrana basolateral sob a forma HAGV. Porém, no citoplasma ($\text{pH}_i \sim 7,4$), 99,75% dos AGV estão sob a forma AGV^- e precisariam de um mecanismo de exportação para atingirem o sangue. Como normalmente o pH

¹ *p*CMBA e floretin: inibidores de MCT.

ruminal é inferior ao pH_i , se não houvesse um sistema de transporte, ocorreria acúmulo de AGV no interior das células. Diante disso, um grupo de pesquisadores japoneses investigaram o possível envolvimento do MCT1 no transporte de AGV pelo epitélio ruminal *in vivo* (rúmen evacuado e lavado com catéteres inseridos na artéria ruminal direita e na veia ruminal direita) e *in vitro* (Câmara de Ussing), além de caracterizar a distribuição do MCT1 ao longo do TGI de caprinos (Kirat et al., 2006). A RT-PCR revelou a presença de mRNA para MCT1 em todas as regiões do TGI. Uma análise quantitativa, por meio de Western blot, mostrou que o nível de proteína MCT1 seguiu a ordem rúmen \gg retículo > omaso > ceco > cólon proximal > cólon distal > abomaso > intestino delgado. A realização de imunohistoquímica no epitélio do proventrículo indicou a expressão de MCT1 predominantemente nas camadas basal e espinhosa. No ensaio *in vivo*, a injeção de *p*CMBA na artéria ruminal reduziu significativamente as concentrações de acetato, propionato e 3-OH-butirato na veia ruminal. No ensaio *in vitro*, a presença de *p*CMBA reduziu o transporte de acetato (ácido testado) na direção mucosa-serosa. Este estudo forneceu evidências, pela primeira vez em ruminantes, que o MCT1 tem um papel direto no transporte de AGV.

Todos os trabalhos até aqui abordados focaram o estudo do transporte de AGV pela parede ruminal (FIGURA 1). Porém, como foi visto na seção de absorção de AGV pelo proventrículo, o omaso tem uma participação importante no *clearance* destes ácidos, principalmente em animais que consomem grandes quantidades de matéria seca. Apesar da sua importância, apenas um trabalho foi encontrado na literatura sobre o transporte de AGV no omaso (Ali et al., 2006). Para realização do estudo, carneiros de várias raças, pesos e idades, alimentados com feno, foram abatidos. Algumas lâminas do omaso foram removidas, dissecadas e montadas em uma Câmara de Ussing. O ^{14}C -acetato foi utilizado como representante dos AGV. Para estudar o efeito do pH, a solução tampão do

lado da mucosa teve o pH ajustado para 7,4 ou 6,4. O pH da solução do lado da serosa foi ajustado para 7,4 em todas as montagens, independente do tratamento. Para estudar o efeito da concentração de AGV sobre a taxa de transporte, soluções contendo vinte e cinco, cinquenta ou cem mili moles de acetato por litro foram testadas. A ocorrência de competição com outros AGV foi testada com a presença de propionato. Em um ensaio, a amilorida foi adicionada no lado da mucosa para determinar a existência de alguma ligação entre o anti-porte $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ e o transporte de AGV. Em outro ensaio, DIDS foi adicionado no lado da mucosa para verificar o transporte de AGV^- através de anti-porte com bicarbonato ou cloreto. Ainda para verificar a presença do anti-porte $\text{AGV}^- - \text{HCO}_3^-$ o bicarbonato da solução foi removido e adicionou-se etoxizolamida¹. Por último, como a atividade de proteínas transportadoras é sensível à temperatura, os transportes de AGV e cloro foram avaliados em baixa temperatura (28 vs 38°C). O abaixamento do pH aumentou o transporte mucosa-serosa e conseqüentemente a absorção líquida de acetato. As taxas de transporte de acetato apresentaram correlação linear e positiva ($r^2 = 0,99$) com as concentrações de acetato. Caso o acetato fosse transportado por um carreador, a presença de um segundo AGV diminuiria o fluxo do primeiro. A presença de propionato não alterou significativamente o transporte de acetato. A adição de DIDS não afetou o fluxo no sentido mucosa-serosa de acetato. A eliminação de bicarbonato e a adição de etoxizolamida não alteraram significativamente o transporte de acetato. A redução da temperatura afetou a taxa de fluxo mucosa-serosa de cloro, porém o efeito sobre o fluxo de acetato foi bem menor e pode ter sido causado pela diminuição da atividade do carreador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$. A adição de amilorida aboliu completamente o transporte de sódio e reduziu significativamente o fluxo mucosa-serosa de acetato e, conseqüentemente, a absorção líquida de acetato. Os dados deste único experimento apóiam a idéia de

¹ Etoxizolamida: inibidor da anidrase carbônica.

difusão passiva de acetato pelo epitélio omasal. Este mecanismo tem a vantagem de não precisar de carreadores e não gastar energia (FIGURA 2).

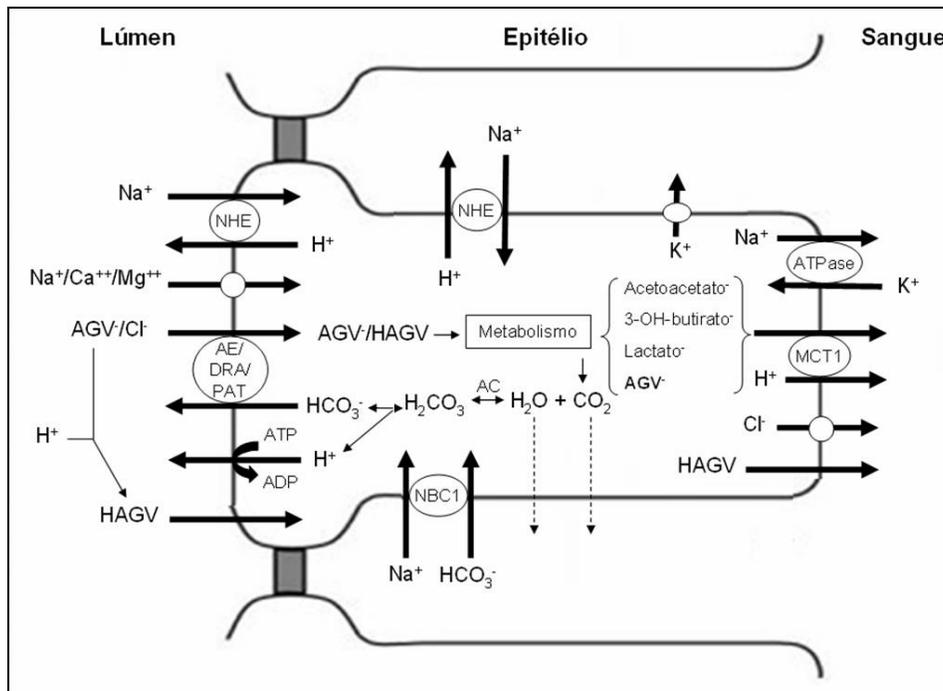


FIGURA 1 – Mecanismo proposto, fundamentado em dados da literatura, para o transporte de ácidos graxos voláteis no epitélio ruminal. NHE: anti-porte Na⁺-H⁺. AE: *anion exchanger*. DRA: *down-regulated in adenoma*. PAT: *putative anion transporter*. NBC1: isoforma 1 do co-transportador Na⁺-HCO₃⁻. MCT1: isoforma 1 do transportador monocarboxilato. AC: anidrase carbônica.

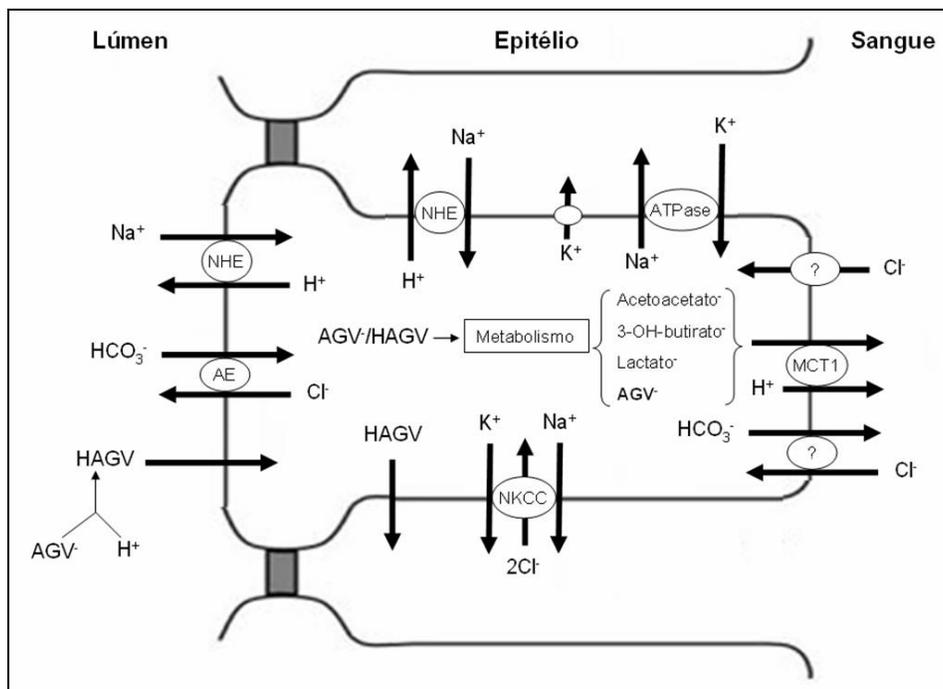


FIGURA 2 - Mecanismo proposto, fundamentado em dados da literatura, para o transporte de ácidos graxos voláteis no epitélio omasal. NHE: anti-porte Na⁺-H⁺. AE: *anion exchanger*. NKCC: co-transporte Na⁺-K⁺-2Cl⁻. MCT1: isoforma 1 do transportador monocarboxilato.

2.6 METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS NO EPITÉLIO DO PROVENTRÍCULO

Logo nos primeiros experimentos sobre a absorção de AGV pelo proventrículo, os pesquisadores notaram que as proporções e as quantidades de AGV encontrados na circulação portal não era iguais àquelas que desapareciam do rúmen (Barcroft et al., 1944; Masson & Phillipson, 1951). Masson & Phillipson (1951) notaram que a concentração de butirato no sangue que drena o rúmen foi muito inferior às concentrações de acetato e propionato, sugerindo a utilização de butirato pela parede ruminal. A possibilidade de esterificação do butirato pelo epitélio ruminal foi descartada (Pennington, 1952), já que o nível de ácidos graxos de cadeia curta esterificados, no sangue de bovinos, mostrou-se insignificante (McClymont, 1951). Pennington (1952) investigou o metabolismo, *in vitro*, de acetato, propionato e butirato pelo epitélio ruminal e por outros tecidos de ovinos. Fragmentos de vários tecidos, de um carneiro abatido, foram incubados em frascos com acetato, propionato ou butirato de sódio. Os três ácidos foram metabolizados pelo epitélio ruminal, entretanto, houve preferência notável pelo butirato. O metabolismo de AGV pela túnica muscular da parede do rúmen, principalmente do butirato, foi muito inferior ao do epitélio ruminal. Uma grande parte do butirato incubado com fragmentos de epitélio ruminal foi convertido a corpos cetônicos, principalmente acetoacetato. Corpos cetônicos também foram formados a partir do acetato, mas não do propionato. Houve produção de corpos cetônicos a partir do butirato incubado com fragmentos dos epitélios do retículo e do omaso e fragmentos de fígado. Todos estes tecidos metabolizaram mais butirato do que acetato e propionato. Os epitélios do abomaso e do ceco e o tecido renal não mostraram preferência por butirato e produziram pequenas quantidades de corpos cetônicos. Neste experimento pôde-se confirmar o catabolismo de AGV pelo epitélio ruminal.

Sutton et al. (1963b) compararam a atividade metabólica da mucosa ruminal de seis bezerros alimentados apenas com leite ou com leite, feno e concentrado. Os animais foram sacrificados na décima sexta semana de idade. Dois gramas de mucosa, obtidos do saco cranial do rúmen, foram incubados em frascos erlenmeyer contendo acetato, propionato, butirato ou uma mistura desses três ou ainda, glicose. As taxas de utilização ($\mu\text{mol}/100\text{mg}$ matéria seca de tecido, durante três horas) de acetato, propionato, butirato, mistura de AGV e glicose, respectivamente, foram 5,9; 29,6; 44,1; 31,5 e 3,8 para os bezerros que consumiram leite, feno e concentrado e 2,9; 5,8; 4,7; 5,8 e 4,2 para os bezerros que consumiram apenas leite. Corpos cetônicos, especialmente acetoacetato, foram produzidos nos frascos com butirato, acetato ou mistura de AGV. A razão (acetoacetato + acetona)/3-OH-butirato variou de 1/1 a 2/1. A porcentagem de acetato e butirato convertidos a corpos cetônicos foi 72 e 88%, respectivamente, para animais que consumiram leite, feno e concentrado; e 17 e 29%, respectivamente, para animais consumindo leite. O desenvolvimento da capacidade metabólica (Sutton et al., 1963b) parece estar relacionado ao desenvolvimento estrutural e à capacidade absorptiva da mucosa ruminal (Sutton et al., 1963a).

Joyner et al. (1963) estudaram a absorção e o metabolismo de ^{14}C -butirato e ^{14}C -acetato pelo omaso de bezerros. Os animais foram anestesiados, a cavidade abdominal foi incisada e o omaso foi exteriorizado. A artéria carótida comum também foi acessada. Antes e após a infusão dos isótopos no lúmen do omaso, amostras de sangue foram coletadas da artéria carótida comum e da veia omasal, por quatro vezes durante 15 minutos. O butirato desapareceu rapidamente do lúmen do omaso. A maior porção ($\sim 72\%$) do ^{14}C do butirato apareceu no sangue como 3-OH-butirato. Aproximadamente um terço da radioatividade foi encontrada no bicarbonato do sangue, sugerindo que uma

parte do butirato foi totalmente oxidada a CO₂. O acetato também foi absorvido e aparentemente não foi convertido a 3-OH-butilato.

O butirato e o propionato pareciam ser os AGV mais metabolizados pelo epitélio ruminal. Para entender o catabolismo intra-epitelial destes ácidos, Taylor & Ramsey (1965) incubaram fragmentos de mucosa ruminal de novilhos com ¹⁴C-butilato e ¹⁴C-propionato na presença ou não de butirato e propionato não marcados. Após três horas de incubação, 20% a 30% do butirato e 70% à 80% do propionato foram recuperados. Nos frascos com butirato, mas sem propionato, uma fração considerável do ¹⁴C-butilato foi convertida a acetato. Cerca de 85% do ¹⁴C do butirato foi encontrado no 3-OH-butilato. Dez por cento do ¹⁴C do butirato foi incorporado ao lactato, produzido apenas na presença de propionato. Apoiando os resultados de outros trabalhos, que sugeriam a formação de acetoacetato e 3-OH-butilato, não apenas pela reação reversa da acetoacetil-CoA tiosase, mas também por uma via envolvendo 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintetase (HMG-CoA sintetase), os dados deste experimento concordam que parte do butirato é metabolizado pelo ciclo do ácido cítrico. Há indícios de que o metabolismo do propionato ocorra por fixação de CO₂ para formar succinil-CoA, um intermediário comum ao metabolismo do butirato. Presumivelmente o lactato se origina por meio da descarboxilação do malato a piruvato ou do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato.

Vários estudos haviam demonstrado o metabolismo de AGV, principalmente do butirato, pelo epitélio ruminal. Porém, a importância do catabolismo epitelial dos AGV, *in vivo*, era desconhecida. Para determinar a extensão da formação de corpos cetônicos durante a passagem do butirato pela parede ruminal, Hodson et al. (1965) delinearam um experimento utilizando dois bezerros holandeses, adaptados com cânula ruminal e catéteres na veia porta e na artéria femoral, ou com a artéria carótida externa exteriorizada. Um dos animais encontrava-se com dois meses de idade e o outro com sete. A adição de

uma solução com ^{14}C -butirato no rúmen dos bezerros resultou em um rápido aumento na concentração de corpos cetônicos no sangue portal e no sangue arterial, entretanto, o nível foi consistentemente maior no sangue da veia porta. A maior parte da atividade radioativa (68 a 98%) presente nas amostras de sangue estava na fração 3-OH-butirato, ao contrário de trabalhos *in vitro* (Sutton et al., 1963b), que apresentaram uma menor proporção de 3-OH-butirato entre os corpos cetônicos. Três a 17% do ^{14}C recuperado no sangue encontravam-se na fração AGV. Os níveis de corpos cetônicos no sangue portal foram maiores no bezerro de sete meses do que no de dois meses. Pôde-se concluir que a maior parte do butirato absorvido é metabolizado pela parede ruminal e que este metabolismo pode ser influenciado pela dieta.

Um dos trabalhos mais citados sobre metabolismo de AGV foi realizado por Bergman & Wolff (1971). Neste trabalho, o aparecimento portal líquido e a utilização hepática líquida de AGV foram determinados em ovinos adultos, alimentados com alfafa peletizada e infundidos ou não com ^{14}C -acetato na veia cava e submetidos a três dias de jejum. O ^{14}C -acetato foi infundido na veia cava para determinar a cinética do acetato no corpo, além da produção ou utilização esplâncica e hepática. O ácido *p*-aminohipúrico foi infundido continuamente na veia mesentérica para estimar os fluxos sanguíneos portal e hepático. O fluxo de sangue portal representou 76 a 91% do fluxo de sangue hepático. As taxas médias de aparecimento no sangue portal foram 68, 18 e 2 mmol/h, respectivamente, para acetato, propionato e butirato para ovinos alimentados continuamente. Estes valores foram reduzidos para três, 0,8 e 0,6 mmol/h após três dias de jejum. Aproximadamente um terço do ^{14}C -acetato no sangue arterial que entrou na região portal foi removido, independentemente da dieta. Os autores citam que este acetato poderia ser utilizado para lipogênese na gordura mesentérica, oxidação pela musculatura lisa, conversão a outros compostos ou até mesmo difundir para o lúmen do TGI, apesar desta última

hipótese ser menos provável, pois a proporção de ácido acético no sangue sob a forma não dissociada é muito pequena e o gradiente de concentração entre o rúmen e o sangue é alto. As taxas de absorção portal de acetato variaram de 97 mmol/h, para animais alimentados, a 10 mmol/h, para animais em jejum. Pequenas quantidades de acetato foram utilizadas pelo fígado. Por outro lado, em animais alimentados, 80% a 100% do propionato e butirato foram removidos pelo fígado e, em animais submetidos a jejum, este valor variou de 52 a 70%. Aproximadamente 30% do acetato, 50% do propionato e 90% do butirato produzidos no rúmen não atingiram o sangue portal. Concluiu-se que grandes quantidades de AGV são metabolizados pelo epitélio ruminal.

Com o objetivo de relacionar o metabolismo e a absorção de butirato e propionato pelo ruminorretículo, pesquisadores da Universidade de Iowa, nos Estados Unidos, realizaram dois trabalhos na década de 1970. Weigand et al. (1972a) realizaram dez ensaios, duplicatas de cinco combinações de pH e concentração de AGV, utilizando a técnica do ruminorretículo evacuado e lavado em bezerros, adaptados com catéteres na veia porta e na artéria aorta torácica. Os pH testados foram 4,8, 6,0 e 7,2; e as concentrações foram 75, 150 e 225 mM. Todas as soluções (18 L) continham acetato, propionato e butirato (65:25:15) e PEG. Todos os AGV foram absorvidos mais rápido em pH 4,8 do que em pH 7,2. Em pH 7,4 as taxas fracionais de absorção foram iguais. Em pH 6,0 as taxas fracionais de absorção do propionato e do butirato foram 1,23 e 1,46 vezes a do acetato. Em pH 4,8 o propionato e o butirato foram absorvidos 1,45 e 1,84 vezes mais rápido do que o acetato. Como as concentrações relativas eram 65:25:15, a quantidade de moles absorvidos seguiu a ordem acetato > propionato > butirato. Com o aumento na concentração total de AGV de 75 mM para 150 mM, a taxa de absorção praticamente dobrou, porém a taxa fracional não foi afetada. As concentrações portais de corpos cetônicos não foram influenciadas pela solução. A conversão de butirato a corpos cetônicos variou de 33 a 78%. O

abaixamento do pH e o aumento na concentração de AGV reduziram a proporção de butirato convertido a corpos cetônicos. O 3-OH-butirato representou aproximadamente três quartos dos corpos cetônicos na veia porta. O aumento na concentração de AGV e o abaixamento do pH aumentaram a concentração portal de butirato. A quantidade absoluta de butirato convertido a corpos cetônicos foi praticamente constante. A proporção de butirato convertido a corpos cetônicos e a taxa de absorção de butirato apresentaram correlação negativa ($r = -0,70$; $P < 0,05$). Stevens & Stettler (1966) sugerem que o metabolismo de butirato pode ser saturado. Os dados obtidos por Weigand et al. (1972a) apoiam esta idéia. No segundo trabalho, Weigand et al. (1972b) quantificaram a extensão do metabolismo de propionato durante a absorção pelo ruminorretículo. Três novilhos holandeses com cânula ruminal, alimentados com feno e concentrado, foram infundidos com soluções contendo de acetato, ^{14}C -propionato e butirato, no ruminorretículo evacuado e lavado. As soluções com menor pH e maiores concentrações aumentaram a absorção de AGV. As concentrações sanguíneas portal e arterial de propionato foram positivamente correlacionadas com as taxas de absorção de propionato. Por outro lado, as concentrações sanguíneas de lactato não variaram significativamente. A correlação entre as taxas de absorção de propionato e as concentrações portais e arteriais de lactato foram baixas e não significativas. Do propionato absorvido, 2,3 a 4,9% foram convertidos a lactato. A contribuição do lactato na soma das concentrações portais de propionato e lactato foi menor em pH 4,8 do que em pH 7,2 e diminuiu quando as concentrações de AGV aumentaram. Isso indica que a conversão do propionato absorvido à lactato foi limitada. A conversão de propionato a outros produtos, que não lactato, foi muito pequena, já que aproximadamente 100% da radioatividade do propionato absorvido foram encontradas em propionato e lactato. Pôde-se concluir que a conversão de propionato a lactato pelo epitélio ruminal foi pequena ($< 5\%$) e que esta

conversão foi negativamente correlacionada com as taxas de absorção do propionato.

Weekes (1972) avaliou o efeito da condição fisiológica de ovelhas (gestação, lactação ou manutenção) sobre o metabolismo de propionato e a atividade de algumas enzimas na mucosa ruminal. Em cada condição fisiológica, um grupo de ovelhas foi abatido e a mucosa ruminal foi coletada. Fragmentos de papilas ruminais foram incubados com propionato para mensurar as produções de lactato e piruvato. Outros fragmentos de mucosa foram utilizados para determinar a atividade das enzimas propionil-CoA sintetase, propionil-CoA carboxilase, malato desidrogenase citossólica, lactato desidrogenase, aspartato amino-transferase, alanina amino-transferase e glutamato desidrogenase. O peso vivo, o peso da mucosa ruminal e sua composição em termos de matéria seca, RNA e DNA também foram determinados. As quantidades de lactato e piruvato formadas por unidade de matéria seca de tecido, durante duas horas de incubação, não foram afetadas pela condição fisiológica. Quando os resultados foram expressos em termos da mucosa total, a formação de lactato foi significativamente maior em animais lactantes. O piruvato contribuiu com dez a 25% da formação de lactato mais piruvato. A formação de piruvato por unidade de matéria seca de tecido foi menor no início da lactação e maior no meio da lactação. Quando os resultados são expressos em termos de mucosa total, houve uma maior formação de piruvato durante a lactação. A proporção de propionato convertido a lactato e piruvato foi em média 3%. Por unidade de peso de mucosa, a condição fisiológica não afetou a atividade das enzimas propionil-CoA sintetase, propionil-CoA carboxilase, malato desidrogenase citossólica, lactato desidrogenase e aspartato amino-transferase. Quando os resultados são expressos em relação ao peso total da mucosa, houve um aumento nas atividades de todas as enzimas. Concluiu-se que a conversão de propionato a lactato e a

piruvato parece ser pequena e que não ocorrem adaptações desta via quando as exigências de nutrientes são alteradas.

Ash & Baird (1973) estudaram a capacidade de ativação de AGV (acetato, propionato e butirato), determinada pela taxa de formação dos respectivos ésteres de CoA, pelo epitélio ruminal e pelo fígado de uma vaca Friesian-Ayrshire não lactante. Investigou-se também o efeito de um segundo AGV sobre a taxa de ativação de um primeiro. A atividade da propionil-CoA sintetase foi três a quatro vezes mais alta no fígado do que no epitélio ruminal. A presença do butirato não afetou significativamente a atividade da propionil-CoA sintetase no fígado, mas praticamente inibiu a atividade desta no epitélio ruminal. A atividade da butiril-CoA sintetase foi cerca de três vezes maior do que a atividade da propionil-CoA sintetase no epitélio ruminal. Entretanto, no fígado a atividade da butiril-CoA sintetase foi inferior a da propionil-CoA sintetase. A presença de propionato reduziu a atividade da butiril-CoA sintetase no fígado. Ao contrário, a presença de propionato não deprimiu a atividade da butiril-CoA sintetase no epitélio ruminal. A presença de acetato não afetou a ação das enzimas propionil e butiril-CoA sintetases. A atividade da acetil-CoA sintetase foi a mais baixa das três, nos dois tecidos. A presença de propionato ou butirato diminuiu a atividade da acetil-CoA sintetase no fígado, mas não alterou sua atividade no epitélio ruminal. A atividade da acetil-CoA sintetase no epitélio ruminal foi inferior à do fígado. A distribuição subcelular das enzimas (homogeneizado total do tecido; fração citoplasmática; fração particulada e fração membrana) também foi determinada. No fígado, a atividade de todas as acil-CoA sintetases se localizaram na matriz e na membrana mitocondriais. No epitélio ruminal as acil-CoA sintetases demonstraram localizações semelhantes e, neste caso, a atividade foi dividida entre mitocôndrias e citoplasma. Os autores citaram que o epitélio ruminal foi mais difícil de homogeneizar e que o método utilizado para isolar as frações pode ter danificado as organelas e

contaminado a fração citoplasma com conteúdo mitocondrial. Ficou claro que o butirato é mais metabolizado no epitélio ruminal e o propionato é mais metabolizado no fígado.

Ainda na década de 1970, outro experimento foi realizado para investigar o efeito da dieta sobre a atividade metabólica da mucosa ruminal (Weigand et al., 1975). Dez bezerros entre quatro e seis meses de idade, divididos em dois grupos de cinco animais, foram alimentados com feno de alfafa ou com concentrado à base de milho e farelo de soja. Ao final de três ou quatro meses os animais foram abatidos. Fragmentos de mucosa ruminal foram coletados e incubados em frascos erlenmeyer por três horas com um de vários AGV. Macroscopicamente o desenvolvimento das papilas foi muito maior nos animais alimentados com concentrado do que naqueles alimentados com feno. As taxas de utilização de substrato seguiu a ordem: *n*-butirato >> *n*-valerato ~ propionato > *iso*-valerato ~ *iso*-butirato. Em geral, a mucosa de animais alimentados com feno utilizou maiores quantidades de substrato (por grama de N de tecido) do que a mucosa de animais alimentados com concentrado. A dieta não afetou a conversão de AGV a corpos cetônicos e lactato. O lactato representou aproximadamente metade dos produtos do catabolismo de propionato e *n*-valerato. A formação de corpos cetônicos (dois terços de acetoacetato mais acetona) representou mais de 90% do butirato utilizado. A formação de corpos cetônicos a partir de *n*-valerato, cerca de 25% do seu catabolismo, foi restrita a 3-OH-butirato. Os autores concluíram que não houve adaptação à metabolização de AGV por unidade de peso de mucosa. Entretanto, a maior massa de células epiteliais nos animais alimentados com concentrado pode refletir uma maior capacidade metabólica do rúmen.

No início da década de 1990, Harmon et al. (1991) estudaram a influência da composição e do nível de ingestão da dieta sobre o metabolismo de AGV pelo epitélio ruminal de bovinos. Vinte bezerros (sete meses de idade)

agrupados por raça, sexo e peso, receberam um de quatro tratamentos: 1) dieta com 90% de forragem, consumo para atender uma vez a exigência de manutenção; 2) dieta com 90% de forragem, consumo para atender duas vezes à exigência de manutenção; 3) dieta com 90% de concentrado, consumo para atender uma vez à exigência de manutenção; e 4) dieta com 90% de concentrado, consumo para atender duas vezes à exigência de manutenção. Após 140 dias, os animais foram abatidos. Fragmentos da mucosa do saco cranial do rúmen foram coletados e incubados com acetato, propionato, butirato e glicose. As atividades das enzimas acil-CoA sintetase foram determinadas. As produções líquidas (mmol/mg de tecido) de 3-OH-butirato e acetoacetato a partir do acetato foram maiores com o maior consumo. A produção de CO₂ a partir do acetato foi maior nas dietas com 90% de concentrado. As produções líquidas de lactato e piruvato a partir do propionato aumentaram com a maior ingestão, porém a produção líquida de lactato a partir da glicose diminuiu com a maior ingestão. A captação de AGV não foi alterada pela ingestão e foi aproximadamente dez vezes maior do que a captação de glicose. A produção de CO₂, a partir do propionato foi duas a cinco vezes maior do que a partir de acetato, butirato ou glicose. O consumo de oxigênio foi maior com a maior ingestão e não foi afetado pelo tipo de AGV. Apenas a atividade da enzima butiril-CoA sintetase foi alterada pela dieta. Em animais que consumiram uma dieta com 90% de forragem, a atividade desta enzima foi maior do que naqueles consumindo uma dieta com 90% de concentrado. A adição de butirato inibiu a atividade das enzimas acetil e propionil-CoA sintetases em 63% e 92%, respectivamente. Os resultados sugerem maior importância dos AGV do que da glicose para o metabolismo energético do epitélio ruminal.

Baldwin & Jesse (1992) investigaram o padrão de desenvolvimento da oxidação de glicose e butirato pelo rúmen de ovinos em crescimento, usando o sistema de células isoladas. As células do epitélio ruminal foram isoladas de 21

ovinos lactentes, abatidos com diferentes idades (um a 56 dias). O peso do rúmen aumentou com a idade e o peso corporal. A taxa de oxidação de glicose (nmol/10⁶ células por 120 minutos) foi baixa ao nascimento, mas aumentou agudamente até 14 dias e permaneceu elevada até o dia 42. Após o dia 42, a oxidação de glicose diminuiu, atingindo taxas menores do que as encontradas ao nascimento. A oxidação de butirato a CO₂ aumentou do nascimento até o dia quatro e declinou ao longo do período de aleitamento. A presença do butirato inibiu a oxidação de glicose por células isoladas nos dias 14, 28 e 42. Por outro lado, a presença de glicose inibiu o metabolismo de butirato por células isoladas do dia quatro ao dia 28 após o nascimento. A produção de 3-OH-butirato a partir do butirato não foi detectada ao nascimento, mas foi mensurável no dia 4 e permaneceu constante até o dia 42. Entretanto, no dia 56, a produção deste composto apresentou um aumento de dez vezes. Este trabalho esclareceu que as adaptações metabólicas da mucosa ruminal estão intimamente ligadas ao desenvolvimento morfológico do tecido e que as principais alterações no destino dos carbonos oriundos de glicose ou butirato ocorrem antes do desmame.

Lane et al. (2000) também avaliaram o desenvolvimento metabólico da mucosa ruminal de ovinos. Todos os animais receberam leite até 48 dias de idade. Do dia 49 ao dia 84, uma parte dos animais continuou recebendo leite e outra parte foi desmamada e passou a receber alimentos sólidos. Células do epitélio ruminal foram isoladas de animais abatidos ao longo do período experimental e incubadas com ¹⁴C-glicose ou ¹⁴C-butirato. As taxas de oxidação de glicose e butirato e de produção de acetoacetato e lactato pelas células isoladas dos animais recebendo apenas leite não variou com a idade. Antes do dia 42, não foi detectada produção de 3-OH-butirato. No dia 84, os níveis de produção de 3-OH-butirato, nos animais consumindo apenas leite, foram semelhantes aos de animais adultos. As taxas de oxidação de glicose e butirato e as produções de acetoacetato e lactato não foram influenciadas pela dieta, em

animais abatidos no dia 84. A introdução de alimentos sólidos na dieta resultou em desenvolvimento morfológico, mas não estimulou o desenvolvimento metabólico do rúmen, por unidade de mucosa.

Objetivando avaliar as influências da razão forragem/concentrado (75% forragem ou 75% concentrado) e a ingestão de energia metabolizável da dieta (0,099 ou 0,181 Mcal de energia metabolizável/kg de PV^{0,75}) sobre o metabolismo de células isoladas do epitélio ruminal, Baldwin & McLeod (2000) abateram 28 ovinos, após um período experimental de 52 dias. Células isoladas da mucosa ruminal foram incubadas com substratos marcados com ¹⁴C (acetato, propionato, butirato, glicose, glutamato e glutamina), com concentração variando de 0,1 a 50 mM. A produção de 3-OH-butirato a partir do butirato, em animais alimentados com 75% de forragem, não foi afetada pelo consumo de energia, mas a produção foi maior com a maior ingestão de energia nas dietas com 75% de concentrado. A produção de acetoacetato a partir do butirato foi maior em animais com maior ingestão de energia. As produções de lactato e piruvato a partir de glicose, glutamato e propionato não foram afetadas pelo tratamento, entretanto, a taxa de metabolismo da glutamina a lactato e piruvato aumentou com a maior ingestão de energia. Em geral, a capacidade oxidativa das células do epitélio ruminal não foi muito influenciada pela dieta.

Na cetogênese que ocorre no fígado, a fonte de acetil-CoA é a oxidação mitocondrial, predominantemente de ácidos graxos de cadeia longa (Mayes, 1993). No caso do epitélio ruminal, a principal fonte de acetil-CoA é a oxidação mitocondrial de butirato, originado pela fermentação no TGI (Van Soest, 1994), que difunde livremente para as mitocôndrias (Mayes, 1993). As enzimas acetoacetil-CoA tiosulfotransferase e HMG-CoA sintetase podem regular a formação de corpos cetônicos. Diante disso, Lane et al. (2002) estudaram os efeitos da idade (um a 84 dias) e da dieta (leite; leite e concentrado; leite e infusão ruminal de AGV) sobre a expressão de mRNA para acetoacetil-CoA tiosulfotransferase e HMG-CoA

sintetase no epitélio ruminal de ovinos. As concentrações de mRNA para acetoacetil-CoA tiolase e HMG-CoA sintetase aumentaram com a idade, independentemente da dieta. Os níveis de mRNA para HMG-CoA sintetase obtidos de animais alimentados apenas com leite foram baixos antes de 42 dias após o nascimento, quando aumentaram bruscamente. Aos 84 dias, não houve efeito da dieta na expressão de ambas as enzimas. Pôde-se concluir que o desenvolvimento da capacidade cetogênica do epitélio ruminal ocorre com a idade, independentemente da dieta.

Pensando no rúmen como um ambiente heterogêneo, as diversas regiões do epitélio ruminal poderiam estar expostas a diferentes proporções e quantidade de produtos finais da fermentação e conseqüentemente expressar diferenças metabólicas. Waldron et al. (2002) compararam o metabolismo de AGV por células isoladas de diferentes regiões do rúmen de ovelhas. Após o sacrifício, fragmentos de mucosa foram retirados do saco cranial, do saco ventral, do pilar caudal e do saco dorsal do rúmen. As células foram isoladas por digestão seriada com tripsina e incubadas por duas horas com propionato e butirato. As incubações foram analisadas para 3-OH-butilato, acetoacetato, lactato e piruvato. A origem do tecido não influenciou significativamente a produção de metabólitos, indicando que a localização celular não é um fator crítico sobre a taxa de metabolismo de AGV em condições *in vitro*.

Utilizando vacas em lactação, De Visser et al. (1998) quantificaram os efeitos do estágio de maturidade da gramínea ensilada e das concentrações de amido de milho floculado na dieta sobre o fluxo esplâncnico de AGV. A liberação portal de acetato foi 14% a 31% menor do que a produção ruminal estimada. A liberação portal de propionato foi semelhante à produção estimada. A liberação portal de butirato mais 3-OH-butilato foi aproximadamente 70% da produção estimada. Uma falha deste trabalho foi a estimativa da produção ruminal de AGV, porém, ficou sugerido que o metabolismo de acetato e

propionato pela parede ruminal poderiam ser inferiores aos sugeridos na literatura (Bergman, 1990).

Por mais de trinta anos aceitou-se a hipótese de que grandes proporções de AGV eram metabolizados pelo epitélio do TGI (Bergman & Wolff, 1971). Além do artigo publicado por Bergman & Wolff (1971), outros trabalhos apoiaram esta hipótese (Bergman, 1990; Britton & Krehbiel, 1993; Seal & Parker, 1994). Porém, na década atual, um grupo de pesquisadores dinamarqueses gerou dados importantes que contrariam o que foi definido, por Kristensen & Danfaer (2001), como: “Hipótese de Bergman”. Um raciocínio simples, utilizado pelos pesquisadores para contrapor esta hipótese, será desenvolvido a seguir, com dados publicados por Resende Júnior et al. (2006b). A exigência de energia metabolizável para manutenção¹ foi 14,7 Mcal/d (NRC, 2001). As produções diárias médias de AGV foram 58,7 moles de acetato, 18,4 moles de propionato e 9,6 moles de butirato. A energia metabolizável fornecida pelos AGV foi obtida multiplicando-se o número de moles produzidos pelo calor de combustão de cada AGV². Os valores de energia metabolizável provenientes de acetato, propionato e butirato foram, respectivamente, 12,3; 6,8; e 5,0 Mcal/d. Pela hipótese de Bergman, 30% do acetato, 50% do propionato e 90% do butirato seriam metabolizados pelo epitélio ruminal. Como parte da energia do butirato é lançada sob corpos cetônicos no sangue portal, assumiu-se que 60% da energia do butirato seriam utilizados pelo epitélio (Kristensen & Danfaer, 2001). Portanto, um total de 10,1 Mcal/d de energia metabolizável³ seriam consumidos pelo epitélio, ou seja, 68,7% da exigência de manutenção total,

¹ Peso vivo médio = 568 kg.

² Calor de combustão: acetato = 0,209 Mcal/mol; propionato = 0,367 Mcal/mol; butirato = 0,524 Mcal/mol.

³ Energia metabolizável dos AGV = 3,7 Mcal de acetato + 3,4 Mcal de propionato + 3,0 Mcal de butirato.

caracterizando o epitélio como “suprafisiológico”. Alguns trabalhos publicados por este grupo de pesquisa serão reportados a seguir.

Kristensen et al. (2000b) investigaram o aparecimento portal líquido de AGV em ovelhas, não lactantes, não gestantes, recebendo infusões intra-ruminal de soluções contendo diferentes proporções de acetato, propionato, isobutirato, butirato e valerato. Os animais foram adaptados com cânula ruminal e catéteres nas artérias mesentérica cranial e aorta e nas veias porta, mesentérica cranial e ruminal direita. O *p*-aminohipurato foi infundido continuamente na veia mesentérica cranial ou na veia ruminal direita para determinar o fluxo sanguíneo. O fluxo sanguíneo portal aumentou com a infusão de AGV. As recuperações portais foram 85% para o propionato e 60% para o isobutirato. A recuperação portal do butirato aumentou de 21% para 32% com o aumento na taxa de infusão do butirato e com a diminuição na taxa de infusão de acetato, assim como a recuperação portal de valerato também aumentou de 14% para 21%. A recuperação portal de acetato foi 55%, quando mensurado como aparecimento portal líquido. Em um experimento prévio realizado pelos autores, a captação de ¹⁴C-acetato pelas vísceras da drenagem portal variou de 21 a 33%. Quando a recuperação portal de acetato foi corrigida, este valor ficou entre 75% e 78%. Os autores citaram que a utilização de AGV pelos microorganismos pode ter afetado os resultados. Sugeriu-se que a capacidade da β -oxidação no epitélio ruminal é limitada, o que explicaria o aumento da recuperação portal de butirato e valerato com o aumento na taxa de infusão de butirato.

Com o objetivo de estudar a recuperação portal de AGV, sem a interferência do metabolismo da microbiota ruminal, Kristensen et al. (2000a) utilizaram a técnica do ruminorretículo evacuado e lavado de quatro carneiros, infundidos com uma solução contendo AGV. Catéteres foram implantados na artéria mesentérica cranial e nas veias porta e ruminal direita, além de uma cânula ruminal. O ¹⁴C-acetato e o *p*-aminohipurato foram infundidos

continuamente na veia ruminal para determinar, respectivamente, o consumo de acetato pelas vísceras da drenagem portal e o fluxo sanguíneo portal. As recuperações portais de acetato, propionato e isobutirato foram 109%, 95% e 102%, respectivamente. As recuperações portais de butirato (23%), isovalerato (48%) e valerato (32%) foram inferiores as do acetato, propionato e isobutirato. Conclui-se que o butirato, o isovalerato e o valerato, metabolizados pela β -oxidação e por outras rotas cetogênicas no epitélio ruminal, são trabalhados extensivamente e que a maior parte do acetato, do propionato e do isobutirato atingem a circulação portal.

Apesar do extenso metabolismo do butirato pela parede ruminal (Kristensen et al., 2000a,b), não mais do que 15% a 20% do butirato infundido eram recuperados na veia porta sob a forma de 3-OH-butirato, o que sugeriu aos pesquisadores, um metabolismo visceral significativo de 3-OH-butirato. Kristensen et al. (2000c), estudaram o impacto do metabolismo de 3-OH-butirato arterial pelas vísceras da drenagem portal. O aparecimento portal líquido de butirato e de butirato mais 3-OH-butirato foram, respectivamente, vinte e 48% do butirato absorvido. O metabolismo de 3-OH-butirato pelas vísceras representou 32% a 44% da taxa de perda irreversível total do corpo. O aparecimento portal líquido de butirato mais 3-OH-butirato, corrigido para o metabolismo das vísceras, representou 62% do butirato absorvido. Os resultados sugeriram que a oxidação epitelial do butirato normalmente é superestimada.

Experimentos já haviam sido realizados para estudar o metabolismo de AGV pelo epitélio ruminal de ovinos. Restava saber se o comportamento dos AGV observados nos ovinos era o mesmo nos bovinos. Kristensen & Harmon (2004b), utilizando seis novilhos holandeses adaptados com cânula no rúmen e catéteres na artéria mesentérica cranial e nas veias mesentérica cranial, porta, hepática, ruminal direita e jugular externa, estudaram o metabolismo de AGV pelo ruminorretículo evacuado e lavado. O ^{13}C -acetato foi infundido na veia

jugular externa para determinar a utilização de acetato arterial pelas vísceras drenadas pela veia porta. O fluxo portal de acetato, corrigido pela captação visceral do acetato arterial, representou 105% do acetato absorvido no rúmen. O fluxo portal líquido de propionato representou 91% do propionato absorvido. Consideravelmente, menores proporções de butirato (27%) e valerato (30%) atingiram o sangue portal. A soma de AGV, 3-OH-butirato e lactato na veia porta representou 99% do total de unidades acetil e 103% das unidades propionil dos AGV absorvidos. A captação de acetato arterial pelas vísceras representou 35% a 45% do acetato total direcionado para a veia porta. Os resultados indicam que houve um pequeno metabolismo de acetato e propionato e que butirato e valerato são metabolizados intensivamente pelo epitélio ruminal. A maior parte do butirato e do valerato parece não ser metabolizada a CO₂, mas exportada como acetato, 3-OH-butirato e outros metabólitos como o lactato. Os dados obtidos neste estudo, associados aos resultados de estudos prévios com ovinos, levam à conclusão de que o epitélio ruminal não tem gasto energético “suprafisiológico”.

Sabendo que o butirato é um AGV metabolizado significativamente pelo epitélio ruminal, Kristensen & Harmon (2004a) estudaram a capacidade do epitélio ruminal metabolizar butirato e os efeitos do aumento do butirato ruminal sobre o metabolismo de outros nutrientes. Quatro novilhos holandeses adaptados com cânula no saco dorsal do rúmen e catéteres nos vasos da circulação portal, semelhantemente aos animais utilizados por Kristensen & Harmon (2004b), receberam infusões de soluções de AGV com níveis crescentes de butirato, no ruminorretículo evacuado e lavado. A concentração de acetato das soluções foi reduzida com o aumento do butirato para equilibrar a quantidade de AGV. As taxas de absorção ruminal de butirato (mmol/h) aumentaram com o aumento nas concentrações deste ácido. As taxas de absorção de propionato, isovalerato e valerato não foram afetadas pela solução. As recuperações portais de butirato e

valerato aumentaram com as maiores concentrações de butirato e representaram apenas 52% a 54% da quantidade absorvida destes ácidos, no tratamento com maior concentração de butirato (36 mM). A maior absorção de butirato resultou em menor extração hepática de propionato e butirato e aumentou as concentrações arteriais de propionato e butirato. Os resultados indicam que a capacidade metabólica do epitélio ruminal é limitada e que pode haver interação entre o metabolismo de butirato e valerato. Os autores especularam que poderia haver limitação da ativação do butirato e do valerato pela enzima butiril-CoA sintetase.

Os experimentos anteriores mostraram interação metabólica entre o butirato e o valerato, indicando que estes ácidos competem pela mesma rota metabólica no epitélio ruminal. Entretanto, apenas o efeito do aumento na concentração de butirato ruminal havia sido estudado (Kristensen & Harmon, 2004a). Para verificar os efeitos de valerato, caproato e heptanoato sobre os fluxos portal e hepático de AGV, glicose, lactato, 3-OH-butilato, glutamato, glutamina e insulina, Kristensen & Harmon (2005) usaram quatro novilhos com o ruminorretículo evacuado e lavado. Adaptações cirúrgicas foram semelhantes às aquelas dos trabalhos anteriores. As concentrações arteriais de valerato e heptanoato aumentaram com a inclusão dos respectivos ácidos na solução infundida no rúmen, mas não houve alterações na concentração arterial de caproato. O aumento na concentração de valerato (1,2 vs 8,0 mM) aumentou o fluxo portal líquido de butirato e valerato, assim como o fluxo esplâncnico líquido de propionato, butirato e valerato. Na presença de caproato (3,5 mM) e heptanoato (3,0 mM), os fluxos portais líquidos destes ácidos representaram 54% e 45% da quantidade absorvida, indicando um extenso metabolismo pelo epitélio ruminal. O caproato apresentou-se cetogênico no epitélio ruminal e no fígado e aumentou a concentração arterial, a diferença entre as concentrações na veia ruminal e arterial, o fluxo hepático líquido e o fluxo esplâncnico líquido de

3-OH-butirato. Mais uma vez, ficou claro o extenso metabolismo de AGV com cadeia linear contendo quatro ou mais carbonos e a possível competição pelas rotas metabólicas no epitélio ruminal. Os autores sugeriram que, além da β -oxidação, outro passo limitante para o metabolismo seria a ativação do butirato e do valerato pela enzima butiril-CoA sintetase, que tem alta afinidade por estes ácidos, pois a redução no metabolismo epitelial do butirato foi mais intensa na presença do valerato do que na presença do caproato e do heptanoato.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, O.; SHEN, Z.; TIETJEN, U.; MARTENS, H. Transport of acetate and sodium in sheep omasum: mutual, but asymmetric interactions. **Journal of Comparative Physiology: B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, Berlin, v. 176, n. 5, p. 477-487, June 2006.
- ASCHENBACH, J. R.; BHATIA, S. K.; PFANNKUCHE, H.; GÄBEL, G. Glucose is absorbed in a sodium-dependent manner from forestomach contents of sheep. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 11, p. 2797-2801, Nov. 2000a.
- ASCHENBACH, J. R.; WEHNING, H.; KURZE, M.; SCHABERG, E.; NIEPER, H.; BURCKHARDT, G.; GÄBEL, G. Functional and molecular biological evidence of SGLT-1 in the ruminal epithelium of sheep. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 279, n. 1, p. 20-27, July 2000b.
- ASH, R.; BAIRD, G. D. Activation of volatile fatty acids in bovine liver and rumen epithelium. **Biochemical Journal**, London, v. 136, n. 2, p. 311-319, Oct. 1973.
- ASH, R. W.; DOBSON, A. The effect of absorption on the acidity of rumen contents. **The Journal of Physiology**, London, v. 169, n. 1, p. 39-61, Nov. 1963.
- BADAWY, A. M.; CAMPBELL, R. M.; CUTHBERTSON, D. P.; MACKIE, W. S. Further studies on the changing composition of the digesta along the alimentary tract of the sheep: 3. changes in the omasum. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 12, n. 4, p. 391-402, Dec. 1958.
- BALDWIN, R. L. The proliferative actions of insulin, insulin-like growth factor-I, epidermal growth factor, butyrate and propionate on ruminal epithelial cells in vitro. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 261-268, May 1999.
- BALDWIN, R. L.; JESSE, B. W. Development changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep rumen epithelial cells. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 122, n. 5, p. 1149-1153, May 1992.

BALDWIN, R. L.; MCLEOD, K. R.; CAPUCO, A. V. Visceral tissue growth and proliferation during the bovine lactation cycle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 9, p. 2977-2986, Sept. 2004.

BALDWIN, R. L.; MCLEOD, K. R. Effects of diet forage:concentrate ratio and metabolizable energy intake on isolated rumen epithelial cell metabolism in vitro. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 3, p. 771-783, Mar. 2000.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.

BARCROFT, J.; MCANALLY, R. A.; PHILLIPSON, A. T. Absorption of volatile acids from the alimentary tract of the sheep and other animals. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 20, n. 2, p. 120-129, June 1944.

BARKER, I. K.; VAN DREUMEL, A. A.; PALMER, N. The alimentary system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic, 1995. v. 2, p. 1.

BARNES, R. J.; COMLINE, R. S.; DOBSON, A. Changes in the blood flow to the digestive organs of sheep induced by feeding. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, v. 68, n. 1, p. 77-88, Jan. 1983.

BECKER, R. B.; DIX ARNOLD, P. T.; MARSHALL, S. P. Development of the bovine stomach during fetal life. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 34, n. 4, p. 329-332, Apr. 1951.

BECKER, R. B.; MARSHALL, S. P.; DIX ARNOLD, P. T. Anatomy: development, and functions of the bovine omasum. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 46, n. 8, p. 835-839, Aug. 1963.

BEHARKA, A. A.; NAGARAJA, T. G.; MORRILL, J. L.; KENNEDY, G. A.; KLEMM, R. D. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 7, p. 1946-1955, July 1998.

BERGMAN, E. N. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 567-590, Apr. 1990.

BERGMAN, E. N.; WOLFF, J. E. Metabolism of volatile fatty acids by liver and portal-drained viscera in sheep. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 221, n. 2, p. 586-592, Aug. 1971.

BILK, S.; HUHN, K.; HONSCHA, K. U.; PFANNKUCHE, H. Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium. **Journal of Comparative Physiology: B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, Berlin, v. 175, n. 5, p. 365-374, July 2005.

BÖDEKER, D.; LAMY, S.; MAHLER, M.; HÖLLER, H. Effects of short chain fatty acids on electrophysiological properties and permeability characteristics of sheep (*Ovis aries*) abomasal mucosa. **Comparative Biochemistry and Physiology: A, Comparative Physiology**, Oxford, v. 107, n. 1, p. 73-79, Jan. 1994.

BOLTON, J. R.; MERRIT, A. M.; CARLSON, G. M.; DONAWICK, W. J. Normal abomasal electromyography and emptying in sheep and the effects of intraabomasal volatile fatty acid infusion. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 37, n. 12, p. 1387-1392, Dec. 1976.

BOTTENSTEIN, J. M.; HAYASHI, I.; HUTCHINGS, S.; MASI, H.; MATHER, J.; MCCLURE, D. B.; OHASA, S.; RIZZINO, A.; SATO, G.; SRRERO, G.; WOLFE, R.; WU, R. **Methods in enzymology**. London: Academic, 1979. v. 58, 94 p.

BOYNE, A. W.; CAMPBELL, R. M.; DAVIDSON, J.; CUTHBERTSON, D. P. Changes in composition of the digesta along the alimentary tract of sheep. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 10, n. 4, p. 325-333, Dec. 1956.

BRITTON, R.; KREHBIEL, C. Nutrient metabolism by gut tissues. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 7, p. 2125-2131, July 1993.

BROWNLEE, A. The development of rumen papillae in cattle fed on different diets. **British Veterinary Journal**, London, v. 112, n. 4, p. 369-375, July/Aug. 1956.

BUENO, L.; GOODALL, E. D.; KAY, R. N. B.; RUCKEBUSCH, Y. On the function of the sheep's omasum. **The Journal of Physiology**, London, v. 227, n. 2, p. 14-15, Jan. 1972. Supplement.

BUENO, L.; RUCKEBUSCH, Y. The cyclic motility of the omasum and its control in sheep. **The Journal of Physiology**, London, v. 238, n. 2, p. 295-312, Apr. 1974.

CARE, A. D.; BROWN, R. C.; FARRAR, A. R.; PICKARD, D. W. Magnesium absorption from the digestive tract of sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, v. 69, n. 3, p. 577-587, July 1984.

CARTER, M. J. The carbonic anhydrase in the rumen epithelial tissue of the ox. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 235, n. 1, p. 222-236, Apr. 1971.

CONHAD, H. R.; HIBBS, J. W.; POUNDEN, W. D. Absorption of rumen volatile fatty acids from the forestomachs of young dairy calves fed high roughage rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 39, n. 1, p. 97-98, Jan. 1956.

COSTA, S. F. **Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerros**. 2003. 110 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CRICHLLOW, E. C.; CHAPLIN, R. K. Ruminant lactic acidosis: Relationship of fore stomach motility to non dissociated volatile fatty acids levels. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, n. 9, p. 1908-1911, Sept. 1985.

DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C.; MELO, L. Q.; SOUZA, R. L. M.; GUERREIRO, M. C. Funcionalidade do sulco do retículo em bovinos adultos e avaliação de técnicas alternativas para preparação, infusão e coleta de marcadores da fase fluida ruminal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1850-1856, nov./dez. 2007.

DANIELLI, J. F.; HITCHCOCK, M. W. S.; MARSHALL, R. A.; PHILLIPSON, A. T. The mechanism of absorption from the rumen as exemplified by the behaviour of acetic, propionic and butyric acids. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 22, n. 1, p. 75-84, Dec. 1945.

DE VISSER, H.; KLOP, A.; VAN DER MEULEN, J.; VAN VUUREN, A. M. Influence of maturity of grass silage and flaked corn starch on the production and metabolism of volatile fatty acids in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 4, p. 1028-1035, Apr. 1998.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397 p.

DIJKSTRA, J.; BOER, H.; VAN BRUCHEM, J.; BRUINING, M.; TAMMINGA, S. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 69, n. 2, p. 385-396, Mar. 1993.

DIRKSEN, G.; LIEBICH, H. G.; MAYER, E. Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. **The Bovine Practitioner**, Montreal, n. 20, p. 116-120, Nov. 1985.

DOBSON, A. Active transport through the epithelium of the reticulo-rumen sac. **The Journal of Physiology**, London, v. 146, n. 2, p. 235-251, May 1959.

EDRISE, B. M.; SMITH, R. H. Absorption of volatile fatty acids in different compartments of the ruminant stomach. **The Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 36, n. 3, p. 149, Dec. 1977.

EDRISE, B. M.; SMITH, R. H.; HEWITT, D. Exchange of water and certain water-soluble minerals during passage of digesta through the stomach compartments of young ruminating bovines. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 55, n. 1, p. 157-167, Jan. 1986.

FLATT, W. P.; WARNER, R. G.; LOOSLI, J. K. Influence of purified materials on the development of the ruminant stomach. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 41, n. 11, p. 1593-1600, Nov. 1958.

FUKUSHIMA, M. Chemistry of short-chain fatty acids. In: CUMMINGS, J. H.; ROMBEAU, L.; SAKATA, T. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University, 1995. p. 15-34.

GÄBEL, G. Transport of short-chain fatty acids in the ruminant forestomach. In: CUMMINGS, J. H.; ROMBEAU, L.; SAKATA, T. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University, 1995. p. 133-147.

GÄBEL, G.; ASCHENBACH, J. R. Influence of food deprivation on the transport of 3-O-methyl- α -D-glucose across the isolated ruminal epithelium of sheep. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, n. 10, p. 2740-2746, Oct. 2002.

GÄBEL G.; ASCHENBACH, J. R.; MÜLLER, F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 3, n. 1, p. 15-30, June 2002.

GÄBEL, G.; BESTMANN, M.; MARTENS, H. Influences of diet, short-chain fatty acids, lactate and chloride on bicarbonate movement across the reticulo-rumen wall of sheep. **Journal of Veterinary Medicine A**, Berlin, v. 38, n. 7, p. 523-529, Aug. 1991.

GÄBEL, G.; BILK, S.; URBANSKY, I. **SCFA absorption in the rumen and regulating intracellular pH**. Disponível em: <<http://www.vmf.uni-leipzig.de/ik/wphysiologie/48.htm>>. Acesso em: 4 dez. 2007.

GÄBEL, G.; MAREK, M.; MARTENS, H. Influence of food deprivation on SCFA and electrolytes transport across sheep reticulorumen. **Journal of Veterinary Medicine: A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, Berlin, v. 40, n. 5, p. 339-344, June 1993.

GÄBEL, G.; MÜLLER, F.; PFANNKUCHE, H.; ASCHENBACH, J. R. Influence of isoform and DNP on butyrate transport across the sheep ruminal epithelium. **Journal of Comparative Physiology: B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, Berlin, v. 171, n. 3, p. 215-221, Apr. 2001.

GAEBEL, G.; BELL, M.; MARTENS, H. The effect of low mucosa pH on sodium and chloride movement across the isolated rumen mucosa of sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, v. 74, n. 1, p. 35-44, Jan. 1989.

GAEBEL, G.; MARTENS, H.; SUENDERMANN, M.; GÁLFI, P. The effects of diet, intraruminal pH and osmolarity on sodium, chloride and magnesium absorption from the temporarily isolated and washed reticulo-rumen of sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, v. 72, n. 4, p. 501-511, Oct. 1987a.

GAEBEL, G.; SUENDERMANN, M.; MARTENS, H. The influence of osmotic pressure, lactic acid and pH on ion and fluid absorption from the washed and temporarily isolated reticulo-rumen of sheep. **Zentralblatt für Veterinärmedizin A**, Berlin, v. 34, n. 3, p. 220-226, Mar. 1987b.

GÁLFI, P.; NEOGRÁDY, S.; KUTAS, F. Dissimilar ruminal epithelial response to short-term and continuous intraruminal infusion of sodium n-butyrate.

Zentralblatt für Veterinärmedizin A, Berlin, v. 33, n. 1, p. 47-52, Jan. 1986.

GÁLFI, P.; VERESEGYHÁZY, T.; NEOGRÁDY, S.; KUTAS, F. Effect of sodium n-butyrate on primary ruminal epithelial cell culture. **Zentralblatt für Veterinärmedizin A**, Berlin, v. 28, n. 3, p. 259-261, 1981.

GARCIA, C. D.; HERNANDEZ, M. P.; CANTALAPIEDRA, G.; SALAS, J. M.; MERINO, J. A. Bypassing the rumen in dairy ewes: the reticular groove reflex vs. calcium soap of olive fatty acids. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 2, p. 741-747, Feb. 2005.

GINSBURG, E.; SALAMON, D.; SREEVALSAN, T.; FREESE, E. Growth inhibition and morphological changes caused by lipophilic acids in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 70, p. 2457-2461, Aug. 1973.

GOODLAD, R. A some effects of diet on the mitotic index and the cell cycle of the ruminal epithelium of sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, v. 66, n. 4, p. 487-499, Oct. 1981.

GRAY, F. V. The absorption of volatile fatty acids from the rumen: II the influence of pH on absorption. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 25, n. 2, p. 135-144, June 1948.

GRAY, F. V.; PILGRIM, A. F.; WELLER, R. A. Functions of the omasum in the stomach of sheep. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 31, n. 1, p. 49-55, Mar. 1954.

GREENWOOD, R. H.; MORRIL, J. L.; TITGEMEYER, E. C.; KENNEDY, G. A. A new method of measuring diet abrasion and its effect on the development of the fore stomach. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 10, p. 2534-2541, Oct. 1997.

GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 9, p. 2820-2833, Sept. 1995.

HAMILTON, A. I.; BLACKWOOD, H. J. J. Insulin deficiency and cell proliferation in oral mucosal epithelium of the rat. **Journal of Anatomy**, London, v. 124, n. 3, p. 757-763, Dec. 1977.

HARMON D. L.; GROSS, K. L.; KREHBIEL, C. R.; KREIKEMEIER, K. K.; BAUER, M. L.; BRITTON, R. A. Influence of dietary forage and energy intake on metabolism and acyl-CoA synthetase activity in bovine ruminal epithelial tissue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 10, p. 4117-4127, Oct. 1991.

HARRISON, K. B.; WARNER, R. G.; SANDER, E. G.; LOOSLI, J. K. Changes in the tissue and volume of the stomachs of calves following the removal of dry feed or consumption of inert bulk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 43, n. 9, p. 1301-1312, Sept. 1960.

HINDERS, R. G.; OWEN, F. G. Relation of ruminal parakeratosis development to volatile fatty acid absorption. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 48, n. 8, p. 1069-1074, Aug. 1965.

HODSON, H. H.; MCGILLIARD, A. D.; JACOBSON, N. L.; ALLEN, R. S. Metabolic role of rumen mucosa in absorption of butyrate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 48, n. 12, p. 1652-1656, Dec. 1965.

HOLTENIUS, K. Intraruminal loading with short chain fatty acids in the food-deprived goat. **Swedish Journal of Agricultural Research**, Uppsala, v. 21, p. 79-84, 1991.

HUG, M. J. Transepithelial measurements using the Ussing chamber. **The European Working Group on CFTR Expression**. 2002. Disponível em: <http://pen2.igc.gulbenkian.pt/cftr/vr/e/hug_transepithelial_measurements_using_the_ussing_chamber.pdf>. Acesso em: 4 dez. 2007.

IGGO, A.; LEEK, B. F. An electrophysiological study of some reticulo-ruminal and abomasal reflexes in sheep. **The Journal of Physiology**, London, v. 193, n. 1, p. 95-119, Nov. 1967.

JENSEN, R.; FLINT, J. C.; UDALL, R. H.; DEEM, A. W.; SEGER, C. L. Parakeratosis of the rumens of lambs fattened on the pelleted feed. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 19, n. 71, p. 277-282, Apr. 1958.

JOHNSTON, R. P.; KESLER, E. M.; MCCARTHY, R. D. Absorption of organic acids from the omasum. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 44, n. 2, p. 331-339, Feb. 1961.

JOYNER, A. E.; KESLER, E. M.; HOLTER, J. B. Absorption from the omasum and subsequent metabolism of butyrate and acetate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 46, n. 10, p. 1108-1113, Oct. 1963.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, London, v. 26, n. 4, p. 239-257, Aug. 1972.

KIRAT, D.; MASUOKA, J.; HAYASH, H.; IWANO, H.; YOKOTA, H.; TANIYAMA, H.; KATO, S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. **The Journal of Physiology**, Oxford, v. 576, n. 2, p. 635-647, Aug. 2006.

KRAMER, T.; MICHELBERGER, T.; GURTLER, H.; GABEL, G. Absorption of short-chain fatty acids across ruminal epithelium of sheep. **Journal of Comparative Physiology: B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, Berlin, v. 166, n. 4, p. 262-269, Jan. 1996.

KRISTENSEN, N. B.; DANFAER, A. The relationship between gastrointestinal production and portal absorption of short-chain fatty acids in ruminants. In: SYMPOSIUM ON ENERGY METABOLISM IN ANIMALS 15., 2001, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen Pers: EAAP, 2001. p. 277-280.

KRISTENSEN, N. B.; GÄBEL, G.; PIERZYNOWSKI, S. G.; DANFAER, A. Portal recovery of short-chain fatty acids infused into the temporarily-isolated and washed reticulo-rumen of sheep. **The British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 84, n. 4, p. 477-482, Oct. 2000a.

KRISTENSEN, N. B.; HARMON, D. L. Effect of increasing ruminal butyrate absorption on splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, n. 12, p. 3549-3559, Dec. 2004a.

KRISTENSEN, N. B.; HARMON, D. L. Splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, n. 7, p. 2033-2042, July 2004b.

KRISTENSEN, N. B.; HARMON, D. L. Effects of adding valerate, caproate, and heptanoate to ruminal buffers on splanchnic metabolism in steers under washed-rumen conditions. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 83, n. 8, p. 1899-1907, Aug. 2005.

KRISTENSEN, N. B.; PIERZYNOWSKI, S. G.; DANFAER, A. Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intraruminally infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 5, p. 1372-1379, May 2000b.

KRISTENSEN, N. B.; PIERZYNOWSKI, S. G.; DANFAER, A. Portal-drained visceral metabolism of 3-hydroxybutyrate in sheep. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 8, p. 2223-2228, Aug. 2000c.

KUTAS, F.; GÁLFI, P.; NEOGRÁDY, S. Effect of monensin on development of ruminal parakeratosis in fattening lambs. **Zentralblatt für Veterinärmedizin A**, Berlin, v. 30, n. 7, p. 506-510, Aug. 1983.

LANE, M. A.; BALDWIN, R. L.; JESSE, B. W. Sheep rumen metabolic development in response to age and dietary treatments. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 7, p. 1990-1996, July 2000.

LANE, M. A.; BALDWIN, R. L.; JESSE, B. W. Developmental changes in ketogenic enzyme gene expression during sheep rumen development. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, n. 6, p. 1538-1544, June 2002.

LAVKER, R.; CHALUPA, W.; DICKEY, J. F. An electron microscopic investigation of rumen mucosa. **Journal of Ultrastructure Research**, New York, v. 28, n. 1, p. 1-15, July 1969.

LEEK, B. F.; HARDING, R. H. Sensory nervous receptors in the ruminant stomach and the reflex control of reticuloruminal motility. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF RUMINANT PHYSIOLOGY, DIGESTION AND METABOLISM IN THE RUMINANT**, 4., 1975, Sydney. **Proceedings...** Sydney: [s.n.], 1975. p. 60.

LEO, A.; HANSCH, C.; ELKINS, D. Partition coefficients and their uses. **Chemical Reviews**, Washington, v. 71, n. 6, p. 525-616, Dec. 1971.

LEONHARD-MAREK, S.; BECKER, G.; BREVES, G.; SCHRÖDER, B. Chloride, gluconate, sulfate, and short-chain fatty acids affect calcium flux rates across the sheep forestomach epithelium. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 90, n. 3, p. 1516-1526, Mar. 2007.

LEONHARD-MAREK, S.; BREVES, G.; BUSCHE, R. Effect of chloride on pH microclimate and electrogenic Na^+ absorption across the rumen epithelium

of goat and sheep. **American Journal Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 291, n. 2, p. 246-252, Aug. 2006.

LESMEISTER, K. E.; TOZER, P. R.; HEINRICHS, A. J. Development and analysis of a rumen tissue sampling procedure. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 5, p. 1336-1344, May 2004.

LIEBICH, H. G.; DIRKSEN, G.; ARBEL, A.; DORI, S.; MAYER, E. Feed dependent changes of the ruminal mucosa of high producing dairy cows during the dry period and first eight weeks post partum. **Zentralblatt für Veterinärmedizin A**, Berlin, v. 34, n. 9, p. 661-672, Nov. 1987.

LÓPEZ, S.; HOVELL, F. D. D.; DIJKSTRA, J.; FRANCE, J. Effects of volatile fatty acid supply on their absorption and on water kinetics in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 81, n. 10, p. 2609-2616, Oct. 2003.

LÓPEZ, S.; HOVEL, F. D. D.; MacLEOD, N. A. Osmotic pressure, water kinetics and volatile fatty acid absorption in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 71, n. 2, p. 153-168, Feb. 1994.

MARTENS, H.; GÄBEL, G. Transport of Na and Cl across the epithelium of ruminant forestomachs: rumen and omasum. **Comparative Biochemistry Physiology: A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 90, n. 4, p. 569-575, 1988.

MARTENS, H.; GÄBEL, G.; STROZYK, B. Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 76, n. 1, p. 103-114, Jan. 1991.

MASSON, M. J.; PHILLIPSON, A. T. The absorption of acetate, propionate and butyrate from the rumen of sheep. **The Journal of Physiology**, London, v. 113, n. 2/3, p. 189-206, Apr. 1951.

MATTHEWS, J. C.; WEBB, K. E. Absorption of L-carnosine, L-methionine, and L-methionylglycine by isolated sheep ruminal and omasal epithelial tissue. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73, n. 11, p. 3464-3475, Nov. 1995.

MAYES, P. A. M. Oxidation of fatty acids: ketogenesis. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's Biochemistry**. 3. ed. Rio de Janeiro: Prentice Hall do Brasil, 1993. p. 220-231.

McClymont, G. L. Identification of the volatile fatty acid in the peripheral blood and rumen of cattle and the blood of other species. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 2, n. 1, p. 92-103, 1951.

McCollum, M. Q.; Webb, K. E. Glycyl-L-sarcosine absorption across ovine omasal epithelium during coincubation with other peptide substrates and volatile fatty acids. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, n. 10, p. 2706-2711, Oct. 1998.

McLeod, K. R.; Baldwin, R. L. Effects of diet forage:concentrate ratio and metabolizable energy intake on visceral organ growth and in vitro oxidative capacity of gut tissues in sheep. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 3, p. 760-770, Mar. 2000.

McSweeney, C. S. A comparative study of the anatomy fo the omasum in domestic ruminants. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 65, n. 7, p. 205-207, July 1988.

Melo, L. Q. **Morfometria ruminal e efeito do pH e do volume da digesta sobre a absorção de ácidos graxos voláteis**. 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Müller, F.; Aschenbach, J. R.; Gäbel, G. Role of Na⁺/H⁺ exchange and HCO₃⁻ transport in pH_i recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen. **Journal of Comparative Physiology: B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, Berlin, v. 170, n. 4, p. 337-343, June 2000.

Müller, F.; Huber, K.; Pfannkuche, H.; Aschenbach, J. R.; Breves, G.; Gäbel, G. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 283, n. 5, p. 1139-1146, Nov. 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requerimentes of dairy cattle**. 6. ed. rev. Washington, DC: National Academy of Science, 1989. 158 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. rev. Washington, DC: National Academy of Science, 2001. 408 p.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. **The viscera of the domestic mammals**. 2. ed. rev. Berlin; Hamburg: Verlag Paul Parey, 1979. 403 p.

NIEBUHR, V. **In vitro Untersuchungen zum Bicarbonattransport des Blättermagenepithels von Schafen**. 2003. Dissertation (MS) - Freien Universität Berlin, Berlin.

OHWADA, S.; TAMATE, H. DNA microphotometry on ruminal epithelial cells in the sheep. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Sendai-shi, v. 30, n. 1, p. 16-19, Aug. 1979.

OHWADA, S.; TAMATE, H. Circadian rhythm of the mitotic index in the rumen epithelium of sheep. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Sendai-shi, v. 33, n. 3/4, p. 138-41, Mar. 1983.

ORSKOV, E. R.; BENZIE, D.; KAY, R. N. B. The effects of feeding procedure on closure of the oesophageal groove in young sheep. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 24, n. 3, p. 785-795, Sept. 1970.

PARTHASARATHY, D.; PHILLIPSON, A. T. The movement of potassium, sodium, chloride and water across the rumen epithelium of sheep. **The Journal of Physiology**, London, v. 121, n. 3, p. 452-469, Sept. 1953.

PENNINGTON, R. J. The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep: I. fatty acid utilization and ketone body production by rumen epithelium and other tissue. **The Biochemical Journal**, London, v. 51, n. 2, p. 251-258, May 1952.

PERRIER, R.; FERCHAL, E.; DURIER, C.; DOREAU, M. Effect of under nutrition on the ability of the sheep rumen to absorb volatile fatty acids. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 34, n. 4, p. 341-347, 1994.

PETERS, J. P.; SHEN, R. Y. W.; CHESTER, S. T. Propionic acid disappearance from the foregut and small intestine of the beef steer. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 11, p. 3905-3913, Nov. 1990a.

PETERS, J. P.; SHEN, R. Y. W.; ROBINSON, J. A. Disappearance of acetic acid from the bovine reticulorumen at basal and elevated concentrations of acetic acid. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 5, p. 1509-1517, May 1992.

PETERS, J. P.; SHEN, R. Y. W.; ROBINSON, J. A.; CHESTER, S. T.
Disappearance and passage of propionic acid from the rumen of the beef steer.
Journal of Animal Science, Champaign, v. 68, n. 10, p. 3337-3349, Oct. 1990b.

PFANDER, W. H.; PHILLIPSON, A. T. The rates of absorption of acetic propionic and *n*-butyric acids. **The Journal of Physiology**, London, v. 122, n. 1, p. 102-110, Oct. 1953.

PILGRIM, C.; ERB, W.; MAURER, W. Diurnal fluctuations in the numbers of DNA synthesizing nuclei in various mouse tissues. **Nature**, London, v. 199, n. 4896, p. 863, Aug. 1963.

RESENDE JÚNIOR, J. C.; ALONSO, L. S.; PEREIRA, M. N.; ROCA, M. G. M.; DUBOC, M. V.; OLIVEIRA, E. C.; MELO, L. Q. Effect of the feeding pattern on rumen wall morphology of cows and sheep. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 526-536, jul./ago. 2006a.

RESENDE JÚNIOR, J. C.; PEREIRA, M. N.; BÔER, H.; TAMMINGA, S. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, n. 8, p. 3096-3106, Aug. 2006b.

ROBINSON, P. H.; TAMMINGA, S.; VAN VUUREN, A. M. Influence of declining level of feed intake and varying proportion of starch in the concentrate on milk production and whole tract digestibility in dairy cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 17, p. 19-35, 1987a.

ROBINSON, P. H.; VAN VUUREN, A. M.; TAMMINGA, S. Influence of declining level of feed intake and varying proportion of starch in the concentrate on tureen ingesta quantity, composition and kinetics of ingesta turnover in dairy cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 17, p. 37-62, 1987b.

RUPP, G. P.; KREIKEMEIER, K. K.; PERINO, L. J.; ROSS, G. S. Measurement of volatile fatty acid disappearance and fluid flux across the abomasum of cattle, using an improved omasal cannulation technique. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 55, n. 4, p. 522-529, Apr. 1994.

SAKATA, T.; HIKOSAKA, K.; SHIOMURA, Y.; TAMATE, H. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 44, n. 3, p. 325-331, Nov. 1980.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Effect of the intermittent feeding on the index and the ultra structure of basal cells of the ruminal epithelium in sheep. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Sendai-shi, v. 25, n. 3/4, p. 156-163, Dec. 1974.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Effect of intraruminal injection of n-sodium butyrate on the mitotic indices in sheep ruminal epithelium. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Sendai-shi, v. 27, n. 3/4, p. 133-135, Dec. 1976.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelium cell proliferation accelerated by propionate and acetate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 62, n. 1, p. 49-52, Jan. 1979.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Presence of circadian rhythm in the mitotic index of the ruminal epithelium in sheep. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 1-3, Jan. 1978a.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelium cell proliferation accelerated by rapid increase in intra-ruminal butyrate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 61, n. 8, p. 1109-1113, Aug. 1978b.

SANDER, E. G.; WARNER, R. G.; HARRISON, H. N.; LOOSLI, J. K. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on development of rumen mucosae in the young calf. **Journal of dairy Science**, Champaign, v. 42, n. 9, p. 1600-1605, Sept. 1959.

SCHNORR, B.; VOLLMERHAUS. The vascular system of the rumen of cattle and goats. **Zentralblatt für Veterinärmedizin A**, Berlin, v. 15, n. 9, p. 799-828, Dec. 1968.

SEAL, C. J.; PARKER, D. S. Effect of intraruminal propionic acid infusion on metabolism of mesenteric- and portal-drained viscera in growing steers fed a forage diet: I. volatile fatty acids, glucose, and lactate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 5, p. 1325-1334, May 1994.

SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; MOLLER, P. D.; SKADHAUGE, E. Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA chain length and pH. **Comparative Biochemistry and Physiology: A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 123, n. 4, p. 359-368, Aug. 1999a.

SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; MOLLER, P. D.; SKADHAUGE, E. Transport of butyrate across the isolated bovine rumen epithelium: interaction with sodium, chloride and bicarbonate. **Comparative Biochemistry and Physiology: A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 123, n. 4, p. 399-408, Aug. 1999b.

SEHESTED, J.; DIERNAES, L.; MOLLER, P. D.; SKADHAUGE, E. Transport of sodium across the isolated bovine rumen epithelium: interaction with short-chain fatty acids, chloride and bicarbonate. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 81, n. 1, p. 79-94, Jan. 1996.

SHEN, Z.; SEYFERT, H. M.; LÖHRKE, B.; SCHNEIDER, F.; ZITNAN, R.; CHUDY, A.; KUHLA, S.; HAMMON, H. M.; BLUM, J. W.; MARTENS, H.; HAGEMEISTER, H.; VOIGT, J. An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, n. 1, p. 11-17, Jan. 2004.

SKLAN, D.; HURWITZ, S. Movement and absorption of major minerals and water in ovine gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 7, p. 1659-1666, July 1985.

STALLCUP, O. T.; KREIDER, D. L.; RAKES, J. M. Histological development and histochemical localization of enzymes in rumen and reticulum in bovine fetuses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 6, p. 1773-1789, June 1990.

STEVENS, C. E. Fatty acid transport through the rumen epithelium. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHYSIOLOGY OF DIGESTION AND METABOLISM IN THE RUMINANT, 3., 1969, Cambridge. **Proceedings...** Cambridge: Oriel, 1970. p. 101-112.

STEVENS, C. E.; HUME, I. D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production na consevation of nutrients. **Physiological Reviews**, Washington, v. 78, n. 2, p. 393-427, Apr. 1998.

STEVENS, C. E.; STETTLER, B. K. Factors affecting the transport of volatile fatty acids across rumen epithelium. **The American Journal of Physiology**, [S.I.], v. 210, n. 2, p. 365-372, Feb. 1966.

SUTTON, J. D.; MCGILLIARD, A. D.; JACOBSON, N. L. Functional development of rumen mucosa: I. absorptive ability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 46, n. 5, p. 426-436, May 1963a.

SUTTON, J. D.; MCGILLIARD, A. D.; RICHARD, M.; JACOBSON, N. L. Functional development of rumen mucosa: II. metabolic activity. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 46, n. 6, p. 530-537, June 1963b.

SVENDSEN, P. Etiology and pathogenesis of abomasal displacement in cattle. **Nordish Veterinary Medicine**, Copenhagen, v. 21, p. 1, 1969. Supplement 1.

TAMATE, H.; FELL, B. F. Cell deletion as a factor in the regulation of rumen epithelial populations. **Veterinary Science Communications**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 359-364, Dec. 1977.

TAMATE, H.; KIKUCHI, T. Electron microscopy study on parakeratotic ruminal epithelium in beef cattle. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v. 40, n. 1, p. 21-30, Feb. 1978.

TAMATE, H.; KIKUCHI, T.; SAKATA, T. Ultrastructural changes in the ruminal epithelium after fasting and subsequent refeeding in the sheep. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Sendai-shi, v. 25, n. 3/4, p. 142-152, Dec. 1974.

TAMATE, H.; MCGILLIARD, A. D.; JACOBSON, N. L.; GETTY, R. The effect of various diets on the anatomical development of the stomach in the calf. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 45, n. 3, p. 408-420, Mar. 1962.

TAMMINGA, S.; VAN VUUREN, M. Formation and utilization of end products of lignocellulose degradation in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 21, n. 2/4, p. 141-159, Oct. 1988.

TAYLOR, T. A.; RAMSEY, H. A. Metabolism of n-butyrate and propionate by the rumen epithelium. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 48, n. 4, p. 505-509, Apr. 1965.

THOMPSON, G. B.; KINTNER, L. D.; PFANDER, W. H. Some effects of ration preparation on alterations of the rumen mucous membrane. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 17, n. 4, p. 1220, Nov. 1958.

THORLACIUS, S. O.; LODGE, G. A. Absorption of steam-volatile fatty acids from the rumen of the cow as influenced by diet, buffers, and pH. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 53, p. 279-288, June 1973.

TOMAS, F. M.; POTTER, B. J. The site of absorption of magnesium from the stomach of sheep. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 36, n. 1, p. 37-45, July 1976.

USSING, H. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. **Acta Physiologica Scandinavica**, [S.I.], v. 23, p. 110-127, 1981.

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

VAZQUEZ-AÑÓN, M.; BERTICS, S. J.; LUCK, M.; GRUMMER, R. R.; PINHEIRO, J. C. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 6, p. 1521-1528, June 1994.

VOELKER, J. A.; ALLEN, M. S. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 3. effects on ruminal fermentation, pH, and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 11, p. 3562-3570, Nov. 2003.

VON ENGELHARDT, W.; HALES, J. R. S. Partition of capillary blood flow in rumen, reticulum, and omasum of sheep. **The American Journal of Physiology**, Washington, v. 232, n. 1, p. 53-56, Jan. 1977.

WALDRON, M. R.; SCHRICK, F. N.; QUIGLEY, J. D.; KLOTZ, J. L.; SAXTON, A. M.; HEITMANN, R. N. Volatile fatty acids metabolism by epithelial cells isolated from different areas of the ewe rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 1, p. 270-278, Jan. 2002.

WALTER, A.; GUTKNECHT, J. Permeability of small non-electrolytes through lipid bilayer membranes. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 90, n. 3, p. 207-217, Oct. 1986.

WARNER, E. D. The Organogenesis and early histogenesis of the bovine stomach. **The American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 102, n. 1, p. 33-63, Jan. 1958.

WEEKES, T. E. C. Effects of pregnancy and lactation in sheep on the metabolism of propionate by the ruminal mucosa and on some enzymatic activities in the ruminal mucosa. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 79, p. 409-421, 1972.

WEIGAND, E.; YOUNG, J. W.; MCGILLIARD, A. D. Volatile fatty acid metabolism by rumen mucosa from cattle fed hay or grain. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 9, p. 1294-1300, Sept. 1975.

WEIGAND, E.; YOUNG, J. W.; MCGILLIARD, A. D. Extent of butyrate metabolism by bovine ruminoreticulum epithelium and the relationship to absorption rate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 55, n. 5, p. 589-597, May 1972a.

WEIGAND, E.; YOUNG, J. W.; MCGILLIARD, D. Extent of propionate metabolism during absorption from the bovine ruminoreticulum. **Biochemical Journal**, London, v. 126, n. 1, p. 201-209, Jan. 1972b.

WILLES, R. F.; MENDEL, V. E.; ROBBLEE, A. R. Water transfer from the reticulo-rumen in sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 31, n. 1, p. 85-91, July 1970.

WOODFORD, S. T.; MURPHY, M. R.; DAVIS, C. L.; HOLMES, K. R. Ruminal bypass of drinking water in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 10, p. 2471-2474, Oct. 1984.

YAMAMOTO, Y.; KITAMURA, N.; YAMADA, J.; YAMASHITA, T. Muscular architecture in the omasal laminae of cattle and sheep. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 249-256, July 1991.

ZHAO, G. Y.; DURIC, M.; MacLEOD, N. A.; ORSKOV, E. R.; HOVELL, F. D. D.; FENG, Y. L. The use of intragastric nutrition to study saliva secretion and the relationship between rumen osmotic pressure and water transport. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 73, n. 2, p. 155-161, Feb. 1995.

CAPÍTULO 2
PARTICIPAÇÃO DO RUMINORRETÍCULO E OMASO NA
SUPERFÍCIE ABSORTIVA TOTAL DO PROVENTRÍCULO DE
BOVINOS

(DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C.; CRUZ, F. J. Participação do ruminorretículo e omaso na superfície absorviva total do proventrículo de bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 688-694, set./out. 2006.)

RESUMO

Cerca de 60% dos ácidos graxos voláteis (AGV) produzidos no ruminorretículo são absorvidos neste compartimento e outros 40% passam com a fase fluida para o omaso e são absorvidos antes do duodeno. O objetivo deste trabalho foi mensurar a superfície de absorção do ruminorretículo e do omaso comparando-as com a magnitude de absorção. Oito bovinos adultos tiveram seu estômago removido imediatamente após o abate. Os compartimentos do estômago foram separados, pesados e tiveram fragmentos coletados em diversas regiões anatômicas. Procedeu-se a mensuração da superfície interna total por meio de captura e análise de imagens digitalizadas. A superfície absorviva do ruminorretículo (7,7 m²) foi maior ($P < 0,01$) do que a do omaso (2,1 m²). A razão superfície/digesta, entretanto, foi maior ($P = 0,07$) no omaso (0,31 m²/kg) do que no ruminorretículo (0,13 m²/kg), representando uma superfície 2,4 vezes maior no omaso por unidade de digesta. A razão superfície absorviva/superfície de parede de um fragmento do saco ventral do rúmen apresentou correlação positiva e alta ($r = 0,84$; $P = 0,02$) com a superfície absorviva total do rúmen, indicando ser possível a estimativa da superfície total do órgão por meio de biópsia. As superfícies absorvivas dos compartimentos parecem ser compatíveis com a magnitude de absorção, entretanto, estudos que comparem as taxas fracionais de absorção de AGV entre os compartimentos devem ser realizados.

Palavras - chave: Rúmen, Reticulo, Estômago, Ácidos Graxos Voláteis

**PARTICIPATION OF THE RETICULORUMEN AND OMASUM IN
THE TOTAL ABSORPTIVE SURFACE OF THE BOVINE
FORESTOMACH**

ABSTRACT

About 60% of volatile fatty acids (VFA) produced in reticulorumen are absorbed in this compartment. The other 40% pass with the fluid phase to the omasum and are absorbed before the duodenum. The objective of this experiment was to measure the absorption surface of the reticulorumen and omasum aiming to compare it with the absorption magnitude. Eight adult bovines had their stomachs removed immediately after slaughtering. The stomach compartments were separated and weighed. Fragments were collected from several anatomical regions. Measurements of the total internal surface were taken through image capture and analysis. The reticulorumen absorptive surface (7.7 m²) was larger ($P < 0.01$) than the omasum absorptive surface (2.1 m²). The surface/digesta ratio, however, was larger ($P = 0.07$) in the omasum (0.31 m²/kg) than in the reticulorumen (0.13 m²/kg), representing an omasum surface for each digest unit 2.4 times larger. The absorption surface/wall surface ratio of one rumen ventral sac fragment showed a positive correlation ($r = 0.84$; $P = 0.02$) with the total rumen surface, indicating that it is possible to estimate the rumen surface by biopsy. The absorptive surface of the forestomach compartments seem to be compatible with absorption magnitude. However, further studies comparing VFA fractional absorption rate among forestomach compartments should be carried out.

Keywords: Rumen, Reticulum, Stomach, Volatile Fatty Acid

INTRODUÇÃO

A remoção (*clearance*) de ácidos graxos voláteis (AGV), produtos finais da ação microbiana no ruminorretículo, ocorre por dois processos. Cerca de 60% dos AGV são removidos por absorção pela parede do órgão e o restante passa para o omaso juntamente com a fase fluída ruminal e são absorvidos antes do duodeno^{1, 2, 3, 4}. Se a taxa de produção excede a taxa de *clearance*, os AGV podem acumular no ruminorretículo e desencadear a acidose ruminal⁵, que tem efeitos negativos sobre a ingestão de alimentos⁶, a degradação ruminal da fibra⁷, a motilidade do rúmen^{8, 9} e a morfologia da parede ruminal¹⁰. A superfície interna do ruminorretículo está diretamente relacionada com a capacidade de absorção de AGV¹¹ e, como as magnitudes de absorção do ruminorretículo e do omaso parecem ser semelhantes^{1, 2}, as superfícies absorptivas devem ser compatíveis com suas funções.

A manipulação nutricional da morfologia e, conseqüentemente, da capacidade de absorção da parede do ruminorretículo é possível e tem sido preconizada para o controle da acidose ruminal em vacas leiteiras¹¹. Há indícios de que também seja possível interferir nutricionalmente na morfologia do omaso¹². A atuação sobre a morfologia omasal, uma linha de pesquisa incipiente, pode ser tão efetiva no controle de distúrbios digestivos decorrentes da produção e acúmulo de AGV no rúmen¹³ quanto a manipulação da capacidade de absorção da parede ruminal.

O objetivo desse trabalho foi mensurar a extensão da superfície absorptiva dos compartimentos do proventrículo comparando-a à magnitude de absorção de cada um.

MATERIAL E MÉTODOS

Oito bovinos adultos, mestiços, não submetidos a jejum, com peso corporal de 479 ± 185 kg, alimentados a pasto, foram alocados aleatoriamente

em um delineamento em blocos casualizados completos, cada bloco consistindo de um animal. Imediatamente após o abate no matadouro, o estômago foi removido, os compartimentos (ruminorretículo, omaso e abomaso) foram separados e pesados, reportando-se o peso de cada compartimento e das respectivas digestas. Após as pesagens dos compartimentos, já evacuados, foram retirados fragmentos (2,14 cm²) da parede de diversas regiões anatômicas. Do saco dorsal foram retirados dois fragmentos, sendo um da parede direita e outro da esquerda, ambos na região intermediária entre os pilares cranial e caudal do rúmen, cinco centímetros dorsalmente ao respectivo pilar longitudinal. Do saco cego caudo-dorsal retirou-se uma amostra, cinco centímetros dorsalmente ao pilar caudal. No saco cranial, uma amostra foi retirada cinco centímetros cranialmente ao pilar cranial. Do saco cego caudo-ventral, foram retiradas duas amostras, uma cinco centímetros caudalmente ao pilar coronário ventral direito e outra cinco centímetros caudalmente ao pilar coronário ventral esquerdo. Do saco ventral foram retiradas três amostras, duas cinco centímetros ventralmente aos pilares longitudinais direito e esquerdo, e uma na extremidade ventro-cranial do saco ventral (recesso do rúmen). No caso do retículo foi retirado um fragmento de 25 cm² lateralmente ao sulco do retículo. Os fragmentos foram imersos em solução tampão fosfato (PBS: 0,79 g de NaCl; 0,223 g de Na₂HPO₄; 0,0524 g de NaH₂PO₄; H₂O q.s.p. 100 mL) e resfriados para preservar ao máximo as características biológicas.

Após estes procedimentos órgãos e fragmentos em PBS foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo e transportados ao laboratório. Neste local retirou-se o tecido conjuntivo excedente da superfície da serosa dos órgãos e efetuou-se a dissecação dos compartimentos para posterior pesagem e mensuração da superfície interna das regiões de cada um.

As regiões anatômicas do ruminorretículo foram separadas isolando-se retículo, saco cranial, saco dorsal, saco cego caudodorsal, saco ventral e saco

cego caudoventral. O peso de cada segmento anatômico foi registrado e as regiões foram fragmentadas de maneira a possibilitar digitalização de suas imagens através de um scanner (Scan Jet 4C, Hewlett Packard®). Mensurações morfológicas dos fragmentos, previamente preservados em PBS, foram realizadas efetuando-se a contagem do número de papilas ruminais presentes em cada fragmento. Posteriormente, a camada mucosa foi separada da muscular e serosa anotando-se seus pesos. As papilas ruminais foram seccionadas na base por meio de uma lâmina de bisturi e suas imagens digitalizadas através de scanner conforme Resende Júnior¹⁴, sendo suas superfícies estimadas através do programa de análise de imagens UTHSCSA Image Tool (software livre), segundo Resende Júnior¹⁴.

A superfície dos fragmentos do rúmen foi calculada pela seguinte fórmula:

Superfície absorptiva = superfície de parede – (número de papilas * 0,002) + (número de papilas * superfície média das papilas).

Assumiu-se a superfície da base de cada papila como um valor médio, 0,002 cm² (0,02 cm x 0,1 cm), medida com um paquímetro. Tendo-se a superfície de cada fragmento, estimou-se a superfície de cada região do rúmen pela proporção direta entre a superfície de parede do fragmento e a superfície de parede da região obtida pela análise de imagem, e também de outra maneira, pela proporção direta entre o peso do fragmento e o peso da região.

O retículo foi fragmentado de maneira que possibilitasse a digitalização de sua imagem pelo scanner. O fragmento coletado forneceu parâmetros para estimativa da superfície total do retículo, considerando a morfologia peculiar deste órgão com a presença de cristas e células-do-retículo. Para estimativa da superfície das cristas foi utilizado um modelo matemático considerando a altura média das mesmas e o número de células-do-retículo do fragmento. A altura foi determinada com auxílio de um paquímetro e o número de células-do-retículo

presentes no fragmento foi contado. Pelo número de células-do-retículo estimou-se o número de cristas, utilizando-se o seguinte modelo: número de cristas = $3,22 + (2,24 * \text{número de células-do-retículo})$. O comprimento das cristas foi obtido dividindo-se a aresta do fragmento (5 cm) pela raiz quadrada do número de células-do-retículo no fragmento. A superfície total das cristas do fragmento foi estimada pela seguinte fórmula:

Superfície das cristas do fragmento = número de cristas * altura média das cristas * comprimento médio das cristas.

A superfície do fragmento foi calculada pela seguinte fórmula:

Superfície do fragmento = superfície de parede + superfície das cristas do retículo - superfície da base das cristas do retículo.

Para a confecção do modelo assumiu-se que as células do retículo são quadrangulares e a espessura da base das cristas como tendo um valor médio (0,1 cm), medido com auxílio de um paquímetro. Posteriormente, o fragmento do retículo teve a região mucosa separada da muscular e serosa, sendo registrados seus pesos.

Obtida a superfície e o peso do fragmento, a superfície total do retículo foi calculada pela proporção direta entre peso do fragmento e peso total do órgão. Outra estimativa empregou a proporção direta entre superfície do fragmento e superfície de parede obtida pela análise de imagem. As papilas do retículo foram desconsideradas do cálculo devido ao seu tamanho diminuto.

O omaso, previamente seccionado, teve suas lâminas contadas e extraídas para posterior digitalização de suas imagens pelo scanner. Assumiu-se a espessura da base das lâminas como tendo um valor médio (0,15 cm), medido com um paquímetro. A superfície total foi calculada pela seguinte fórmula:

Superfície do omaso = superfície de parede + superfície das lâminas do omaso - superfície da base das lâminas do omaso.

As papilas do omaso foram desconsideradas dos cálculos devido ao seu tamanho diminuto.

A superfície absorptiva, a superfície de parede, a superfície de projeções (papilas, cristas ou lâminas), a razão superfície de projeções/superfície absorptiva, o peso, o peso de mucosa, a razão superfície absorptiva/peso de mucosa, o peso de não-mucosa, a razão peso de não-mucosa/superfície de parede, o número de papilas/cm² de parede, a superfície média das papilas, o peso da digesta e a razão superfície absorptiva/peso da digesta dos compartimentos ou das regiões do proventrículo foram analisados pelo procedimento GLM do pacote estatístico SAS, de acordo com o seguinte modelo: $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$; onde μ : média geral; α_i : efeito de animal ($i = 1$ à 8); β_j : efeito de compartimento ou região do proventrículo ($j = 1$ a J^1) ε_{ij} : erro residual, assumido independente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e σ^2 . Quando necessário, as médias foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott², com auxílio do software de análises estatísticas SISVAR. Correlações foram estabelecidas pelo procedimento CORR do SAS. Regressões lineares foram desenvolvidas com o procedimento REG do SAS.

¹Neste caso não se definiu o número de compartimentos ou regiões em comparação, já que o mesmo modelo é utilizado para comparar dois (ruminorretículo vs omaso), três (rúmen vs retículo vs omaso), quatro (rúmen vs retículo vs omaso vs abomaso), seis (saco dorsal vs saco cego caudo-dorsal vs saco cego caudo-ventral vs saco ventral vs saco cranial vs retículo) ou até oito (saco dorsal vs saco cego caudo-dorsal vs saco cego caudo-ventral vs saco ventral vs saco cranial vs pilares vs retículo vs omaso) compartimentos ou regiões do proventrículo.

² O Teste de Scott-Knott foi preferido frente ao Teste de Tukey devido à validade prática da interpretação deste último na presente situação (muitos tratamentos). O teste proposto por Scott e Knott em 1974 tem por objetivo agrupar as médias de tratamentos em grupos bem distintos, através da minimização da variação dentro de grupos, utilizando o método de análise de conglomerados no lugar da técnica de comparação múltipla. É um teste que evita ambigüidade na interpretação de resultados, apesar da sua rigidez.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso da digesta do ruminorretículo (Tab. 1) representou cerca de 13% do peso corporal dos animais. Do peso da digesta total do proventrículo 14% encontraram-se no omaso e 86% no ruminorretículo (Tab. 1). O omaso tem sido considerado como um sítio insignificante de fermentação microbiana¹⁵, entretanto, a quantidade de digesta sugere que sua importância fermentativa pode ser maior. O peso do rúmen vazio proporcionalmente ao peso total do estômago foi 56%, seguido pelo omaso (23%), abomaso (11%) e retículo (9%) (Tab. 2). Apesar de ser citado na literatura¹⁵ que a capacidade de armazenamento do omaso é menor do que do abomaso, a grande densidade tecidual indica maior peso específico desse compartimento vazio.

A superfície absorptiva do ruminorretículo foi aproximadamente quatro vezes maior do que a do omaso (Tab. 1). No entanto, a razão superfície/digesta, tendeu ser maior no omaso do que no ruminorretículo, representando uma superfície 2,4 vezes superior no omaso por unidade de digesta. Isso poderia compensar a menor superfície absorptiva, mantendo o omaso como órgão de extrema importância no *clearance* de AGV. Além disso, acima de 90% da superfície do omaso se deve às lâminas do omaso, que são estruturas especializadas em absorção¹³ (Tab. 1) e no presente trabalho apresentaram-se em número médio de 97 (59 - 137) em cada animal, com uma superfície média de 203 cm² (108 a 350 cm²). Caso a taxa fracional de absorção no omaso não seja eficiente, os AGV excedentes passarão para o abomaso, podendo causar hipomotilidade desse órgão^{16, 17} e, conseqüentemente, predispondo ao deslocamento de abomaso¹⁸. A manipulação da capacidade absorptiva do omaso pode ser eficiente no controle de distúrbios digestivos, especialmente em vacas leiteiras de alta produção. Outro fato a ser considerado é que nem toda superfície absorptiva do ruminorretículo está em contato com a digesta constantemente, como ocorre no omaso. A maior parte do saco dorsal do rúmen está preenchida

Tabela 1 – Peso da digesta, peso do órgão, superfície absorptiva, superfície de parede, superfície de projeções, razão superfície de projeções/superfície absorptiva e razão superfície absorptiva/peso da digesta do proventrículo de bovinos mestiços com massa corporal média de 479kg

	Ruminorretículo	Omaso	EPM ¹	<i>P</i>
Peso da digesta (kg)	61,19	10,04	4,38	< 0,01
Peso do órgão (kg)	8,00	2,92	0,41	< 0,01
Superfície absorptiva (m ²)	7,71	2,11	0,88	< 0,01
Superfície de parede (m ²)	1,23	0,19	0,09	< 0,01
Superfície de projeções (m ²)	6,28	1,92	0,80	< 0,01
Superfície de projeções/ Superfície absorptiva (%)	80,71	90,06	2,09	0,02
Superfície absorptiva/Peso da digesta (m ² /kg)	0,13	0,31	0,06	0,07

¹Erro padrão da média

por gás, entrando em contato com os AGV incorporados ao fluido ruminal, apenas por ocasião dos movimentos ruminais.

A ausência de papilas bem desenvolvidas em algumas regiões do saco ventral e dos sacos cegos caudo-dorsal e caudo-ventral, observadas neste trabalho, demonstram que alguns pontos destas regiões anatômicas, mesmo localizadas mais ventralmente no rúmen, também não permanecem constantemente em contato com o fluido ruminal, provavelmente devido ao posicionamento dentro da cavidade abdominal permitir acúmulo de gás. O fato de que os AGV, presentes no fluido, atuam direta¹⁹ e indiretamente²⁰ na variação do tamanho papilar confirmam esta hipótese. Nickel, Schummer e Seiferle¹², descrevendo um corte transversal da cavidade abdominal de um bovino, na altura da quarta vértebra lombar, demonstram que a superfície

Tabela 2 – Peso do órgão, superfície absorviva, superfície de parede, superfície de projeções e razão superfície de projeções/superfície absorviva do estômago de bovinos mestiços com massa corporal média de 479kg

	Rúmen	Reticulo	Omaso	Abomaso	EPM ¹	<i>P</i>
Peso do órgão (kg)	6,89a	1,11c	2,92b	1,35c	0,27	< 0,01
Superfície absorviva (m ²)	7,40a	0,31b	2,11b	-	0,72	< 0,01
Superfície de parede (m ²)	1,10a	0,13b	0,19b	-	0,07	< 0,01
Superfície de projeções (m ²)	6,11a	0,17b	1,92b	-	0,66	< 0,01
Superfície de projeções/ Superfície absorviva (%)	81,73b	57,12c	90,06a	-	2,11	< 0,01

¹Erro padrão da média

a, b, c Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente pelo Teste de Scott-Knott

visceral do saco ventral se projeta em direção dorsal, sob as vísceras, no antímero direito da cavidade abdominal. Isso possibilitaria o acúmulo temporário de gases nas regiões mais dorsais destas projeções. Nas regiões onde as papilas estavam presentes (sacos cegos, saco cranial e saco ventral) não houve diferenças ($P = 0,30$; $EPM = 2,28$) no número de papilas/cm² de parede (39,38 papilas/cm²), mas as papilas do saco cranial (0,35 cm²) apresentaram maior superfície absorviva ($P < 0,01$; $EPM = 0,03$) do que aquelas do saco ventral (0,17 cm²) e dos sacos cegos caudo-dorsal (0,17 cm²) e caudo-ventral (0,13 cm²).

Dentro das diversas regiões do rúmen os sacos ventral e cranial apresentaram as maiores superfícies absorvivas (Tab. 3). Este resultado deve-se certamente ao maior desenvolvimento epitelial estimulado por ação dos AGV presentes no fluido ruminal em contato permanente com regiões mais ventrais do rúmen. Os sacos cegos caudo-dorsal e caudo-ventral apresentaram as razões

Tabela 3 – Peso do órgão, superfície absorviva, superfície de parede, superfície de projeções, razão superfície de projeções/superfície absorviva, peso de mucosa, peso de não-mucosa, razão superfície absorviva/peso de mucosa e razão peso de não-mucosa/superfície de parede do proventrículo de bovinos mestiços com massa corporal média de 479kg

	SD ¹	SCCD ²	SCCV ³	SV ⁴	SC ⁵	Pilares	Retículo	Omaso	EPM ⁶	P
Peso do órgão (g)	1818,00b	561,88d	617,38d	2074,63b	1273,00c	542,88d	1108,63c	2917,75a	119,08	< 0,01
Superfície absorviva (cm ²)	3008,21c	6943,79c	6877,71c	31851,39a	23758,25b	792,36c	3054,05c	21073,07b	2758,23	< 0,01
Superfície de parede (cm ²)	3008,21a	918,70c	1118,09c	3708,44a	1801,16b	396,18c	1311,34c	1896,84b	253,25	< 0,01
Superfície de projeções (cm ²)	0,00b	6095,44b	5446,56b	26945,68a	22085,18a	0,00b	1742,71b	19190,76a	2652,11	< 0,01
Superfície de projeções/ Superfície absorviva (%)	0,00d	84,34b	76,19b	83,45b	91,73a	0,00d	57,12c	90,06a	2,75	< 0,01
Peso de mucosa (g)	602,85b	291,16c	326,61c	991,27a	674,34b	-	538,08b	-	55,11	< 0,01
Peso de não-mucosa (g)	1215,15a	270,72c	290,77c	1083,36a	598,65b	-	570,55b	-	60,18	< 0,01
Superfície absorviva/Peso de mucosa (cm ² /g)	6,43c	24,04b	21,98b	30,88a	39,86a	-	6,01c	-	4,52	< 0,01
Peso de não-mucosa/ Superfície de parede (g/cm ²)	0,40a	0,30b	0,27b	0,33b	0,32b	-	0,43a	-	0,03	< 0,01

¹Saco dorsal; ²Saco cego caudo-dorsal; ³Saco cego caudo-ventral; ⁴Saco ventral; ⁵Saco cranial

⁶Erro padrão da média

a, b, c, d Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente pelo Teste de Scott-Knott

superfície/peso de mucosa menores do que os supracitados (Tab. 3), no entanto, maiores do que o saco dorsal e o retículo, resultado esperado devido à escassez de papilas no saco dorsal e à função menos relacionada à absorção e mais relacionada à contração atribuída ao retículo e também ao saco dorsal²¹, comprovadas aqui pela maior razão peso de não-mucosa/superfície de parede (Tab. 3), que neste caso pode ser um indicador da espessura da túnica muscular. A superfície dos pilares representou menos de 1% da superfície total do proventrículo, coerente com o fato dessas estruturas representarem espessamentos da camada muscular, com função importante na compartimentalização e contração do rúmen²¹. A correlação entre a superfície absorptiva e o peso da camada mucosa das regiões do ruminorretículo foi positiva e alta (0,80; $P < 0,01$), mostrando que o peso da camada mucosa pode ser um bom indicativo da superfície absorptiva. As superfícies absorptivas das regiões do ruminorretículo estimadas pela superfície de parede e pelo peso dos fragmentos foram altamente correlacionadas (Fig.1).

A razão da superfície absorptiva pela superfície de parede de um fragmento do recesso do rúmen apresentou correlação positiva com a superfície absorptiva total do rúmen (0,84; $P = 0,02$) (Fig. 2) e com a superfície total do ruminorretículo (0,82; $P = 0,02$), indicando ser possível a estimativa destas superfícies por meio de biópsia. A correlação entre a superfície deste fragmento e a superfície total do proventrículo, também foi positiva (0,58; $P = 0,13$), possivelmente porque o epitélio do omaso e, conseqüentemente, sua superfície, possa se proliferar sob estímulo dos AGV, como ocorre no epitélio ruminal. Costa¹² detectou aumento de peso do omaso em bezerros mantidos em dieta líquida que receberam AGV infundidos no rúmen, comparados aos animais do grupo controle, sugerindo estímulo dos AGV para o desenvolvimento do omaso.

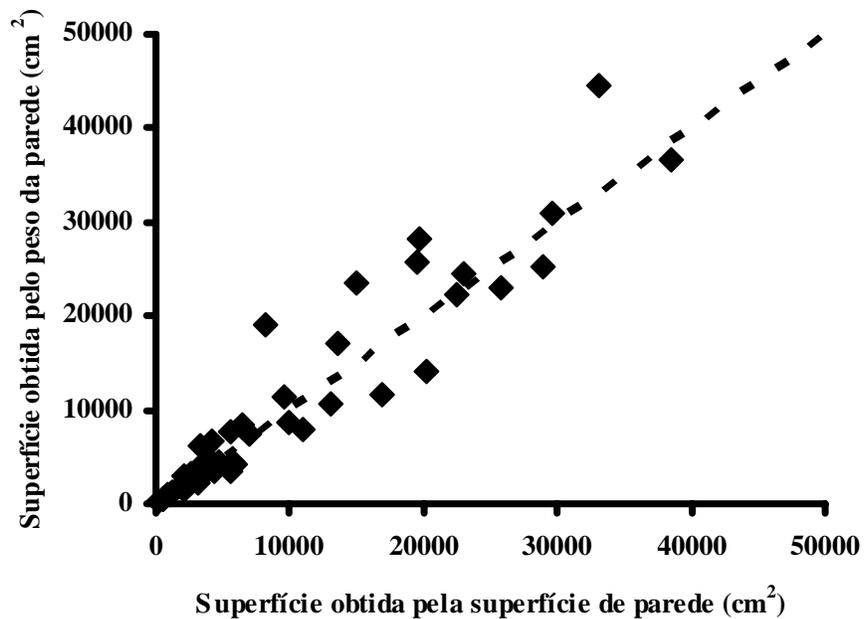


Figura 1 – Correlação entre as superfícies absorptivas das regiões do ruminoretículo determinadas por correlação entre a superfície de parede do fragmento e a superfície de parede da região (SS) e entre o peso do fragmento e o peso da região (SP). $SP = 269,0687 + 1,0436 SS$; $r^2 = 0,90$; $P < 0,01$; $P = 0,67$ para $\beta_0 = 0$; $P = 0,37$ para $\beta_1 = 1$. Linha tracejada = linha de igualdade.

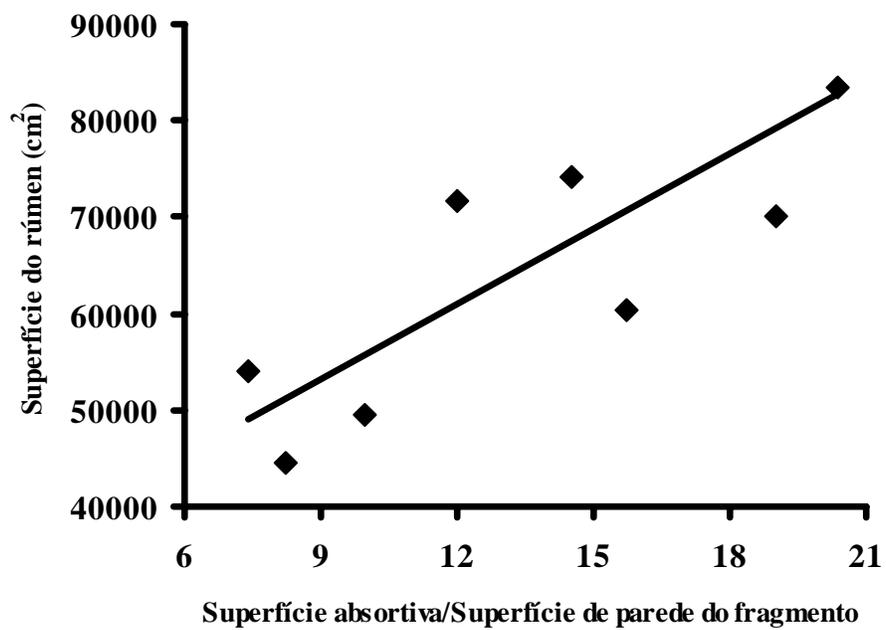


Figura 2 – Correlação entre a razão superfície absorptiva/superfície de parede de um fragmento do recesso do rúmen e a superfície absorptiva do rúmen. Superfície absorptiva do rúmen = 29718,00 + 2604,65 * (Superfície absorptiva/Superfície de parede do fragmento); $r^2 = 0,70$; $P = 0,02$.

CONCLUSÕES

Apesar da superfície absorviva do ruminorretículo ser maior do que a do omaso, a maior razão superfície/digesta no omaso pode indicar que as superfícies absorvivas são compatíveis com a magnitude de absorção de AGV. Estudos que comparem as taxas fracionais de absorção de AGV nos compartimentos, entretanto, devem ser realizados.

É possível a estimativa da superfície absorviva total do rúmen por meio de biópsia de um fragmento do saco ventral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PETERS, J. P.; SHEN, R. Y. W.; ROBINSON, J. A.; CHESSER, S. T. Disappearance and passage of propionic acid from the rumen of the beef steer. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 10, p. 3337-3349, Oct. 1990.
- [2] RESENDE JÚNIOR, J. C. **Comparação entre técnicas para determinação do clearance ruminal de ácidos graxos voláteis**. 2003. 133 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- [3] RUPP, G. P.; KREIKEMEIER, K. K.; PERINO, L. J.; ROSS, G. S. Measurement of volatile fatty acid disappearance and fluid flux across the abomasum of cattle, using an improved omasal cannulation technique. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 55, n. 4, p. 522-529, Apr. 1994.
- [4] VOELKER, J. A.; ALLEN, M. A. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 3. effects on ruminal fermentation, ph, and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 11, p. 3562-3570, Nov. 2003.
- [5] BARKER, I. K.; DREUMEL, A. A. van; PALMER, N. The alimentary system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C. **Pathology of domestic animals**. 4th ed. San Diego: Academic, 1995. v. 2, p. 1.
- [6] ELLIOT, J. P.; DRACKLEY, J. K.; FAHEY, G. C.; SHANKS, R. D. Utilization of supplemental fat by dairy cows fed diets varying in content of

nonstructural carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 6, p. 1512-1525, July 1995.

[7] GRANT, R. J.; MERTENS, D. R. Influence of buffer pH and raw cornstarch addition on in vitro fiber digestion kinetics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 10, p. 2762-2768, Oct. 1992.

[8] CRICHLLOW, E. C.; CHAPLIN, R. K. Ruminant lact acidosis: relationship of forestomach motility to nondissociated volatile fatty acids levels. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, p. 1908-1911, Sept. 1985.

[9] LEEK, B. F.; HARDING, R. H. Sensory nervous receptors in the ruminant stomach and the reflex control of reticuloruminal motility. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF RUMINANT PHYSIOLOGY, DIGESTION AND METABOLISM IN THE RUMINANT, 4., 1975, Sydney. **Proceedings...** Sydney: [s.n.], 1975. p. 60.

[10] GÄBEL, G.; ASCHENBACH, J. R.; MULLER, F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 3, n. 1, p. 15-30, June 2002.

[11] DIRKSEN, G.; LIEBICH, H. G.; BROSI, G.; HAGEMEISTER, H.; MAYER, E. Morphologie der pansenschleimhaut und fettsäureresorption beim rind - bedeutende faktoren für gesunkheit und leistung. **Zentralblatt für Veterinärmedizin A**, Berlin, v. 31, p. 414-430, July 1984.

[12] COSTA, S. F. **Alterações morfológicas induzidas por lactato, propionato e butirato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerros**. 2003. 90 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

[13] BUENO, L.; GOODALL, E. D.; KAY, R. N. B.; RUCKEBUSCH, Y. On the function of the sheep's omasum. **Journal of Physiology**, London, v. 227, n. 2, p. 14-15, jan. 1972.

[14] RESENDE JÚNIOR, J. C. **Efeito da frequência de alimentação concentrada sobre a morfologia das papilas do rúmen**. 1999. 67 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

[15] NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. **The viscera of the domestic mammals**. 2nd Berlin; Hamburg: Verlag Paul Parey, 1979. 403 p.

- [16] SVENDSEN, P. Etiology and pathogenesis of abomasal displacement in cattle. **Nordisk Veterinary Medicine**, Copenhagen, v. 21, p. 1, 1969.
- [17] BOLTON, J. R.; MERRIT, A. M.; CARLSON, G. M.; DONAWICK, W. J. Normal abomasal electromyography and emptying in sheep and the effects of intraabomasal volatile fatty acid infusion. **American Journal of Veterinary Research**, Shaumburg, v. 37, n. 12, p. 1387-1392, Dec. 1976.
- [18] SHAVER, R. D. Nutritional risk factors in the etiology of left displaced abomasum in dairy cows: a review. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 10, p. 2449-53, Oct. 1997.
- [19] SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelium cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 61, n. 8, p. 1109-1113, Aug. 1978.
- [20] SAKATA, T.; HIKOSAKA, K.; SHIOMURA, Y.; TAMATE, H. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 44, p. 325-331, Nov. 1980.
- [21] VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2th ed. Ithaca: Cornell University, 1994.

CAPÍTULO 3
AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DA ABSORÇÃO E
METABOLIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS PELO RÚMEN
E OMASO DE BOVINOS

(Preparado de acordo com as normas da revista “Journal of Animal Science”)

RESUMO

As capacidades de absorção e metabolismo de ácidos graxos voláteis (AGV) pelo rúmen e omaso foram comparadas, *in vitro*. Após o abate, foram coletados fragmentos da parede ruminal e de uma lâmina do omaso de oito bovinos mestiços adultos. Um fragmento de mucosa isolada foi montado em uma câmara de difusão tecidual. Ácido valérico e CrEDTA foram adicionados ao fluido ruminal que foi utilizado no lado da mucosa. Uma solução de Krebs-Ringer bicarbonato foi utilizada no lado da serosa. As taxas fracionais de absorção foram mensuradas pela queda exponencial na razão AGV:Cr ao longo do tempo no lado da mucosa. A taxa de metabolismo foi determinada pela diferença entre os AGV absorvidos e os AGV que apareceram no lado da serosa ao longo do tempo. A superfície absorptiva do fragmento de rúmen (57,6 cm²) foi maior do que a do omaso (4,9 cm²), por causa das papilas ruminais. O índice mitótico do omaso (0,52%) foi maior do que o do epitélio ruminal (0,28%). A taxa fracional de absorção de AGV foi maior no omaso (4,6%.h⁻¹.cm⁻²) do que no rúmen (0,4%.h⁻¹.cm⁻²). Quando a superfície total foi considerada, o potencial de absorção do omaso foi maior do que o do rúmen. Acetato, propionato, butirato e valerato apresentaram taxas fracionais de absorção semelhantes em ambos os fragmentos. A porcentagem de acetato metabolizado (10,9%) foi menor do que de propionato (31,1%) que foi menor do que de butirato (39,8%) e valerato (42,0%). Houve interação entre a taxa de metabolismo dos AGV e o compartimento do proventrículo. No rúmen, as taxas de metabolismo dos AGV

foram similares ($7,7 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$), mas no omaso, o valerato ($90,0 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) foi mais metabolizado do que butirato ($59,6 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) e propionato ($69,8 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). O acetato foi o menos metabolizado ($51,7 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). O metabolismo estimado considerando a superfície total foi maior no omaso do que no rúmen. A correlação entre o metabolismo de AGV e o índice mitótico foi positiva, mas a absorção de AGV não foi correlacionada com outras variáveis no rúmen. No omaso, a correlação entre absorção de AGV e índice mitótico foi positiva, entretanto, essas variáveis foram negativamente correlacionadas com o metabolismo de AGV. A conclusão é que o potencial de absorção e metabolismo de AGV do omaso é maior do que o do rúmen. As capacidades de absorção de rúmen e omaso variam na mesma direção e existem indicações que os fatores capazes de estimular a proliferação da parede ruminal também são capazes de estimular a parede do omaso.

Palavras-chave: absorção, bovino, metabolismo, omaso, rúmen, ácido graxo volátil

**MORPHOPHYSIOLOGIC EVALUATION OF THE ABSORPTION AND
METABOLISM OF VOLATILE FATTY ACIDS BY BOVINE RUMEN
AND OMASUM**

ABSTRACT

The volatile fatty acids (VFA) absorption and metabolism capacity of the rumen and omasum was compared, *in vitro*. After the slaughter, fragments of the rumen wall and omasum laminae were taken from eight adult crossbred bovines. An isolated fragment of the mucosa was fitted in a tissue diffusion chamber. Valeric acid and CrEDTA were added to the ruminal fluid and placed on the mucosal side. Krebs-Ringer bicarbonate buffer solution was placed on the serosal side. The fractional absorption rates were measured by the exponential VFA:Cr ratio decay over time. The metabolism rate was determined by the difference between the VFA absorbed and the VFA which appeared on the serosal side over time. The absorption surface of the rumen fragment (57.6 cm²) was higher than that of the omasum (4.9 cm²), because of the ruminal papillae. The mitotic index of the omasum (0.52%) was higher than that of the rumen epithelium (0.28%). The VFA fractional absorption rate was higher in the omasum (4.6%.h⁻¹.cm⁻²) than in the rumen (0.4%.h⁻¹.cm⁻²). When the total surface was considered, the absorption potential of the omasum was higher than the rumen. Acetate, propionate, butyrate and valerate showed similar fractional absorption rate in both fragments. The percentage of metabolized acetate (10.9%) was lower than propionate (31.1%) which was lower than butyrate (39.8%) and valerate (42.0%). There was interaction between the VFA metabolism rate and the forestomach compartment. In the rumen, the VFA metabolism rate was similar (7.7 μmol.h⁻¹.cm⁻²), but in the omasum, the valerate (90.0 μmol.h⁻¹.cm⁻²) was more metabolized than butyrate (59.6 μmol.h⁻¹.cm⁻²) and propionate (69.8 μmol.h⁻¹.cm⁻²). Acetate was the least metabolized (51.7 μmol.h⁻¹.cm⁻²). The

estimated metabolism considering the total surface was higher in the omasum than in the rumen. The correlation between VFA metabolism and mitotic index was positive, but the VFA absorption was not correlated with other variables in the rumen. In the omasum, the correlation between VFA absorption and mitotic index was positive, however, those variables were negatively correlated with the VFA metabolism. The conclusion is that the VFA metabolism and absorption potential of the omasum is higher than that of the rumen. The rumen and omasum absorption capacities vary in the same way, and there are indications that the capable factors to stimulate the rumen wall are also capable of stimulating the omasum wall proliferation.

Key words: absorption, bovine, metabolism, omasum, rumen, volatile fatty acid

INTRODUCTION

The clearance of volatile fatty acids (VFA) occurs in the reticulorumen by two processes: absorption through the wall and passage with the rumen fluid to the omasum (Peters et al., 1990). If the VFA production rate exceeds the clearance rate, VFA will accumulate and cause the metabolic disturbance known as rumen acidosis (Barker et al., 1995), which may have negative effects on the animal performance and health.

In cattle with high dry matter intake, about 40% of the clearance occurs by passage (Tamminga and Van Vuuren, 1988; Voelker and Allen, 2003; Resende Júnior et al., 2006) and more than 97% of the VFA disappear prior to entering the duodenum (Peters et al., 1990). The absorptive surfaces of the reticulorumen and probably of the omasum are directly related to VFA absorption capacity. The influence of the diet on the rumen wall morphology with consequences in absorptive surface has been known since the decade of 1950 (Browlee, 1956; Sander et al., 1959). Manipulation of the morphology, and consequently of the absorption capacity of the rumen by variation in the diet is possible (Dirksen et al., 1984) and it has been recommended for acidosis control. There are indications that it is also possible to interfere in the omasal morphology (Baldwin et al., 2004), varying the diet. The VFA not absorbed by the omasum pass to abomasum (Rupp et al., 1994). The excess of VFA in the abomasal digesta may cause motility dysfunction of this organ (Bolton et al., 1976) and predispose it to abomasal displacement (Svendsen, 1969). It was also shown that all VFA have some deleterious effects on the epithelium of the abomasum (Bödeker et al., 1994). The understanding of the omasal physiology seems to be as important in the control of current digestive disturbances enhanced by the excessive VFA production and accumulation in the rumen as the understanding of the ruminal physiology.

Despite the absorptive surface of the reticulorumen (7.7 m²) being higher than that of the omasum (2.1 m²) (Daniel et al., 2006), and the absorption and metabolism potential of the rumen being well known, the absorption and metabolism potential of the omasum and any comparison of these parameters among the organs are not known. The purpose of this work was to compare, in vitro, the VFA absorption and metabolism capacity of the rumen and omasum.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Design and Tissue Collection. Eight adult crossbred bovines, of several weights and ages, of both sexes, coming from a commercial slaughterhouse, were allocated to a completely randomized block design, each block consisting of one animal, aiming to establish local control of possible differences of breed, sex, age or weight. The animals were killed by exsanguinations after stunning, and the forestomach was removed from the abdominal cavity 5 to 10 minutes later. One portion (~ 80cm²) of ventral rumen sac wall (*Recessus ruminis*) and other portion of the omasal laminae (*Laminae omasi*) were cut, carefully washed with warm saline solution to remove adherent feed particles and placed in a Krebs-Ringer bicarbonate buffer solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) with pH adjusted to 7.4 and immediately transported to the laboratory at 38°C. The absorption assays were started 30 to 40 minutes after slaughtering. The use of isolated mucosa makes it possible to estimate the absorption and the metabolism of VFA, simultaneously. The ventral sac was chosen to represent the rumen because it is a region with a high absorptive surface (Daniel et al., 2006) and morphologically more sensitive to dietary alterations (Beharka et al., 1998). On the other hand, the origin of the tissue does not have a significant effect on the production of metabolites by the rumen wall (Waldron et al., 2002). In the omasum, the laminae were chosen

because they represent approximately 90% of the organ surface (Daniel et al., 2006).

Solutions. About 320 mL of rumen fluid was collected from a fistulated cow, fed tropical pasture and 2.5 kg.d⁻¹ of a ground corn and soybean meal based commercial concentrate. For collections it was used a rigid tube with several small holes in the distal portion coupled to a suction device. The filtration of the rumen fluid was done by the own collect device. The fermentation was stopped by addition of 6.5 mL of 50% sulfuric acid. Forty milliliter aliquots were packed and frozen at -20°C. For each animal one aliquot was thawed before the incubation. Valeric acid (Merck, Darmstadt, Germany) and CrEDTA solution (Binnerts et al., 1968) were added to the rumen fluid until reaching concentrations of 25 mM and 1 mM, respectively. The pH was adjusted for 6.8 with the addition of 50% NaOH solution and this solution was used on the mucosal side of the rumen and omasum fragments. Although the pH used was higher than pH that occurs in animals fed with TMR, this value could allow lower differences among VFA absorption rates induced by pH (Dijkstra et al., 1993). The Krebs-Ringer bicarbonate buffer solution with pH adjusted for 7.4, kept at 38°C, was used on the serosal sides. All solutions were heated at 38°C before incubation and the temperature maintained during the incubation. The initial pH of the mucosal fluid was the same for the rumen and omasum, once in vivo, they are similar (Edrize et al., 1986).

Preparation of the Ruminal and Omasal Epitheliums. In the laboratory, the ruminal mucosa was isolated by removing the serosa and muscular layers, and the omasal mucosas were cautiously separated with the aid of two tweezers. The mucosal sheets were cut in circles (3 cm diameter) and inserted between two half-chambers of a tissue diffusion chamber (Indústria e Comércio Estanhof Ltda, Lavras/MG, Brazil) with an inner aperture of 4.91 cm². Edge damage was minimized by a rubber ring on the serosal side of the tissue.

The bathing solutions on both sides of the chamber were kept circulating by a mini air compressor and maintained at 38°C in water-jacketed reservoirs.

Sampling and Analyses. Samples (300 µL) of mucosal and serosal fluids were obtained immediately after the mounting (time zero) and at 25, 50, 75, 100 and 125 minutes. The mucosal pH was determined at each sampling time. The serosal pH was determined at the start and end of the incubation. The aliquots were mixed with 100 µL of 10% sulfuric acid solution and immediately frozen at -20°C for subsequent analyses of VFA and chromium.

The VFA and chromium concentration was determined in the supernatant obtained by centrifugation at 8,855 g for 15 minutes at room temperature. Samples were analyzed for VFA by GLC (CP-3800 Gas Chromatograph Varian, with flame ionization detector, Varian Chromatography Systems, California, USA) using a capillary column with nitroterephthalic acid-modified phase, chemically bonded polyethylene glycol, 25 m x 0.25 mm I.D. and 0.2 µm of film thickness (CP-Wax 58 (FFAP) CB, Varian Analytical Instruments, California, USA), and N₂ as carrier gas. The oven temperature was kept at 65°C for 30 s. The oven temperature was increased to 125°C, at rate of 20°C.minute⁻¹, then increased to 170°C, at rate of 50°C.minute⁻¹. The total time of analyze was 4.9 minutes. The VFA concentrations were corrected through the recovery of hexanoic acid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), used as internal standard. The chromium concentration was determined by atomic absorption spectrophotometry (SpectrAA – 100 Varian, Varian Australia Pty LTD, Victoria, Australia).

The exponential VFA:Cr decay ratio over time on the mucosal side was used to estimate the VFA fractional absorption rate (Resende Júnior et al., 2006). The water fractional absorption rate was assumed to be equivalent to mucosal Cr fractional accumulation rate determined by the exponential increase rate of the mucosal Cr concentration over time. The VFA metabolism was

estimated by the difference between absorbed and appeared VFA in the serosal fluid over time.

Morphology Measurements. The rumen surface was measured with the aid of a scanner (Scanjet 4C, Hewlett Packard). The number of papillae was counted; twelve papillae were randomly sectioned and digitalized for surface determination through image analysis software UTHSCSA Image Tool version 3.00 (Free Software, The University of Texas Health Science Center in San Antonio). The total fragment surface was the sum of the papillae surface plus the wall surface minus the surface of the base of the papillae, assumed as 0.002 cm² per papilla (Daniel et al., 2006). The omasum absorptive surface was constant (4.91 cm²), since omasum papillae were not considered in the calculations, because of very small size.

For microscopic measurement, a piece (~ 3 cm²) of the fragment was fixed in Bouin liquid for 24 hours, dehydrated in ethanol solutions, diphanized in xylene, and embedded in paraffin. To determine the mitotic index, 5µm sections were stained with hematoxylin and eosin, and to measure thickness of the epithelium layers, 5 µm sections were stained with Masson's Tricromic. The mitotic index of the cells of the epithelium basal layer, the epithelium thickness, the keratin layer thickness and the non-keratin layer thickness were determined with an optic microscope (Ernst Leitz Wetzlar Nr. 438895, Germany) at 400 magnification. The mitotic index was determined by counting all mitotic nucleus which were expressed as percentage of the total visible nucleus. The percentage of cells undergoing mitosis was the mean of five independent evaluators. The mitotic index has been used since the decade of 1970 (Sakata and Tamate, 1974; Sakata and Tamate, 1976) as a good indicator of the rumen epithelium proliferation. As absorption capacity has relationship with epithelium proliferation, the absorption variations might reflect variations on mitotic index.

Statistical Analyses

The absorption surface of the fragments, the mitotic index, the thickness of the epithelium, the initial VFA concentration and the water fractional absorption rate were compared using the MIXED procedure of the SAS (SAS Institute, 1999), according to the following model: $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$; where μ : overall mean; α_i : random effect of animal ($i = 1$ to 8); β_j : fixed compartment effect ($j =$ rumen or omasum); and ε_{ij} : residual, assumed independently and identically distributed in a normal distribution with mean zero and variance σ^2 .

The fractional absorption and metabolism rates of acetate, propionate, butyrate and valerate in both compartments (rumen and omasum) were analyzed as a split plot arrangement, using the MIXED procedure of SAS, according to the following model: $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \gamma_k + \beta\gamma_{jk} + \varepsilon_{ijk}$; where μ : overall mean; α_i : random animal effect ($i = 1$ to 8); β_j : fixed compartment effect ($j =$ rumen or omasum); $\alpha\beta_{ij}$: interaction between animal and compartment effect (error term used for testing compartment effect); γ_k : fixed acid effect ($k =$ acetate, propionate, butyrate or valerate); $\beta\gamma_{jk}$: interaction between compartment and acid effect; and ε_{ijk} : residual.

Initial and final pH of the solutions were compared with the MIXED procedure of SAS, according to the following model: $y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \gamma_k + \beta\gamma_{jk} + \alpha\gamma(\beta)_{ik(j)} + \delta_l + \beta\delta_{jl} + \gamma\delta_{kl} + \beta\gamma\delta_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$; where μ : overall mean; α_i : random animal effect ($i = 1$ to 8); β_j : fixed compartment effect ($j =$ rumen or omasum); $\alpha\beta_{ij}$: interaction between animal and compartment effect (error term used for testing compartment effect); γ_k : fixed solution effect ($k =$ mucosal or serosal fluid); $\beta\gamma_{jk}$: interaction between compartment and solution effect; $\alpha\gamma(\beta)_{ik(j)}$: interaction between animal and solution within compartment effect (error term used for testing solution and interaction compartment*solution effects); δ_l : fixed time effect ($l =$ initial or final); $\beta\delta_{jl}$: interaction between

compartment and time effect; $\gamma\delta_{kl}$: interaction between solution and time effect; $\beta\gamma\delta_{jkl}$: interaction among compartment, solution and time effect; and ε_{ijk} : residual.

The mucosal pH was analyzed as repeated measures over time with the MIXED procedure of SAS. The mean square of the interaction animal*compartment was the error term used for testing compartment effect. The covariance structures fitted were compound symmetry, unstructured, and autoregressive of order 1. The covariance structure was chosen based on the Akaike's information criterion (Littell et al., 1998). Pearson correlation coefficients among variables within compartments were performed with the CORR procedure of SAS. Linear regressions among measurements of both forestomach compartments were performed with the REG procedure of SAS.

RESULTS AND DISCUSSION

The largest mitotic index in the omasum epithelium basal layer (Table 1) indicated a faster cell proliferation in that organ than in the rumen. The rumen absorptive surface, however, was higher than that of the omasum, because of the ruminal papillae (Table 1). Despite systemic regulation on cell proliferation (Sakata et al., 1980; Shen et al., 2004), the local stimulation affects the epithelial dynamics (Sakata and Tamate, 1976; Gálfi et al., 1986). The higher omasum surface:digesta ratio (Daniel et al., 2006) could maximize the VFA local stimulation on the cell proliferation, since large amounts of VFA pass from reticulorumen to omasum with the ruminal fluid phase (Resende Júnior et al., 2006). The omasum mitotic index showed positive and high correlation with the rumen mitotic index (Figure 1), indicating that the stimulators factors for rumen wall proliferation can be the same as the omasum wall. In the rumen, there was

Table 1. Absorptive surface, mitotic index, epithelium layers thickness and mucosal fluid VFA concentration in rumen and omasum

	Compartment		SEM ¹	P-value
	Rumen	Omasum		
Absorptive surface (cm ²)	57.58	4.91	5.83	< 0.01
Mitotic index (%)	0.28	0.52	0.02	< 0.01
Thickness of the epithelium (µm)	65.04	61.71	4.66	0.33
Thickness of the keratin layer (µm)	12.95	11.82	1.24	0.27
Thickness of the non-keratin layers (µm)	52.09	49.89	3.87	0.45
Total VFA (mM)	123.21	125.35	2.58	0.31
² A + ³ P + ⁴ B (mM)	98.48	98.86	2.16	0.87
Acetate (mM)	56.28	56.17	1.48	0.94
Propionate (mM)	25.39	25.29	0.63	0.91
Butyrate (mM)	16.81	17.40	0.32	0.15
Valerate (mM)	24.73	25.32	0.31	0.23

¹ Standard error of the means.

² A: acetate; ³ P: propionate; ⁴ B: butyrate.

no significant correlation between the mitotic index and the absorptive surface (Table 2). The explanation can be in the fact that the mitotic index responds acutely to the alteration of the nutritional plan (Sakata and Tamate, 1976) while the effect on the surface happens at a lower time rate (Dirksen et al., 1984; Gäbel et al., 1993). The total thickness, the thickness of the keratin layer and the thickness of the non-keratin layers of the rumen and omasum epithelium were similar (Table 1) and showed positive and high correlations (Figure 2). As the epithelium dimension is the result of the cellular synthesis and deletion (Tamate and Fell, 1977), the higher omasum epithelium cell proliferation might have been compensated by higher cell loss, since the larger surface:digesta ratio and

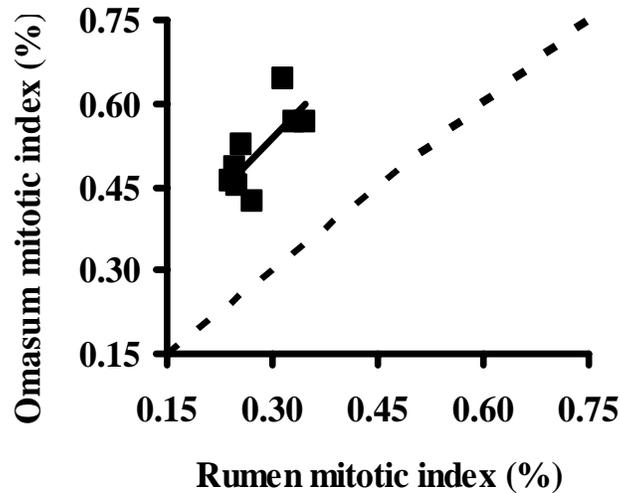


Figure 1. Correlation between the rumen mitotic index (RMI) and the omasum mitotic index (OMI). $OMI = 0.1463 + 1.3057 RMI$; $r^2 = 0.53$; $P = 0.04$; $P = 0.57$ for slope = 1. Dashed line shows the equality line.

the dehydration of the content in the omasum could increase the abrasive effect on the epithelium. There was no correlation between the rumen or omasum epithelium total thickness and the VFA fractional absorption rate nor with the VFA metabolism rate (Tables 2 and 3). Nevertheless, the thickness of the rumen epithelium keratin layer and the mitotic index were positively correlated with the rumen metabolism rate (Tables 2). In the omasum, the correlation between the VFA absorption and the mitotic index was positive, however, those variables were negatively correlated with the VFA metabolism (Table 3).

The total and individual VFA concentrations did not differ among the solutions used for rumen and omasum fragments (Table 1), which excludes the possibility of that factor have influenced the VFA absorption (Dijkstra et al.,

Table 2. Pearson correlation coefficients and probability (*P*) for slope among VFA fractional absorption rate (*ka*), VFA metabolism rate (Metabolism), absorptive surface (Surface), mitotic index (MI), thickness of the epithelium (Epithelium), thickness of the keratin layer (Keratin) and thickness of the non-keratin layers (Non-keratin) in the rumen fragments

	2	3	4	5	6	7
1- <i>ka</i> (%.h ⁻¹) ¹	-0.52 (<i>P</i> = 0.19)	-0.29 (<i>P</i> = 0.48)	-0.08 (<i>P</i> = 0.85)	0.01 (<i>P</i> = 0.98)	-0.38 (<i>P</i> = 0.35)	0.18 (<i>P</i> = 0.67)
2- Metabolism (mmol.h ⁻¹) ²	...	0.33 (<i>P</i> = 0.43)	0.68 (<i>P</i> = 0.06)	0.28 (<i>P</i> = 0.51)	0.76 (<i>P</i> = 0.03)	0.02 (<i>P</i> = 0.95)
3- Surface (cm ²)	0.53 (<i>P</i> = 0.18)	0.09 (<i>P</i> = 0.83)	0.19 (<i>P</i> = 0.65)	0.03 (<i>P</i> = 0.94)
4- MI (%)	-0.18 (<i>P</i> = 0.67)	0.28 (<i>P</i> = 0.50)	-0.35 (<i>P</i> = 0.39)
5- Epithelium (μm)	0.74 (<i>P</i> = 0.04)	0.96 (<i>P</i> < 0.01)
6- Keratin (μm)	0.51 (<i>P</i> = 0.20)
7- Non-keratin (μm)

¹ *ka*: mean of the acetate, propionate, butyrate and valerate fractional absorption rates

² Metabolism: means of the acetate, propionate, butyrate and valerate metabolism rates

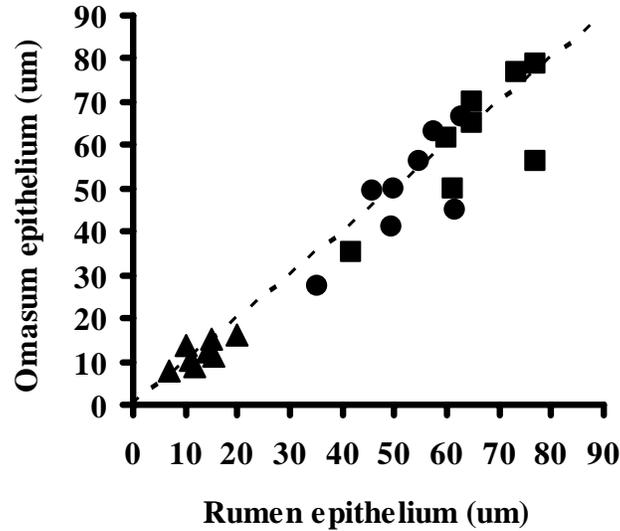


Figure 2. Correlations between the thickness of the rumen (TRE) and omasum (TOE) epithelium (■); the thickness of the keratin layer of the rumen (TKRE) and omasum (TKOE) epithelium (▲); and the thickness of the non-keratin layers of the rumen (TNKRE) and omasum (TNKOE) epithelium (●). TOE = $-2.6839 + 0.9901 \text{ TRE}$; $r^2 = 0.62$; $P = 0.02$; $P = 0.98$ for slope = 1; TKOE = $4.5998 + 0.5577 \text{ TKRE}$; $r^2 = 0.55$; $P = 0.04$; $P = 0.08$ for slope = 1; TNKOE = $-6.4885 + 1.0823 \text{ TNKRE}$; $r^2 = 0.62$; $P = 0.02$; $P = 0.82$ for slope = 1. Dashed line shows the equality line.

Table 3. Pearson correlation coefficients and probability (*P*) for slope among VFA fractional absorption rate (*ka*), VFA metabolism rate (Metabolism), mitotic index (MI), thickness of the epithelium (Epithelium), thickness of the keratin layer (Keratin) and thickness of the non-keratin layers (Non-keratin) in the omasum fragments

	2	3	4	5	6
1- <i>ka</i> (%·h ⁻¹) ¹	-0.73 (<i>P</i> = 0.04)	0.80 (<i>P</i> = 0.02)	0.09 (<i>P</i> = 0.84)	-0.08 (<i>P</i> = 0.85)	0.12 (<i>P</i> = 0.78)
2- Metabolism (mmol·h ⁻¹) ²	...	-0.83 (<i>P</i> = 0.01)	0.45 (<i>P</i> = 0.27)	0.33 (<i>P</i> = 0.43)	0.44 (<i>P</i> = 0.27)
3- MI (%)	-0.24 (<i>P</i> = 0.56)	-0.14 (<i>P</i> = 0.74)	-0.25 (<i>P</i> = 0.55)
4- Epithelium (μm)	0.74 (<i>P</i> = 0.04)	0.99 (<i>P</i> < 0.01)
5- Keratin (μm)	0.62 (<i>P</i> = 0.10)
6- Non-Keratin (μm)

¹ *ka*: mean of the acetate, propionate, butyrate and valerate fractional absorption rates

² Metabolism: means of the acetate, propionate, butyrate and valerate metabolism rates

1993). Because of the valeric acid addition to the mucosal fluid, its concentration was higher than that of butyrate and similar to that of propionate, which does not occur in physiologic conditions. Significant differences were not detected among the fractional absorption rates of the acetate, propionate, butyrate and valerate in rumen and omasum (Table 4). The rates have varied from 18,4%.h⁻¹ to 23,8%.h⁻¹ in the rumen and from 18,5%.h⁻¹ to 25,8%.h⁻¹ in the omasum and these values were not proportional to the size of the carbon chain, indicating the possibility of use of the valeric acid in vitro for VFA fractional absorption ratio determination. The utilization of valeric acid as marker of rumen VFA clearance, in vivo, was proposed by Allen et al. (2000) and validated by Resende Júnior et al. (2006), but published data about its use in vitro were not found. Dijkstra et al. (1993) and Resende Júnior et al. (2006) found higher fractional absorption rates for propionate at pH close to neutral, suggesting that the absorption rate of this acid is higher than that of the others. In the present study, however, despite the propionate fractional absorption rate having been numerically higher than that of the acetate and butyrate (Table 4), there was no significant difference. The VFA fractional absorption rate by surface unit of the omasum was 11 times higher than that of the rumen (Table 4). This finding demonstrates the higher omasum absorptive potential, even considering the fact that the reticulorumen absorptive surface is approximately 4 times higher than the omasum (Daniel et al., 2006). The reason for such a high magnitude of difference could be the absorption mechanisms in the organ wall. In the rumen, the VFA are absorbed under non dissociate (lipophilic highly permeable) and dissociate forms (through bicarbonate exchange) (Gäbel et al., 2002). In the omasum, VFA seems to be absorbed predominantly under protonated form (Ali et al., 2006). Furthermore, unlike the rumen, the omasum absorbs bicarbonate, through chloride exchange (Niebuhr, 2003). The correlation between the rumen and omasum

Table 4. Fractional absorption and metabolism rates of volatile fatty acids in bovine rumen and omasum fragments incubated for 2.08 hours in a tissue diffusion chamber

	Rumen				Omasum				SEM ⁶	<i>P</i> -value ¹		
	A ²	P ³	B ⁴	V ⁵	A	P	B	V		Comp	Acid	Comp*Acid
Fractional absorption rate (%.h ⁻¹)	19.70	23.75	18.36	22.11	18.48	25.79	23.57	22.82	4.05	0.57	0.51	0.86
Fractional absorption Rate/surface (%.h ⁻¹ .cm ⁻²)	0.42 ^b	0.49 ^b	0.34 ^b	0.45 ^b	3.76 ^a	5.25 ^a	4.80 ^a	4.67 ^a	0.52	<0.01	0.45	0.50
Metabolism (%)	11.10 ^e	33.21 ^{cd}	43.12 ^{ab}	46.46 ^a	10.83 ^e	28.94 ^d	36.49 ^{bc}	37.59 ^{bc}	2.21	0.01	<0.01	0.09
Metabolism rate (μmol.h ⁻¹)	262.11 ^d	400.98 ^{bc}	348.95 ^{bcd}	544.10 ^a	253.57 ^d	342.64 ^{bcd}	292.37 ^{cd}	445.06 ^{ab}	36.33	0.06	<0.01	0.54
Metabolism rate/surface (μmol.h ⁻¹ .cm ⁻²)	4.96 ^d	7.96 ^d	6.90 ^d	10.81 ^d	51.66 ^c	69.80 ^b	59.56 ^{bc}	89.97 ^a	4.68	<0.01	<0.01	<0.01

^{a-e} Means within a row with the same letter are not significantly different, according the Tukey's Test ($\alpha = 0.05$).

¹ Comp: compartment effect; Acid: Acid effect; Comp*Acid: Interaction between compartment and acid effect.

² A: acetate; ³ P: propionate; ⁴ B: butyrate; ⁵ V: valerate.

⁶ Standard error of the means.

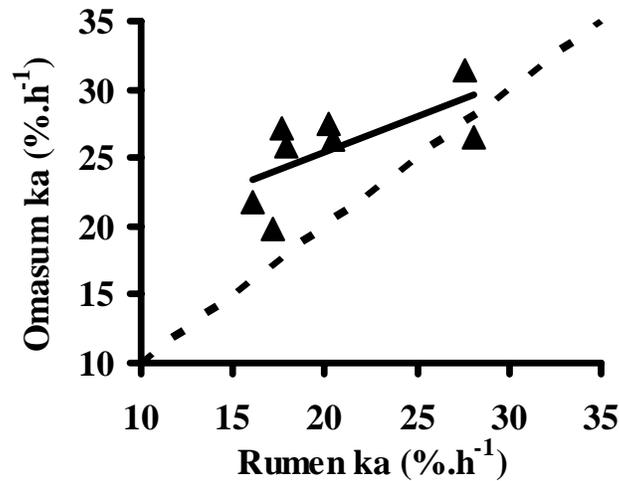


Figure 3. Correlation between the VFA fractional absorption rate in the rumen (Rumen ka) and in the omasum (Omasum ka). Omasum ka = $15.2422 + 0.5117$ Rumen ka; $r^2 = 0.45$; $P = 0.07$; $P = 0.08$ for slope = 1. Dashed line shows the equality line.

VFA fractional absorption rates was positive (Figure 3), indicating that the variation in the rumen and omasum absorptive capacity is unidirectional.

The increase of the mucosal fluid pH and its reduction in the serosal fluid (Figure 4) reflected the VFA transfer in the mucosal to serosal direction. Despite rumen and omasum mucosal pH increase during the incubation, there was a tendency ($P = 0.08$) of interaction between compartment and time (Figure 5). The rumen mucosal pH rose faster than the omasum mucosal pH. This may have happened because of the bicarbonate secretion by rumen epithelium and the bicarbonate absorption by omasum epithelium, since the VFA absorption rates were similar among the compartments.

The rumen VFA metabolism (33.5%), as a percentage of the absorbed, was higher ($P = 0.01$) than that of the omasum (28.5%) (Table 4), probably

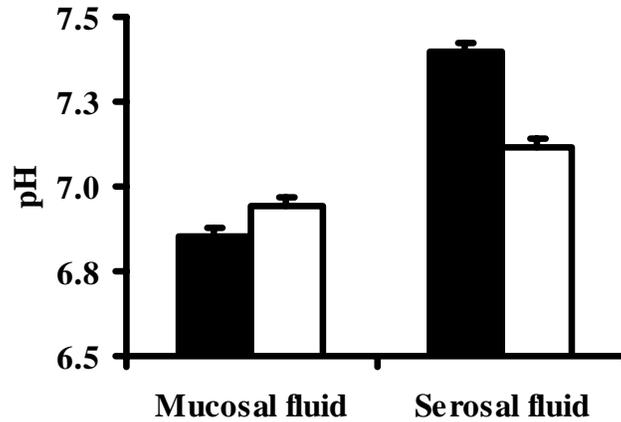


Figure 4. Means of initial (black bar) and final (white bar) pH of mucosal and serosal fluid of rumen and omasum fragments incubated for 2.08 hours in a tissue diffusion chamber. $P = 0.30$ for compartment effect; $P < 0.01$ for solution effect; $P = 0.17$ for interaction between compartment and solution effect; $P < 0.01$ for time effect; $P = 0.27$ for interaction between compartment and time effect; $P < 0.01$ for interaction between solution and time effect; $P = 0.16$ for interaction between compartment, solution and time effect.

because of its larger mass of active metabolic cells. Since the thicknesses of the non-keratin layers of the rumen and omasum epithelium were similar, the absorptive surface can be used as an indicator of the mass of active metabolic cells. The construction of mathematical models that describe the VFA metabolism in forestomach, should take into account the peculiarity of the compartments. The percentage of metabolized acetate (10.9%) was lower than that of the propionate (31.1%) which was lower than that of the butyrate (39.8%) and valerate (42.0%) (Table 4). The present data contradicts a hypothesis accepted for almost 40 years (Bergman and Wolff, 1971), which suggested that

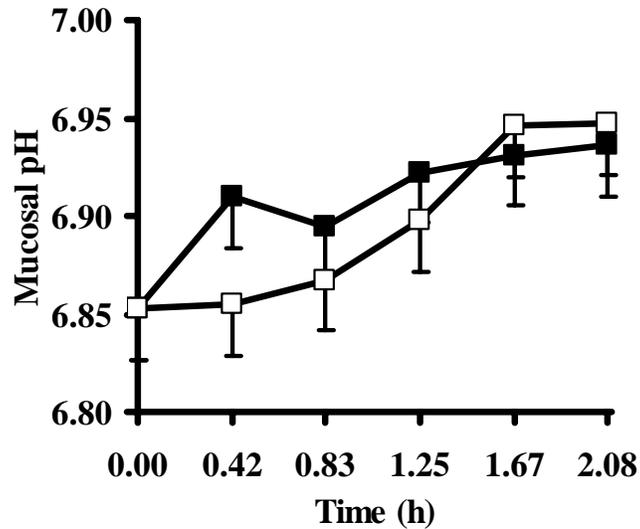


Figure 5. Mucosal pH of rumen (■) and omasum (□) fragments incubated for 2.08 hours in a tissue diffusion chamber. $P = 0.65$ for compartment effect; $P < 0.01$ for time effect; $P = 0.08$ for interaction between compartment and time effect.

high proportions of acetate and propionate are metabolized by gastrointestinal tract epithelium. However, recent studies (Kristensen et al., 2000; Kristensen and Harmon, 2004; Kristensen and Harmon, 2005) have showed that just small proportions of these acids are used by the rumen wall. On the other hand, linear chain VFA with four or more carbons are metabolized intensely by the rumen epithelium (Kristensen and Harmon, 2005) and seem to compete for the same metabolic pathway (Kristensen and Harmon, 2004; Kristensen and Harmon, 2005). The VFA activation and the β -oxidation seems to be the limited pathway (Kristensen et al., 2000; Kristensen and Harmon, 2005). The non physiologic concentration of valerate on the side mucosal may have affected the butyrate metabolism significantly (Kristensen and Harmon, 2005). Kristensen and

Harmon (2005) observed that the portal appearance of that butyrate that disappeared from the rumen increased from 25% to 52% when the rumen valerate concentration increased from 1.2 to 8.0 mmol.kg⁻¹. Moreover, the same authors observed that the increase in the rumen butyrate concentration (4 to 36 mmol.kg⁻¹) resulted in the increase of butyrate (18 to 52%) and valerate (16 to 54%) portal recovery, reinforcing the theory of the competition among those VFA during the epithelial metabolism (Kristensen and Harmon, 2004). In the hypothesis of the butyrate and valerate being metabolized in the same proportion, if the valerate concentrations were within physiologic standards (~1% of VFA), the butyrate metabolism in the present study, would probably be much higher than the found.

The rumen VFA metabolism mean rate (389.03 $\mu\text{mol.h}^{-1}$) was higher ($P = 0.06$) than that of the omasum (333.41 $\mu\text{mol.h}^{-1}$) (Table 4), reflecting the largest percentage of metabolized VFA, since the mucosal VFA concentrations were similar (Table 2). The rumen and omasum valerate metabolism mean rate (494.58 $\mu\text{mol.h}^{-1}$) was higher than that of the butyrate (320.66 $\mu\text{mol.h}^{-1}$) and of the propionate (371.81 $\mu\text{mol.h}^{-1}$), which were higher than that of the acetate (257.84 $\mu\text{mol.h}^{-1}$) (Table 4). There was no correlation between the rumen and omasum VFA metabolism rate (Figure 6). Even if lower proportions of absorbed acetate and propionate are metabolized, significant amounts are used by the forestomach wall, because usually these acids are found in elevated concentrations in the mucosal fluid. When the metabolic rate was corrected for the absorptive surface, there was interaction ($P < 0.01$) between compartment and acid (Table 4). The average of VFA metabolism rates in the rumen (7.7 $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) was much lower than the average in the omasum (67.8 $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) (Table 4). In the omasum, the valerate was more metabolized than the butyrate and propionate. The acetate was the least metabolized acid, but it did not differ significantly from the butyrate. The occurrence of that interaction was

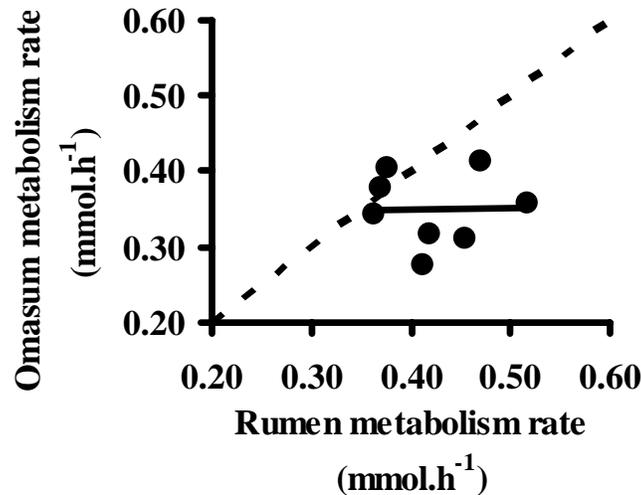


Figure 6. Correlation between the volatile fatty acid metabolism rate in the rumen (Rumen met) and in the omasum (Omasum met). Omasum met = $0.3481 + 0.0050$ Rumen met; $r^2 = 0.00$; $P = 0.99$; $P = 0.03$ for slope = 1. Dashed line shows the equality line.

probably due to the magnitude of the values found in the rumen, which were much lower than that of the omasum. However, the sequence of the rumen VFA metabolic rates was the same of the omasum. The estimated metabolism considering the total organ surfaces was higher in the omasum than in the rumen.

The water fractional absorption rate, assumed as the fractional increase rate in the chromium concentration on the mucosal side, tended to be higher ($P = 0.07$) in the omasum ($7.40\% \cdot h^{-1}$) than in the rumen ($4.24\% \cdot h^{-1}$). When the fractional rate was adjusted by the fragment's surface, the speed of the omasum water absorption ($1.51\% \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$) was 19 times higher ($P < 0.01$) than that of the rumen ($0.08\% \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$). The present data confirm the high capacity of the omasum to absorb water, a well-known function, in vivo (Edrison et al., 1986).

The VFA metabolism and absorption potential of the omasum is higher than that of the rumen showing that there are important physiological differences among the organs and the necessity of more researches about the omasum physiology. This lack of studies about omasum possibly reflects the difficulty of accessibility because of its anatomical localization.

The rumen and omasum absorption capacities vary in the same way and there are indications that the factors capable of stimulating the rumen wall proliferation also are capable of stimulating the omasum wall. So, the variation in the diet aiming to interfere in the absorption capacity of the rumen may be effective to interfere in the omasum absorption capacity, although the fractional rates magnitudes are different.

All these findings of the present study bring important and original information in this area and may be very useful in the development of the ruminant nutrition field.

LITERATURE CITED

- Ali, O., Z. Shen, U. Tietjen, and H. Martens. 2006. Transport of acetate and sodium in sheep omasum: mutual, but asymmetric interactions. *J. Comp. Physiol. B.* 176:477-87.
- Allen, M.S., L.E. Armentano, M.N. Pereira, Y. Ying, and J. Xu. 2000. Method to measure fractional rate of volatile fatty acid absorption from the rumen. Page 26 in Proc. 25th Conf. Rumen Function, Chicago, IL.
- Baldwin, R.L. VI, K.R. McLeod, and A. V. Capuco. 2004. Visceral tissue growth and proliferation during the bovine lactation cycle. *J. Dairy Sci.* 87:2977-86.
- Barker, I.K., A.A. Van Dreumel, and N. Palmer. 1995. The alimentary system. Page 1 in *Pathology of domestic animals*. 4th ed. vol 2. K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy, N. Palmer, ed. Academic, San Diego, CA.
- Beharka, A.A., T.G. Nagaraja, J.L. Morrill, G.A. Kennedy, and R.D. Klemm. 1998. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 81:1946-55.
- Bergman, E.N., and J.E. Wolff. 1971. Metabolism of volatile fatty acids by liver and portal-drained viscera in sheep. *Am. J. Physiol.* 221:586-92.

- Binnerts, W.T., A.T. Van't Klooster, and A.M. Frens. 1968. Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. *Vet. Rec.* 82:470.
- Bödeker, D., S. Lamy, M. Mahler, and H. Höller. 1994. Effects of short chain fatty acids on electrophysiological properties and permeability characteristics of sheep (*Ovis aries*) abomasal mucosa. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 107: 73-9.
- Bolton, J.R., A.M. Merrit, G.M. Carlson, and W.J. Donawick. 1976. Normal abomasal electromyography and emptying in sheep and the effects of intraabomasal volatile fatty acid infusion. *Am. Vet. Res.* 37:1387.
- Brownlee, A. 1956. The development of rumen papillae in cattle fed on different diets. *Br. Vet. J.* 112:369-75.
- Daniel, J.L.P., J.C. Resende Júnior, e F.J. Cruz. 2006. Participação do ruminoretículo e omaso na superfície absorptiva total do proventrículo de bovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 43:688-94.
- Dijkstra, J., H. Boer, J.V. Bruchem, M. Bruining, and S. Tamminga. 1993. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *Br. J. Nutr.* 69:385-96.
- Dirksen, G., H.G. Liebich, G. Brosi, H. Hagemester, and E. Mayer. 1984. Morphologie der Pansenschleimhaut und Fettsäureresorption beim Rind: bedeutende Faktoren für Gesuntheit und Leistung. *Zentralbl. Veterinärmed.* 31:414-30.
- Edrize, B.M., R.H. Smith, and D. Hewitt. 1986. Exchange of water and certain water-soluble minerals during passage of digesta through the stomach compartments of young ruminating bovines. *Br. J. Nutr.* 55:157-67.
- Gäbel G., J.R. Aschenbach, and F. Muller. 2002. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. *Anim. Health Res. Rev.* 3:15-30.
- Gäbel, G., M. Marek, and H. Martens. 1993. Influence of food deprivation on SCFA and electrolytes transport across sheep reticulorumen. *J. Vet. Med. Ser. A.* 40:339-44.
- Gálfi, P., S. Neogrady, and F. Kutas. 1986. Dissimilar ruminal epithelial response to short-term and continuous intra-ruminal infusion of sodium n-butyrate. *J. Vet. Med.* 33:47-52.
- Kristensen, N.B., and D.L. Harmon. 2004. Effect of increasing ruminal butyrate absorption on splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. *J. Anim. Sci.* 82:3549-59.
- Kristensen, N.B., and D.L. Harmon. 2005. Effects of adding valerate, caproate, and heptanoate to ruminal buffers on splanchnic metabolism in steers under washed-rumen conditions. *J. Anim. Sci.* 83:1899-907.

- Kristensen, N.B., S.G. Pierzynowski, and A. Danfaer. 2000. Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intraruminally infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate. *J. Anim. Sci.* 78: 1372-9.
- Littell, R.C., P.R. Henry, and C.B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216-31.
- Niebuhr, V. 2003. In vitro Untersuchungen zum Bicarbonattransport des Blättermagenepithels von Schafen. Dissertation. Freien Universität Berlin, Berlin.
- Peters, J.P., R.Y.W. Shen, and S.T. Chester. 1990. Propionic acid disappearance from the foregut and small intestine of the beef steer. *J. Anim. Sci.* 68:3905-13.
- Resende Júnior, J.C., M.N. Pereira, H. Bôer, and S. Tamminga. 2006. Comparison of Techniques to Determine the Clearance of Ruminal Volatile Fatty Acids. *J. Dairy Sci.* 89:3096-106.
- Rupp, G.P., K.K. Kreikemeier, L.J. Perino, and G.S. Ross. 1994. Measurement of volatile fatty acid disappearance and fluid flux across the abomasum of cattle, using an improved omasal cannulation technique. *Am. J. Vet. Res.* 55:522-9.
- Sakata, T., K. Hikosaka, Y. Shiomura, and H. Tamate. 1980. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. *Br. J. Nutr.* 44:325-31.
- Sakata, T., and H. Tamate. 1976. Effect of intraruminal injection of n-sodium butyrate on the mitotic index in sheep ruminal epithelium. *Tohoku J. Agr. Res.* 27:133-5.
- Sakata, T., and H. Tamate. 1974. Effect of the intermittent feeding on the mitotic index and the ultrastructure of basal cells of the ruminal epithelium in sheep. *Tohoku J. Agr. Res.* 25:156-63.
- Sander, E.G., R.G. Warner, H.N. Harrison, and J.K. Loosli. 1959. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosae in the young calf. *J. Dairy Sci.* 42:1600-5.
- SAS Institute. 1999. SAS/STAT users guide. Version 6.12. Cary, NC.
- Shen, Z., H.M. Seyfert, B. Löhrke, F. Schneider, R. Zitnan, A. Chudy, S. Kuhla, H.M. Hammon, J.W. Blum, H. Martens, H. Hagemeister, and J. Voigt. 2004. An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats. *J. Nutr.* 134:11-7.
- Svendsen, P. 1969. Etiology and pathogenesis of abomasal displacement in cattle. *Nord. Vet. Med.* 21(Suppl.1):1.
- Tamate, H., and B.F. Fell. 1977. Cell deletion as a factor in the regulation of rumen epithelial populations. *Vet. Sci. Comm.* 1:359-64.

- Tamminga, S., and A.M. Van Vuuren. 1988. Formation and utilization of end products of lignocellulose degradation in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 21:141-59.
- Voelker, J.A., and M.A. Allen. 2003. Pelleted Beet Pulp Substituted for High-Moisture Corn: 3. effects on ruminal fermentation, pH, and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:3562-70.
- Waldron, M.R., F.N. Schrick, J.D. Quigley, J.L. Klotz, A.M. Saxton, and R.N. Heitmann. 2002. Volatile fatty acids metabolism by epithelial cells isolated from different areas of the ewe rumen. *J. Anim. Sci.* 80:270-8.