

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS  
INDUZIDAS POR BUTIRATO, PROPIONATO  
E LACTATO SOBRE A MUCOSA RUMINAL E  
EPIDERME DE BEZERROS**

**SUELY DE FÁTIMA COSTA**

**2003**

**SUELY DE FÁTIMA COSTA**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR BUTIRATO,  
PROPIONATO E LACTATO SOBRE A MUCOSA RUMINAL E  
EPIDERME DE BEZERROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Doutora”.

**Orientador**  
**Prof. Marcos Neves Pereira**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2003**

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

Costa, Suely de Fátima

Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerros / Suely de Fátima Costa.

-- Lavras : UFLA, 2003.

110p. : il.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Ácidos graxos voláteis. 2. Plano nosolabial. 3. *Epicera*. 4. *Perioplum*. 5. Ultraestrutura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-636.2085

**SUELY DE FÁTIMA COSTA**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR BUTIRATO,  
PROPIONATO E LACTATO SOBRE A MUCOSA RUMINAL E  
EPIDERMIS DE BEZERROS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Doutora”.

APROVADA em 25 de abril de 2003

Prof. João Chrysostomo de Resende Júnior - UFLA

Prof. José Camisão de Souza - UFLA

Prof. José Carlos Nogueira - UFMG

Prof<sup>ª</sup>. Sandra Gesteira Coelho - UFMG

**Prof. Marcos Neves Pereira  
UFLA  
(Orientador)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

Ao Flávio, meu esposo e companheiro;

A minha querida filhinha, Helena.

**Dedico**

Aos meus pais, Vicente e Fátima.

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

A Deus

Ao meu orientador, Prof. Marcos Neves Pereira.

Ao amigo “Bambuí”.

Aos professores João Chrysostomo de Resende Júnior, José Carlos Nogueira, José Camisão de Sousa e Sandra Gesteira Coelho.

Aos professores Leonardo Augusto Lopes Muzzi, Luis David Murgas, Marcelo Vidigal Caliar e Giovanni Dantas Cassali.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Zootecnia.

Aos secretários do curso de Pós-graduação, Carlos e Pedro.

Às secretárias do Departamento de Medicina Veterinária, Mara e Rosana.

Ao técnico do Laboratório de Anatomia Animal/DMV, Marcão.

Ao técnico do Laboratório de Histologia Animal/DMV, Wesley.

Às técnicas do Centro de Microscopia Eletrônica do ICB/UFMG, Ivete e Olga.

Aos colegas do grupo de estudo, Renata, Gabriela, Hudson, Sabará, Clóvis e o famoso “Melecão”.

Aos proprietários das fazendas que forneceram os “nossos queridos bezerros”.

Aos alunos Francis, Leandra, Helizandra, Rogério, Soraia, Tatiane, Estevão e Edmarcos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.

À Universidade Federal de Lavras e aos Departamentos de Zootecnia (DZO) e Medicina Veterinária (DMV).

Aos vinte e cinco bezerros.

A todos os meus familiares e aos de meu esposo, pelo incentivo e confiança.

Aos meus pais, Vicente e Fátima.

Ao meu esposo, papai Flavinho, e minha Heleninha, muito obrigada!

E a todos que incentivaram, participaram e de alguma forma tornaram possível a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Características morfológicas da parede ruminal, da epiderme no plano nasolabial, da <i>epicera</i> e do <i>perioplum</i> de bovinos .....	4
2.1.1 Aspectos morfológicos da parede ruminal .....	4
2.1.1.1 Aspectos anatômicos .....	4
2.1.1.2 Aspectos histológicos .....	5
2.1.1.3 Aspectos ultra-estruturais do epitélio ruminal .....	7
2.1.2 Aspectos histológicos da epiderme no plano nasolabial, da <i>epicera</i> e do <i>perioplum</i> dos bovinos .....	11
2.1.2.1 Estrutura epidérmica no plano nasolabial .....	12
2.1.2.2 Estrutura tegumentar dos cascos .....	13
2.1.2.3 Estrutura epidérmica na <i>epicera</i> .....	15
2.2 Regulação da proliferação e diferenciação das células queratinizadas .....	16
2.3 Efeito dos AGV sobre o crescimento da mucosa do trato gastrointestinal ..	21
2.4 Efeito dos AGV sobre a morfologia das papilas ruminais .....	25
2.5 Relação entre queratinização e distúrbios nos membros locomotores .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 Local de condução do experimento .....	29
3.2 Animais e alimentação no período experimental de coleta de dados .....	29
3.3 Implantação cirúrgica de catéteres no rúmen .....	29
3.4 Tratamentos experimentais .....	31
3.5 Amostras de sangue e dosagem de insulina sorológica .....	32
3.6 Dados morfológicos .....	33
3.6.1 Macroscopia do rúmen .....	33
3.6.2 Microscopia óptica das papilas ruminais, da epiderme do plano nasolabial, da <i>epicera</i> e do <i>perioplum</i> .....	34
3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão do epitélio ruminal .....	37
3.7 Análises estatísticas .....	39
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>

4.1 Descrição histopatológica do epitélio ruminal .....	53
4.1.1 Salina.....	53
4.1.2 Propionato .....	54
4.1.3 Lactato.....	56
4.1.4 Butirato.....	58
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>76</b>

## RESUMO

COSTA, Suely de Fátima. **Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerros.** 2003. 110p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

Ácidos graxos voláteis podem causar alterações morfológicas em tecidos epiteliais estratificados queratinizados de bovinos. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de butirato, propionato e lactato sobre a morfologia da parede ruminal, da epiderme no plano nasolabial, da *epicera* e do *perioplum* de bezerros e validar a execução e interpretação de biópsias tegumentares como indicadores de alterações da mucosa ruminal. O rúmen de 17 bezerros recém-nascidos foi mantido afuncional por alimentação contínua com dieta líquida. Aos 45 dias de vida, cateteres foram cirurgicamente implantados no rúmen e os animais receberam infusões intraruminais de butirato, propionato, lactato ou salina (controle) entre os dias 52 e 89 de vida. A quantidade diária infundida de propionato e butirato foi 0,0744 moles/kg do peso metabólico e a quantidade de lactato foi 0,0636. A insulina sorológica foi dosada no 22<sup>o</sup> dia de aplicação dos tratamentos nos tempos 0, 90, 180 e 360 minutos relativamente à infusão diária da manhã. No final do período experimental, os animais foram abatidos e fragmentos de tecidos foram coletados no saco cranial, recesso e saco cego caudo-ventral do rúmen, na epiderme do plano nasolabial, na *epicera* e no *perioplum* traseiro e dianteiro. Todos os AGV induziram aumento proporcionalmente maior no peso do rumino-retículo que no peso do omaso, sendo o butirato aparentemente mais estimulador da massa do estômago aglandular que propionato e lactato. A infusão de AGV tendeu a aumentar o peso e a proporção de epitélio e conjuntivo subepitelial no saco cranial do rúmen; entretanto, esses reduziram o número de papilas por cm<sup>2</sup> de parede ruminal. Embora butirato tenha sido mais estimulador da secreção de insulina, esse AGV foi incapaz de induzir ganho em área ou altura das papilas. Todos os AGV aumentaram a proliferação das células da camada basal do epitélio ruminal. Embora a infusão de AGV tenha aumentado a área de células metabolicamente ativas no rúmen, somente o propionato tendeu a aumentar o tamanho papilar no saco cranial do rúmen. A resposta em mitose celular à infusão de lactato e butirato parece ter ocorrido em resposta à ruminite induzida por AGV. O efeito da infusão de AGV na epiderme do plano nasolabial foi contrário ao efeito observado no rúmen. Os AGV aumentaram o índice mitótico

---

<sup>1</sup> **Comitê Orientador:** Prof. Marcos Neves Pereira – UFLA (Orientador), Prof. José Camisão de Souza – UFLA, Prof. João Chrysostomo de Resende Júnior – UFLA.

no *perioplum* traseiro, contrariamente ao efeito sobre o plano nasolabial e a *epicera*. Não foram observadas lesões histopatológicas nos epitélios do plano nasolabial, da *epicera* e *perioplum*, mostrando que essas são conseqüências do efeito direto dos AGV sobre o epitélio ruminal. Butirato e o lactato foram mais indutores de alterações patológicas no epitélio ruminal. Os efeitos dos AGV sobre a morfologia da mucosa ruminal e de outros tecidos queratinizados sugerem que danos morfológicos no epitélio do rúmen e de cascos podem ter causa comum, explicando a ocorrência simultânea de anomalias nessas estruturas em bovinos sujeitos à acidose ruminal. Biópsias tegumentares podem ter utilidade como indicadores de alterações morfológicas da mucosa do rúmen.

## ABSTRACT

COSTA, Suely de Fátima. **Lactate, propionate and butyrate induced morphological alterations on calf ruminal mucosa and epidermis.** 2003. 110p. Thesis (Doctor in Program in Animal Science)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

Volatile fatty acids (VFA) may cause morphological alterations on bovine keratinized stratified epithelial tissues. The objective was to evaluate the effect of butyrate, propionate and lactate on ruminal wall, the epidermis of nasolabial surface, the *periplum* and the *epicera* of calves. Also, to validate the procedure and interpretation of tegument biopsies as indicators of ruminal mucosa alterations. Ruminal activity on 17 neonatal calves was lowered by continuous liquid diet. At 45 days of age foley catheters were placed surgically in the rumen. Daily infusions were 0.0744 and 0.0636 moles/kg of metabolic weight for propionate and butyrate, and lactate, respectively. Serum insulin was sampled on the 22<sup>nd</sup> day from the beginning of treatments at, 0, 90, 180 and 360 minutes relative to the morning infusion. After slaughter tissue samples were collected from ruminal cranial sac, recess and caudo-ventral sac, nasolabial surface, *epicera* and *periplum* from front and hindquarters. All VFA induced greater increase on ruminal-reticulum proportionate weight than on omasum. Butyrate was a greater stimulator of non-glandular stomach growth than lactate and propionate. VFA infusion tended to increase weight and proportion of ruminal cranial sac epithelium and sub epithelial stroma, however they reduced papillae number per ruminal wall square centimeter. Although butyrate stimulated more insulin secretion, this VFA was not capable to induced gain on papillae area or height. Although VFA infusion increased metabolically active ruminal cell area, only propionate tended to increase ruminal cranial sac papillary area. Cellular mitosis response to lactate and butyrate infusion seemed to have occurred in response to induced VFA induced rumenitis. Nasolabial surface VFA infusion effect was the opposite to that observed in the rumen. VFA increased hind *periplum* mitotic index, contrary to its effect on the nasolabial surface and *epicera*. No histopathological lesions were observed on nasolabial surface, *epicera* and *periplum*, demonstrating that these are consequences of VFA direct effect on ruminal epithelium. Butyrate and lactate were better pathological alterations inducers on the ruminal epithelium. VFA effects on ruminal mucosa morphology and on other keratinized tissues suggest that morphological damage

---

<sup>1</sup> **Graduate Committee:** Marcos Neves Pereira – UFLA (Major Professor), José Camisão de Sousa – UFLA, João Chrysostomo de Resende Júnior – UFLA.

on hoof and ruminal epithelium may have a common cause, which explains the simultaneous anomaly occurrence on these structures from cattle subject to ruminal acidosis. Tegumentary biopsies may be useful as ruminal mucosa morphological alteration indicators.

## 1 INTRODUÇÃO

A fermentação microbiana e a produção de ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen são eventos nutricionalmente importantes em ruminantes, uma vez que aproximadamente 70% da exigência energética nesses animais podem ser atendidas por acetato, propionato e butirato (Bergman, 1990). Alta taxa de produção e absorção de AGV é requerida para o suprimento de nutrientes necessários para o desempenho satisfatório de ruminantes. No entanto, a ingestão de dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen pode resultar em acúmulo excessivo de AGV no fluido ruminal, desencadeando um quadro de acidose (Barker et al., 1995). A acidose ruminal pode afetar negativamente o desempenho e a saúde animal mediante efeitos deletérios sobre a motilidade do rúmen (Leek & Harding, 1975; Crichlow & Chaplin, 1985), a fermentação da fibra (Grant & Mertens, 1992; Krajcarski-Hunt et al., 2002), o consumo de alimentos (Elliot et al., 1995; Krajcarski-Hunt et al., 2002) e a morfologia da parede ruminal (Jensen et al., 1954; Ahrens, 1967). O estímulo da capacidade de *clearance* de AGV pela parede do rúmen, por manipulação dietética da morfologia papilar (Sutton et al., 1963; Gaebel et al., 1987) pode ser uma estratégia alimentar plausível em vacas leiteiras, propiciando alta absorção de energia sem induzir acúmulo excessivo de AGV no fluido ruminal.

O tipo de AGV presente no conteúdo ruminal pode afetar a resposta em crescimento das células do epitélio. O propionato e o butirato parecem ser mais estimuladores do crescimento papilar que o acetato (Sander et al., 1959, Vair et al., 1960). A alta produção ruminal de butirato, no entanto, parece ser indesejável do ponto de vista de integridade e atividade metabólica da parede ruminal em razão dos efeitos diretos indesejáveis desse ácido sobre a proliferação e a queratinização das células epiteliais (Gálfi et al., 1993). O efeito direto do butirato sobre o epitélio ruminal parece ser inibidor de mitose e indutor

de diferenciação celular (Staiano-Coico et al., 1990). O propionato parece ser o AGV responsável pelo crescimento de papilas metabolicamente ativas.

O acúmulo ruminal de lactato pode ocorrer por indução experimental de acidose aguda em ruminantes (Hungate et al., 1952; Crichlow & Chaplin, 1985; Harmon et al., 1985; Crichlow, 1988). No entanto, vacas leiteiras que receberam dietas de alto conteúdo energético apresentam concentrações plasmáticas de D-lactato muito abaixo das observadas nesses experimentos (Oetzel et al., 1999; Pereira et al., 1999). Apesar de a concentração plasmática de lactato ser baixa em vacas leiteiras de alta produção, consumindo dietas típicas para essa categoria animal, a concentração plasmática de D-lactato foi maior em dietas com alto teor de amido e baixa forragem do que em dietas menos acidogênicas formuladas com maior teor de forragem (Pereira et al., 1999). O papel do lactato e de outros AGV na etiopatogenia da acidose em vacas leiteiras precisa ser mais bem esclarecido para que medidas de controle tecnicamente fundamentadas sejam adotadas.

Alterações microscópicas no processo de queratinização são observadas em bovinos com distúrbios nos membros locomotores (Nilsson, 1963; MacLean, 1971; Andersson & Bergman, 1980; Singh et al., 1992). Distúrbios de queratinização podem atuar como fator predisponente ao aparecimento de afecções de casco, por alterar a morfologia e a dureza dos mesmos (Baggott et al., 1988; Hendry et al., 1999). A indução de acidose em equinos afetou tanto a queratinização dos cascos quanto das castanhas, sugerindo que a patologia pode ter natureza sistêmica. Apesar de a extração de butirato e propionato pelo fígado ser alta (Krehbiel et al., 1992), o teor plasmático desses AGV aumenta após a alimentação em ovinos (Thye et al., 1970; Ross & Kitts, 1973). Danos morfológicos no tecido epitelial do rúmen e de cascos podem ter os AGV como causa comum, possivelmente explicando a ocorrência simultânea de anomalias no rúmen e nos cascos de bovinos sujeitos à acidose ruminal.

Conduziu-se este trabalho com o objetivo de avaliar o efeito de butirato, propionato e lactato sobre a morfologia da mucosa ruminal, da epiderme no plano nasolabial, da *epicera*<sup>1</sup> e do *perioplum*<sup>2</sup> de bezerros, nos quais o desenvolvimento do estômago aglandular foi inibido experimentalmente por manutenção desses animais em dieta exclusivamente líquida. Por meio dos resultados visa-se fornecer subsídios para melhor compreensão da etiopatogenia da acidose em bovinos e validar a execução e interpretação de biópsias tegumentares como indicadores de alterações morfológicas da mucosa ruminal.

---

<sup>1</sup> *Epicera* é a epiderme localizada na base do corno, a qual apresenta características intermediárias entre as epidermes da pele e a de revestimento do corno (Nomina Histológica, 1994).

<sup>2</sup> *Perioplum* é a epiderme que cobre a borda coronária do casco em ungulados. Ela caracteriza a transição entre a epiderme da pele do membro e da parede do casco, estruturalmente similar à *epicera* do corno (Nomina Histológica, 1994).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Características morfológicas da parede ruminal, da epiderme no plano nasolabial, da *epicera* e do *perioplum* de bovinos**

#### **2.1.1 Aspectos morfológicos da parede ruminal**

##### **2.1.1.1 Aspectos anatômicos**

O estômago dos ruminantes é constituído por quatro câmaras distintas. A parte aglandular é formada pelo rúmen, retículo e omaso, e a parte glandular, pelo abomaso. O rúmen é o maior dos compartimentos do estômago aglandular e ocupa a maior parte da cavidade abdominal, especialmente o antímero esquerdo. A superfície externa do rúmen é marcada por vários sulcos de profundidade variável, os quais são representados internamente por espessamentos da camada muscular da parede denominados pilares. Os sulcos, externamente, e os pilares, internamente, delimitam os sacos cranial, dorsal, cego caudo-dorsal e saco cego caudo-ventral. A extremidade cranial do saco ventral é denominada recesso do rúmen (FIGURA 1) (Nickel et al., 1981).

A superfície interna do rúmen de um animal adulto é caracterizada macroscopicamente pela presença de inúmeras projeções da mucosa, as papilas ruminais, as quais aumentam a superfície interna do órgão. As papilas se projetam para o lume do órgão, podendo apresentar formas e tamanhos variados nas diferentes partes do rúmen (Schnorr & Vollmerhaus, 1967; Henrikson, 1970). Elas são maiores e mais densas nas regiões ventrais dos sacos ruminais.

### **2.1.1.2 Aspectos histológicos**

A parede do rúmen é formada pelas túnicas serosa, muscular, submucosa e mucosa, citadas no sentido da cavidade abdominal para o lume ruminal. A mucosa é constituída pelo epitélio, luminal à membrana basal, e pela lâmina própria (LP) de natureza conjuntiva, serosal à membrana basal (Steven & Marshall, 1970; Dellmann & Brown, 1982). A presença da túnica submucosa no rúmen é questionável, em função da ausência de uma camada muscular da mucosa. Alguns autores definem todo o tecido conjuntivo abaixo do epitélio e acima da camada muscular como lâmina própria-submucosa (Banks, 1992). Manualmente é possível separar as túnicas serosa e muscular do restante da parede, devido à natureza frouxa desse tecido conjuntivo.

O epitélio de revestimento do rúmen é do tipo estratificado pavimentoso queratinizado, de espessura variável, formado por quatro camadas de células distintas: basal, espinhosa, granulosa e córnea ou queratinizada, sendo morfológicamente semelhante à epiderme da pele (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992). O epitélio é a parte metabolicamente ativa da mucosa e exerce as funções fisiológicas de absorção, metabolismo de AGV e proteção (Sakata & Tamate, 1979; Gálfi et al., 1991). A camada queratinizada apresenta baixa capacidade metabólica devido à presença de grande quantidade de queratina no citoplasma e poucas organelas celulares (Baldwin & Jesse, 1991). Embora permeável, essa camada forma uma barreira protetora contra a ingesta abrasiva e microorganismos. Já as camadas mais profundas apresentam alta capacidade de absorção e metabolização de AGV (Henrikson & Stacy, 1971; Dellman & Brown, 1982; Banks, 1992). A proporção entre o número de células metabolicamente ativas e o número de células queratinizadas determina a atividade metabólica por unidade de massa de epitélio (Baldwin & Jesse, 1992).

Como ocorre em qualquer epitélio estratificado, a proliferação celular sucede-se a partir da camada basal, onde as células entram em divisão mitótica. Essas, por sua vez, sofrem diferenciação (queratinização) e migram para as camadas superiores do epitélio até alcançar a camada córnea e descamar para dentro do lume ruminal (Dellman & Brown, 1982; Banks, 1992). A velocidade relativa dos processos de proliferação celular, diferenciação e descamação determina o número de células em cada camada do epitélio. Se a velocidade de proliferação das células epiteliais for proporcionalmente maior que a velocidade de descamação, ocorrerá aumento no número de camadas de células no epitélio, definido como hiperplasia (Jones et al., 2000).

Acantose é definida como a hiperplasia caracterizada por aumento no número de células das camadas basal e espinhosa do epitélio (Jones et al., 2000). Hiperqueratose é a hiperplasia do epitélio caracterizada por aumento na espessura da camada córnea, sendo um achado comum em bovinos alimentados com dietas ricas em concentrados (Jensen et al., 1954; Mayer, 1986). Paraqueratose ocorre quando núcleos picnóticos são retidos na camada córnea. O epitélio ruminal é naturalmente paraqueratótico (Lavker et al., 1969; Lavker & Matoltsy, 1970). Maior prevalência de paraqueratose ruminal também é associada a dietas com alto teor de alimentos concentrados (Tamate & Kikuchi, 1978), provavelmente resultante da indução de alta taxa de proliferação e migração celular sem tempo suficiente para completa diferenciação (Goodlad, 1981). Quando dietas ricas em alimentos concentrados são utilizadas, exigindo alta capacidade de absorção de AGV pelo epitélio, a paraqueratose parece compensar a hiperqueratose, mantendo uma camada de células queratinizadas mais permeável aos metabólitos ruminais.

De acordo com Dellman & Brown (1982) e Banks (1992), a LP é constituída por tecido conjuntivo, contendo fibras colágenas, elásticas e reticulares, formando o eixo central de cada papila. O tecido conjuntivo denso da

LP é altamente vascularizado, contendo uma rede de capilares fenestrados logo abaixo da membrana basal. A LP é desprovida de nódulos linfóides e é aglandular. Na região que poderia ser definida como submucosa, o tecido conjuntivo frouxo é rico em fibras colágenas e elásticas que se mesclam com a LP, e algumas fibras se projetam para o interior da papila. O tecido conjuntivo submucoso também é bem vascularizado e apresenta nervos formando plexos (plexos submucosos) constituídos por gânglios do sistema nervoso autônomo.

A camada muscular é constituída por músculo liso formando as camadas circular interna e longitudinal externa (Dellman & Brown, 1982; Banks, 1992). O tamanho e tônus da camada muscular parece ser dependente da intensidade do trabalho físico de digestão. Nocek & Kesler (1980) observaram espessamento da camada muscular do rúmen em bezerros alimentados com feno por 14 semanas comparativamente a animais alimentados com dieta peletizada. Plexos nervosos com gânglios do sistema nervoso autônomo (plexos mioentéricos) estão localizados entre as camadas circular interna e longitudinal externa.

A camada serosa é composta por epitélio simples pavimentoso, denominado mesotélio, voltado para a cavidade abdominal, e por uma faixa de tecido conjuntivo, localizada internamente à primeira, e que contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e tecido adiposo (Dellman & Brown, 1982 e Banks, 1992).

### **2.1.1.3 Aspectos ultra-estruturais do epitélio ruminal**

Morfologicamente semelhante às células da epiderme, as células do epitélio ruminal apresentam características ultra-estruturais relacionadas com a biossíntese de substâncias queratinosas, e esse processo tem início na camada basal com a diferenciação pós-mitótica das células. O processo envolve duas fases distintas, nas quais as células se diferenciam e se transformam em células

queratinizadas. A primeira fase envolve a síntese de produtos necessários para a queratinização: filamentos, grânulos limitados por membrana e grânulos de queratohialina. A segunda fase envolve a conversão da célula altamente granular em célula queratinizada constituída por um complexo amorfofilamentoso envolto por uma membrana plasmática espessada (Steven & Marshall, 1970; Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

A camada basal apresenta células colunares ou cuboidais esporadicamente intercaladas por células menores (Steven & Marshall, 1970; Henrikson & Stacy, 1971; Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992). As células colunares apresentam núcleo fortemente escuro e com contorno irregular ou podem apresentar núcleo relativamente pálido e com limite linear. Grande número de mitocôndrias podem ser observadas próximas ao núcleo, entremeadas por ribossomas livres e retículo endoplasmático rugoso (RER). Complexos de Golgi, corpos elétron-densos e vesículas de pinocitose são encontrados no citoplasma não-perinuclear. Pequenos feixes de filamentos podem ser observados paralelamente à membrana celular. A superfície celular lateral e a superfície próxima à membrana basal apresentam pregas. Essas são prolongamentos do citoplasma que se projetam no espaço intercelular lateral ou na direção da membrana basal. Na superfície celular oposta à membrana ocorrem microvilos menos desenvolvidos que as pregas laterais e basais. Essas projeções do citoplasma na membrana celular podem estar funcionalmente relacionadas à área de superfície celular para troca de metabólitos. Tamate et al. (1974) observaram que o número de pregas basais foi reduzido após jejum de três dias em ovinos.

Na camada espinhosa, a maioria das células é oval, com núcleo de formato irregular rico em reentrâncias e com projeções citoplasmáticas unindo uma célula à outra por desmosomas. O espaço intercelular é reduzido se comparado ao espaço intercelular na camada basal e é preenchido por material

floculento. No citoplasma, ocorrem a presença de feixes de fibrilas (tonofibrilas) paralelamente dispostas na periferia da célula, poucas mitocôndrias e grânulos ovais elétron-densos e limitados por membrana, medindo aproximadamente 0,2 µm de diâmetro,. Na proximidade das reentrâncias nucleares, há a presença de RER contendo cisternas ricas em material granular fino (Lavker, Chalupa, Dickey, 1969; Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

A camada granulosa apresenta células dispostas paralelamente à superfície luminal e com espaços intercelulares ainda menores que os da camada espinhosa. Nessa camada, as células apresentam núcleos com sinais de degeneração e freqüentemente deslocados para a extremidade da célula e RER contendo material granular fino (proteína-RE). O citoplasma é moderadamente elétron-denso, pois contém tonofibrilas, grânulos de queratohialina, grânulos limitados por membrana e mitocôndrias (Lavker et al., 1969). Grânulos de queratohialina são observados na região perinuclear e são limitados por ribosomas. A periferia das células é rica em pequenos grânulos mucosos envoltos por membrana, grânulos mucosos maiores são observados próximos ao núcleo. Feixes filamentosos podem ser visualizados por todo o citoplasma. Grande número de mitocôndrias e ribosomas livres, complexos de Golgi e algumas gotículas de lípidos encontram-se espalhados por todo o citoplasma (Lavker & Maltoltsy, 1970; Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

A transição da camada granulosa para a camada córnea, formada por células queratinizadas, é abrupta. Durante os estágios iniciais de transformação da célula granular em célula queratinizada, os grânulos de queratohialina se agregam, formando uma grande massa e feixes filamentosos e pequenos grânulos mucosos se acumulam na periferia da célula. As cisternas do RER apresentam-se muito dilatadas e preenchidas por material granular fino (proteína-RE). A queratinização da célula granular é iniciada pela liberação de enzimas hidrolíticas oriundas de lisosomas. O aumento no número de lisosomas

está relacionado à degradação gradual do núcleo, dos ribosomas, das mitocôndrias, dos complexos de Golgi e dos grânulos mucosos. Além disso, ocorrem alterações marcantes na permeabilidade da membrana plasmática, fazendo com que quantidades significativas de conteúdo celular atravessem a membrana e se acumulem no espaço intercelular, formando uma massa amorfa. Os filamentos são deslocados para a periferia da célula e os grânulos de queratohialina tornam-se dispersos, misturando-se com a proteína-RE no centro da célula. Subseqüentemente, o complexo proteína-RE-queratohialina infiltra-se com o componente filamentosos, produzindo um conteúdo amorfofibroso. A perda de fluidos pela célula reduz o volume celular e condensa o material intracelular. A célula queratinizada formada apresenta membrana plasmática espessada, com interdigitações profundas e presença de canalículos intercelulares (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992). Ocasionalmente são observadas gotículas lipídicas e restos celulares espalhados pelo citoplasma da célula queratinizada (Lavker & Maltoltsy, 1970).

As células da camada basal estão unidas à membrana basal pelos hemidesmosomas, os quais apresentam uma distribuição irregular ao longo da base da célula. Filamentos finos partem da placa de cada hemidesmosoma na direção da membrana basal. Os tipos mais comum de junção entre células no epitélio ruminal são os desmosomas (mácula de adesão). Esses são menos numerosos e mais simples na camada basal, porém, mais complexos e abundantes nas camadas espinhosa e granulosa, podendo estar ausentes na camada córnea. Na transição entre as camadas basal e espinhosa, as células são unidas por desmosomas mais numerosos que os que unem as células da camada basal, reduzindo o espaço intercelular. Esses desmosomas da camada espinhosa são freqüentemente situados nas extremidades das projeções do citoplasma na membrana celular, formando pontes intercelulares. Na camada granulosa, os desmosomas são menos freqüentes que na camada espinhosa, aumentando o

espaço intercelular, mas esses se mantêm mais estreitos que os espaços intercelulares da camada basal. Tonofibrilas (citoqueratina) surgem dos desmosomas e se projetam para dentro das células. Imediatamente antes da transição da camada granulosa para a camada córnea, as tonofibrilas são perdidas e os desmosomas desaparecem. Apenas alguns desmosomas persistem na extremidade lateral da célula queratinizada (Steven & Marshall, 1970).

Pequenas áreas de fusão de membrana ocorrem apenas próximas à região dos desmosomas nas camadas basal e espinhosa. Nas primeiras camadas de células da granulosa, essas áreas de fusão tornam-se maiores e mais numerosas. Nas células da granulosa próximas à camada córnea, os processos de fusão de membranas aumentam e os espaços intercelulares são obliterados pela formação de junções muito estreitas denominadas zônulas de oclusão. Na transição da camada granulosa para a córnea, ocorre separação das membranas fundidas. Na camada córnea são observados espaços intercelulares, mas esses têm dimensões reduzidas suficientes para impedir a penetração de bactérias e outros microrganismos através do epitélio. As zônulas de oclusão podem ser danificadas por descamação da camada de queratina, eliminando a barreira entre o conteúdo ruminal e a membrana basal (Steven & Marshall, 1970).

### **2.1.2 Aspectos histológicos da epiderme no plano nasolabial, da *epicera* e do *perioplum* dos bovinos**

O tegumento de mamíferos é formado por epiderme e derme. A epiderme é a camada mais externa da pele e é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. A epiderme pode ser dividida em diferentes camadas, cujo número de células varia nas diferentes partes do corpo. A derme situa-se abaixo da epiderme e pode ser constituída por tecido

conjuntivo frouxo ou denso. Cascos e cornos de bovinos são estruturas derivadas da pele (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

### **2.1.2.1 Estrutura epidérmica no plano nasolabial**

No bovino, a pele das narinas é lisa, desprovida de pêlos e úmida, podendo ou não ser pigmentada. A pele da narina se estende ventralmente em direção à boca e forma o plano nasolabial (FIGURA 2) (Getty, 1981). A epiderme nessas regiões é espessa, altamente queratinizada e constituída pelas camadas basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea ou queratinizada (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

A camada basal é constituída por células cubóides ou prismáticas, as quais repousam sobre nítida membrana basal que separa a epiderme da derme. Essa camada apresenta intensa atividade mitótica, sendo responsável pela constante renovação da epiderme (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

A camada espinhosa é formada por células poligonais cubóides ou ligeiramente achatadas, de núcleo central com pequenas expansões citoplasmáticas que contêm tonofibrilas partindo de cada uma das células adjacentes. Essas expansões citoplasmáticas são mantidas unidas por desmosomas (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

A camada granulosa é caracterizada pela presença de células poligonais com núcleo central, nitidamente achatadas, em cujo citoplasma são observados grânulos grosseiros de queratohialina. Além desses grânulos, essas células secretam outros, envolvidos por membrana, de substância fosfolipídica associada a glicosaminoglicanas. Esses grânulos são expulsos das células e formam uma camada de substância intercelular que age vedando essa camada de células, impedindo a passagem de compostos entre elas, inclusive a água. As células da granulosa e também as da parte mais alta da camada espinhosa

apresentam uma camada protéica, presa à superfície interna da membrana celular, que confere grande resistência à membrana da célula (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

A camada lúcida é constituída por uma delgada camada homogênea de células achatadas, eosinófilas, cujos núcleos e organelas desapareceram. O citoplasma consiste em numerosos filamentos compactados e envolvidos por material elétron-denso. Ainda são observados desmosomas entre as células (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

A camada córnea, relativamente espessa, é constituída por várias camadas de células achatadas, mortas e sem núcleo. O citoplasma dessas células é preenchido por queratina (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

#### **2.1.2.2 Estrutura tegumentar dos cascos**

O órgão digital do ruminante é constituído pela epiderme, pela derme ou tecido conjuntivo subjacente, pela hipoderme e pelos ossos e estruturas associadas. A camada córnea do epitélio do casco é muito mais espessa que a camada córnea de outros tecidos, podendo-se observar a presença de queratinas mole e dura. Distúrbios no processo de queratinização são potencialmente capazes de afetar a dureza do casco (Baggott et al., 1988). Como a epiderme é avascular, as células epiteliais dependem do suprimento de oxigênio e de nutrientes oriundos da microvascularização da derme, que se difundem através da membrana basal.

Anatomicamente, o casco do bovino pode ser dividido em três regiões: parede, sola e bulbo (FIGURA 3). A parede do casco é formada por três camadas constituídas por células queratinizadas: extratos externo, médio e interno. Histologicamente existem três diferentes tipos de epidermes no casco: a do *perioplum*, a coronária e a laminar.

As células da camada basal do epitélio do *perioplum* produzem queratina mole e brilhante, que forma o extrato externo da parede e o bulbo, visíveis externamente. A região do *perioplum* é uma região de transição entre a pele do membro e o casco propriamente dito. Durante a diferenciação, as células do *perioplum* migram da região perióplica em direção à sola do casco (Andersson & Bergman, 1980; Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

As células basais da epiderme coronária localizam-se no sulco coronário, formando o extrato médio. A epiderme coronária não possui camada granulosa nem camada lúcida. Essas células também diferenciam-se no sentido próximodistal. O extrato médio é formado por queratina dura típica. Na camada córnea da epiderme coronária, são encontradas queratinas do tipo tubular e intertubular, as principais estruturas de sustentação da parede do casco. A queratina tubular é mais resistente que a intertubular (Hoblet & Weiss, 2001). Os túbulos estão orientados paralelamente à superfície externa do casco e suas células queratinizadas possuem disposição altamente ordenada. Os túbulos apresentam uma região central constituída por elementos frouxos (região medular) e uma córtex constituída por três zonas: a interna, com células queratinizadas compactadas em espiral ao redor da medula, a média, com células em espiral soltas e a camada externa, que é também formada por células compactadas em espiral. A queratina intertubular ocupa os espaços entre os túbulos de queratina (Andersson & Bergman, 1980; Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

As células basais da epiderme laminar localizam-se nas lâminas primárias presentes ao redor da superfície interna do casco, formadas pelo epitélio que se interdigita na derme laminar. As lâminas primárias são definidas como o conjunto da prega epitelial (papila epidérmica) e o conjuntivo adjacente (papila dérmica). A epiderme laminar nos bovinos é constituída apenas por lâminas primárias. O resultado da diferenciação dessas células-tronco é uma

queratina dura, que forma o extrato interno da parede e a sola do casco. A camada córnea da epiderme laminar no extrato interno da parede é composta por queratina não-tubular elaborada lentamente, em sentido perpendicular à queratina do estrato médio. Na região da sola do casco, essa camada córnea se forma em sentido próximo distal e é constituída por substâncias queratinizadas tubular e intertubular. As camadas mais superficiais da sola não se apresentam firmemente unidas e podem descamar (Andersson & Bergman, 1980; Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

As células na camada basal da epiderme do casco produzem dois tipos de proteína de queratina: proteínas filamentosas e proteínas associadas a filamentos. As proteínas associadas a filamentos são caracterizadas pelo seu alto conteúdo de cisteína. A estabilidade estrutural da queratina resulta da ligação de complexos queratina-proteína realizada possivelmente por pontes dissulfetos entre resíduos de cisteína. O material intercelular produzido pelas células na camada espinhosa da epiderme é constituído por glicoproteínas e complexo lipídico. A porção glicoprotéica age como instrumento de ligação entre as células em queratinização. A porção lipídica confere permeabilidade ao casco, permitindo a manutenção da hidratação da queratina em diversas condições ambientais (Hoblet & Weiss, 2001).

### **2.1.2.3 Estrutura epidérmica na *epicera***

Os cornos dos bovinos são constituídos por três elementos: processo cornual do osso frontal, a derme (tecido conjuntivo da derme típica da pele) e a epiderme, no sentido interior-exterior (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992). A epiderme possui uma espessa camada de queratina dura na forma tubular e intertubular. Tanto a queratina tubular como a intertubular originam-se das células da camada basal presentes na epiderme que se interdigita (papila

epidérmica) com as papilas dérmicas (derme). A proliferação das células basais do corno é lenta, o que explica o alongamento lento do corno bovino.

Na base do corno, a epiderme, denominada *epicera* (FIGURA 4), produz uma queratina mole similar à do *perioplum*. As células basais da *epicera* formam uma delgada camada externa de queratina, que se torna escamosa e sofre descamações, semelhantemente à do extrato externo dos cascos (Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992).

## **2.2 Regulação da proliferação e diferenciação das células queratinizadas**

Os tecidos epiteliais de revestimento estratificado do sistema digestivo e da epiderme do sistema tegumentar são renovados pela proliferação de células tronco. As células tronco são indiferenciadas e apresentam alta capacidade de divisão celular durante toda a vida do animal. A cada nova divisão uma nova célula a ser diferenciada (queratinizada) é gerada e outra célula-tronco emerge para manter a população de células germinativas (Alberts et al., 1994).

De acordo com Suter et al. (1997), nos epitélios estratificados, as células-tronco estão presentes na camada basal, em íntima associação com a membrana basal. Sugere-se que a regulação da divisão celular nos epitélios esteja relacionada aos processos reguladores da diferenciação celular. As células epiteliais em diferenciação expressam genes específicos de uma maneira bem regulada e bastante organizada. Mudanças seqüenciais no fenótipo celular podem ser observadas ao longo da diferenciação: estruturas de adesão celular, componentes do citoesqueleto e do envoltório cornificado e estrutura e organização da camada córnea.

Tanto as células epiteliais como os fibroblastos do tecido conjuntivo contribuem para a produção dos diferentes constituintes da membrana basal. A membrana basal é de extrema importância para a integridade da camada basal do

epitélio, pois ela atua na ancoragem e organização do citoesqueleto das células epiteliais. Uma interação altamente regulada entre os diferentes componentes protéicos da membrana basal e entre esses componentes protéicos e os receptores presentes nas células basais mantém o epitélio estratificado ancorado ao conjuntivo subjacente. Além disso, a membrana basal pode influenciar tanto a proliferação como a diferenciação das células epiteliais (Suter et al., 1997).

Na estrutura da membrana basal existem componentes protéicos de matriz extracelular: laminina 1, 5 e 6, colágeno tipos IV, V e VII (fibrilas de ancoragem), dentre outros. As proteínas da matriz extracelular fornecem suporte estrutural para a junção epitélio-conjuntivo e influenciam a proliferação e diferenciação das células epiteliais, por atuarem como receptores de vários fatores de crescimento. Os receptores da membrana basal podem transmitir sinais intracelulares às células epiteliais, influenciando o fenótipo celular (Suter et al., 1997). Sugere-se que a desintegração da membrana basal ou dano na sua ligação às células da camada basal do epitélio possam ser eventos iniciais na patogênese da laminite aguda em equinos (Pollitt, 1996). Qualquer condição adversa capaz de afetar a membrana basal pode afetar a integridade do epitélio.

As junções celulares, hemidesmosomas e desmosomas são constituídas por receptores que ligam a placa intracitoplasmática conectada ao citoesqueleto da célula a receptores extracelulares específicos. Tanto os hemidesmosomas, como os desmosomas, são junções de ancoragem estáveis que se associam a filamentos de queratina intracelular. Integrinas e caderinas são os possíveis receptores que mediam a adesão entre células e a adesão entre células e a membrana basal. Essas proteínas também são capazes de transmitir às células epiteliais estímulos de fatores reguladores do crescimento e diferenciação celular atuantes sobre os receptores presentes na membrana basal. Na epiderme, as integrinas estão presentes predominantemente nas células basais e exercem

papel importante na migração das células epiteliais para as camadas suprabasais, induzindo eventos relacionados à diferenciação (Suter et al., 1997).

Sinais de diferenciação incluem a expressão de diferentes tipos de queratina, síntese de proteínas precursoras do envoltório cornificado e suas enzimas associadas (transglutaminases) e expressão de diferentes moléculas de superfície, incluindo as moléculas de adesão. As queratinas são os principais componentes do citoesqueleto das células epiteliais, sendo constituídas por subunidades epitélio-específicas. Fatores que influenciam a diferenciação das células epiteliais podem atuar sobre a síntese de queratinas específicas (Hendry et al., 1997; Suter et al., 1997; Hendry et al., 2001).

À medida que as células alcançam a camada granulosa, elas param de sintetizar as queratinas e começam a produzir determinadas proteínas essenciais para o arranjo final e formação de macrofilamentos de queratina altamente resistentes. A filagrina, principal molécula sintetizada pelas células da granulosa, é produzida na forma de uma molécula precursora inativa, fosforilada e rica em histidina, denominada profilagrina. A diferenciação terminal dessa molécula é um processo altamente regulado, envolvendo desfosforilação e proteólise da profilagrina em filagrina. De uma maneira bastante específica, a filagrina forma ligações cruzadas transitórias com os filamentos de queratina, permitindo a formação de ligações permanentes por meio de pontes dissulfetos. Essa etapa é de extrema importância no processo de organização dos filamentos de queratina em grandes macrofilamentos resistentes aos processos de destruição celular vigentes na camada córnea (Suter et al., 1997).

O envoltório cornificado é a membrana mais externa das células epiteliais queratinizadas da camada córnea. Esse é constituído por ligações cruzadas de material protéico insolúvel. As células superiores da camada espinhosa e as da camada granulosa são as responsáveis pela produção de precursores do envoltório cornificado e das enzimas que participam na ligação

cruzada entre substratos, as transglutaminases. Tem sido demonstrado que uma grande variedade de proteínas atuam como substratos para as transglutaminases, estando envolvidas na formação do envoltório cornificado: lorícina, involucrina, cistatina A, tricoialina, entre outras (Suter et al., 1997).

A transição entre as camadas granulosa e córnea é caracterizada por uma acentuada destruição de organelas e macromoléculas celulares, resultando na formação de uma camada impermeável constituída por células queratinizadas unidas por material intercelular rico em lípidos insolúveis. Esses lípidos se dispõem em camadas paralelas, formando lamelas intercelulares. Na camada granulosa, é formada uma barreira lipídica constituída por glicolípides, esteróis livres e fosfolípideos; já na camada córnea, a barreira lipídica constitui-se principalmente de esfingolídios. Essa alteração na composição dos lípidos é mediada por lipases específicas e glicosidases que induzem a produção de componentes mais hidrofóbicos. Enzimas hidrolíticas, fosfatases ácidas e carboxipeptidases são as responsáveis pela descamação de células queratinizadas (Suter et al., 1997).

Considerando que o mecanismo de diferenciação final das células epiteliais envolve diversas alterações seqüenciais no fenótipo celular, sua regulação é, sem dúvida, bastante complexa. Em trabalhos *in vitro* têm sido mostrado que vários fatores podem influenciar a proliferação e diferenciação das células epiteliais, como: hormônios (hidrocortisona, insulina, prolactina, hormônios tireoidianos), fatores de crescimento (Fator de Crescimento Epidérmico, Fator de Transformação do Crescimento), micronutrientes (vitamina D<sub>3</sub>, ácido retinóico) e microambientes celulares (membrana basal). Fator de Crescimento Epidérmico, Insulin-like growth Factor, baixas concentrações de ácido retinóico (10<sup>-7</sup> a 10<sup>-10</sup> M), Fator de Crescimento de Queratinócito, entre outros, podem estimular a proliferação das células epiteliais. Entretanto, calonas de origens epidérmica, Fator de Transformação do

Crescimento- $\beta$ , vitamina D<sub>3</sub>, altas concentrações de ácido retinóico (10<sup>-6</sup> M) e butirato de sódio inibem a proliferação e/ou podem estimular a diferenciação celular (Staiano-Coico et al., 1990; Pollitt, 1996; Green, 1980 citado por Hendry et al., 1997; Suter et al., 1997).

Considerando que o butirato de sódio induz diferenciação final e formação do envoltório cornificado em células epiteliais humanas *in vitro*, Staiano-Coico et al. (1990) avaliaram a possibilidade de esse efeito ser mediado por mudanças na expressão de Fator de Transformação do Crescimento- $\alpha$  e do Fator de Transformação do Crescimento- $\beta$  em células epiteliais normais. Os autores observaram que butirato de sódio aumentou a transcrição do m-RNA para Fator de Transformação do Crescimento  $\beta$  nas células epiteliais não basais, levando à formação do envoltório cornificado. As células epiteliais basais, que são relativamente refratárias à formação do envoltório cornificado, não apresentaram qualquer aumento na transcrição de m-RNA para Fator de Transformação do Crescimento  $\beta$ , em resposta ao tratamento com butirato. O butirato não afetou os níveis de transcrição de m-RNA para Fator de Transformação do Crescimento  $\alpha$ . O butirato também reduziu em 50% o número de receptores para Fator de Crescimento Epidérmico nas células epiteliais, reduzindo a resposta celular a estímulos proliferativos. Por meio desses dados sugere-se que a ação indutora de diferenciação celular do butirato pode ser pelo menos parcialmente mediada pelo Fator de Transformação do Crescimento.

Gálfi et al. (1993) avaliaram a influência de componentes de matriz extracelular (colágenos tipo I e IV) e da suplementação do meio de cultura com diferentes hormônios (hidrocortisona, insulina e glucagon) e Na-n-butilato sobre a proliferação e diferenciação de células do epitélio ruminal de ovinos *in vitro*. Colágenos tipo I e IV estimularam proliferação celular, sendo o efeito estimulatório mais pronunciado em meio contendo colágeno tipo IV. Suplementação do meio de cultura com insulina e glucagon aumentou o

crescimento celular apenas em culturas contendo colágeno tipo I. Em ambas as culturas, a hidrocortisona estimulou o crescimento celular, enquanto butirato inibiu a proliferação celular. Sinais de diferenciação não foram observados nas células presas ao colágeno, no entanto; sinais de diferenciação foram observados nas células que se descamaram para o meio de cultura, mostrando que componentes da matriz extracelular presentes em tecidos conjuntivos ou na membrana basal podem modular o efeito de reguladores de crescimento e diferenciação celular.

Hendry et al. (1997) avaliaram o efeito da insulina (10-5000 ng/ml), do cortisol (10-5000 ng/ml), da prolactina (10-5000 ng/ml) e do Fator de Crescimento Epidérmico (10-200 ng/ml) sobre a queratinização e a proliferação de células do casco bovino *in vitro*. A insulina estimulou a síntese de queratina, medida pela incorporação de aminoácidos marcados com  $^{35}\text{S}$ , e a síntese de DNA, medida pela incorporação de [ $^3\text{H}$ ] metil timidina. O cortisol inibiu a síntese de queratina, enquanto a prolactina não afetou nem síntese proteica nem a proliferação celular. O Fator de Crescimento Epidérmico, um potente inibidor de queratinização em outros órgãos, estimulou a síntese proteica nas células do casco, mostrando que um mesmo fator regulador de diferenciação celular pode atuar de maneira diferente em tecidos distintos do corpo. Os autores evidenciaram que o processo de queratinização do casco de bovino está sob o controle de hormônios e de fatores de crescimento.

### **2.3 Efeito dos AGV sobre o crescimento da mucosa do trato gastrointestinal**

Por ocasião do nascimento, o bezerro apresenta os quatro compartimentos gástricos, tendo o rúmen e o retículo 30% do volume total e omaso e abomaso os 70% restantes. No animal adulto, o rúmen e o retículo perfazem mais de 80%, e o omaso e abomaso, menos de 20% (Getty, 1981).

O rúmen de bezerros recém-nascidos é afuncional, apresentando mucosa com papilas rudimentares e uma microbiota pobremente estabelecida (Warner, 1991). O tipo de dieta define a velocidade de desenvolvimento funcional do estômago. É sabido de longa data que o consumo de alimentos sólidos é o fator estimulador do desenvolvimento morfológico e metabólico da parede ruminal (Brownlee, 1956; Warner, 1991).

As papilas aumentam a área de superfície do rúmen disponível para absorção de AGV (Baldwin & Jesse, 1991; Warner, 1991; Greenwood et al., 1997). A habilidade do rúmen de absorver AGV foi baixa logo após o nascimento e não mudou significativamente nos seis primeiros meses de vida em animais que foram alimentados apenas com leite. Bezerros que receberam alimento sólido tiveram papilas ruminais alongadas e maior capacidade de absorver AGV que animais alimentados exclusivamente com dieta líquida (Sutton et al., 1963). O desenvolvimento da camada muscular do rúmen parece ser desencadeado pelo trabalho mecânico de digestão de alimentos sólidos (Nocek & Kesler, 1980; Nocek et al., 1984) enquanto os AGV, produtos da fermentação ruminal, seriam os desencadeadores do crescimento papilar e da capacidade de absorção (Flatt et al., 1958).

O desenvolvimento papilar aumenta a área de células epiteliais, sendo influenciado pela taxa mitótica das células, bem como pelo período transcorrido entre as mitoses e a morte celular (Sakata & Tamate 1978; Tamate & Feel, 1977). O número de camadas celulares do epitélio determina a capacidade metabólica e absorviva do órgão, sendo influenciado por efeitos dietéticos sobre as taxas de proliferação celular, diferenciação e descamação (Goodlad, 1981). O índice mitótico tem sido usado para expressar a atividade proliferativa do epitélio ruminal (Sakata & Tamate, 1974; Tamate et al., 1974; Sakata & Tamate, 1978; Tamate & Feel, 1977; Sakata & Tamate, 1979; Sakata et al., 1980; Goodlad, 1981; Gálfi et al., 1986; Resende Júnior, 1999; Alonso, 2002).

Tem sido sugerido que o efeito estimulatório dos AGV sobre o desenvolvimento papilar seria mediado por indução de maior fluxo sanguíneo (Sander et al., 1959; Hinders & Owen, 1965; Barnes, 1983), trabalho funcional de metabolismo dos AGV (Bergman, 1990), ou por maior suprimento de energia às células epiteliais (Tamate et al., 1974; Sakata & Yajima, 1984). Hamada (1975) sugeriu que a absorção de AGV ruminais pode causar uma leve reação inflamatória no tecido epitelial do rúmen, levando à proliferação celular.

A infusão de AGV em ratos com fístula ileal estimulou a proliferação celular tanto jejunal quanto cecal (Sakata, 1987). No mesmo experimento, os AGV inibiram a proliferação de células cecais *in vitro*. Butirato foi o maior inibidor do crescimento *in vitro* e o maior estimulador *in vivo*. O efeito inibitório dos AGV sobre a proliferação celular *in vitro* e o efeito estimulatório em segmentos proximais do trato digestivo em relação ao local de infusão *in vivo* sugerem que o efeito estimulatório dos AGV sobre o crescimento epitelial do trato digestivo envolve um mecanismo indireto, provavelmente por mediação humoral .

A infusão de uma mistura de AGV (acetato, 75; propionato, 35; butirato, 20 mM) no cólon proximal de ratos anestesiados estimulou o índice mitótico nesse local e em locais do trato digestivo localizados proximalmente, sem contato direto com a solução de AGV infundida. Entretanto, não foi detectado efeito da mistura de AGV sobre o índice mitótico nas regiões do duodeno, ceco, cólon distal e epiderme da orelha desses animais (Sakata & Engelhardt, 1983). A insensibilidade da epiderme da orelha aos AGV infundidos no cólon sugerem que a estimulação mitótica dos AGV está restrita a certos tecidos. A razão para essa especificidade não é conhecida.

A insulina e o glucagon são prováveis mediadores do crescimento epitelial no rúmen. Quando insulina mais glicose foram injetados na veia jugular externa de ovinos, houve maior proliferação de células epiteliais do rúmen,

comparado à infusão isolada de glicose (Sakata et al., 1980). Observou-se estímulo no crescimento das células epiteliais ruminais *in vitro* quando essas foram incubadas em meio contendo  $1,6 \times 10^{-9}$  M de insulina, independentemente da ação inibitória de ácido butírico presente no meio de cultura. Entretanto, quando as células foram incubadas em meio contendo  $3,0 \times 10^{-12}$  M de glucagon, observou-se proliferação celular apenas na ausência de butirato (Gálfi et al., 1993). Mediante esses resultados, infere-se que a insulina seja o mediador da estimulação mitótica causada pelos AGV *in vivo*.

Propionato e butirato parecem ser mais estimuladores do crescimento papilar em bezerros do que acetato (Sander et al., 1959; Vair et al., 1960; Tamate et al., 1962; Warner, 1991). Considerando-se que o mecanismo de ação se dê por efeito indireto sobre a secreção de insulina (Gálfi et al., 1991), butirato seria o maior estimulador do crescimento papilar, já que em ovinos, infusão sangüínea de menor quantidade de butirato foi requerida para desencadear a mesma resposta em insulina plasmática que propionato (Sano et al., 1995a, Sano et al., 1995b). No entanto, a ação direta do butirato sobre o epitélio ruminal e de outros tecidos é inibidora de crescimento (Gálfi et al., 1981; Neogrády et al., 1989; Gálfi et al., 1993) e indutora de queratinização (Staiano-Coico et al., 1990; Gálfi et al., 1993).

O perfil de variação na concentração ruminal dos AGV pode afetar a resposta em crescimento das células epiteliais ruminais. Infusões contínuas de butirato no rúmen não aumentaram o índice mitótico de células epiteliais em ovinos, enquanto infusões de curta duração da mesma quantidade de butirato levaram a aumento no índice mitótico (Sakata & Tamate, 1976, Sakata & Tamate, 1978). Pulsos de propionato no rúmen causaram aumento nos níveis de propionato periférico e nos níveis de insulina; entretanto, a infusão contínua de propionato resultou em concentração plasmática de insulina relativamente constante (Istasse et al., 1987). O fornecimento de concentrado uma, em vez de

quatro vezes ao dia a vacas não-lactantes, aumentou a concentração de insulina plasmática e o índice mitótico na camada basal do epitélio ruminal (Resende Júnior, 1999). No mesmo experimento, jejum de 24 a 72 horas induziu queda na insulina plasmática, aumento no pH ruminal, atrofia papilar e queda no número de células em mitose na camada basal do epitélio ruminal. Por esses dados, sugere-se que a quantidade de AGV produzida no rúmen pode não ser a única determinante da proliferação celular, mas também a taxa ou variação da taxa de produção de AGV.

#### **2.4 Efeito dos AGV sobre a morfologia das papilas ruminais**

O butirato parece resultar em hiperqueratose do epitélio ruminal e atrofia papilar (Gálfi et al., 1991; Gálfi et al., 1993), sinais patológicos freqüentemente relacionados a excesso de concentrados na dieta (Jensen et al., 1954; Jensen et al., 1958; Haskins et al., 1969; Weigand et al., 1975; McGavin & Morril, 1976; Landsverk, 1978; Nocek & Kesler, 1980; Goodlad, 1981; Gaebel et al., 1987; Greenwood et al., 1997; Coelho, 1999; Coimbra, 2002). A concentração de AGV no meio de cultura que inibiu 50% do crescimento das células epiteliais ruminais *in vitro*, comparado a controles, foi menor para butirato (0,28 mM) que para propionato (1,47 mM) e  $\beta$ -OH-butirato (>5 mM). Acetoacetato e acetato não tiveram efeito sobre o crescimento epitelial (Gálfi et al., 1991). Quando uma mistura de sais de butirato e propionato foi incorporada ao concentrado de bezerros recém-nascidos e foi fornecida por 39 dias, observaram-se hiperqueratose da mucosa ruminal, perda da camada de queratina em algumas regiões do rúmen e aglomeração de papilas (Gilliland et al., 1962).

Tamate & Kikuchi (1978) avaliaram a ultra-estrutura do epitélio ruminal de bovinos em confinamento recebendo dietas ricas em concentrado, e observaram a presença de feixes de tonofibrilas na camada basal, ausência de

RER e ausência de ribosomas agrupados. Pelo aumento observado na quantidade de feixes de tonofibrilas nas células da camada espinhosa, sugere-se que a taxa de diferenciação pós-mitótica foi acelerada nesse tipo de dieta, pois essas estruturas são predominantemente observadas na camada granulosa do epitélio. Pela retenção de núcleo e presença de rede fibrosa na camada córnea, alterações que caracterizam a paraqueratose, inferem-se alterações nas atividades das enzimas lisossômicas. O aumento no número de pregas basais nas células da camada basal indicou que a ingestão de concentrados estimulou o aumento no metabolismo celular da camada basal. Os autores concluíram que as alterações no epitélio com paraqueratose podem ser devidas à síntese precoce de queratina, possivelmente decorrente da ação queratinizante de butirato (Staiano-Coico et al., 1990; Gálfi et al., 1993).

Kutas et al. (1983) observaram menor incidência de aglomeração e crescimento anormal de papilas em ovinos suplementados com monensina. Os autores concluíram que o efeito positivo da monensina sobre a morfologia papilar pode estar associado à alteração no perfil de fermentação ruminal, uma vez que os animais tratados com monensina apresentaram concentrações de butirato inferiores aos animais não-tratados.

Adição de butirato de sódio (5 mM/l) a uma cultura de células epiteliais do rúmen causou duplicação do conteúdo protéico e aumento a incorporação de <sup>14</sup>C-glicina pelas células epiteliais, evidenciando que a queratinização foi estimulada. Também foram observados aumento da formação e maior descamação de células queratinizadas no meio de cultivo, semelhantemente ao que ocorre na camada córnea do epitélio. Nas culturas tratadas com butirato, também foram observadas maiores frequências de alterações ultra-estruturais típicas do processo de queratinização, como: aumento quantitativo de feixes filamentosos, formação de grânulos semelhantes aos de queratohialina, degeneração do núcleo e de certas organelas citoplasmáticas e espessamento da

membrana celular. Ao contrário, a adição de D(-) lactato (5 mM/L) não exerceu influência mensurável sobre a queratinização. Com esses dados sugere-se que o butirato exerce papel importante na indução de alterações patológicas no epitélio ruminal, freqüentemente observadas em animais submetidos a dietas ricas em concentrado, e que é pouco provável que o lactato exerça alguma função direta sobre a morfologia do epitélio ruminal (Gálfi et al., 1983).

Entretanto, alguns autores têm observado o acúmulo de ácido láctico no rúmen em casos de indução experimental de acidose aguda por superalimentação com grãos de cereais de alta taxa de fermentação (Harmon et al., 1983; Harmon et al., 1985). Ahrens (1967) induziu sobrecarga alimentar em dois novilhos fistulados fornecendo 12 Kg de trigo triturado *ad libitum* e 16 Kg via fístula ruminal. O autor observou aumento da concentração de lactato ruminal e diminuição no pH do rúmen. As avaliações microscópicas das papilas ruminais revelaram perda da camada de queratina, vacuolização e ruptura das células epiteliais, formação de microvesículas, acompanhadas por infiltrado de neutrófilos. As alterações epiteliais foram reproduzidas pela adição de solução isotônica de ácido láctico no rúmen vazio.

## **2.5 Relação entre queratinização e distúrbios nos membros locomotores**

Alterações histopatológicas foram observadas nos estágios iniciais da laminite aguda em eqüinos, evidenciando defeitos de queratinização no casco e também nas epidermes perióplica e da castanha de eqüinos (Obel, 1948). Um fator predisponente para a incidência de alterações nos locomotores de bovinos pode ser a produção de queratina de baixa qualidade nos cascos. Distúrbios microscópicos de queratinização são observados em bovinos com distúrbios nos locomotores (Nilsson, 1963; Andersson & Bergman, 1980; Ossent et al., 1997).

Os eventos fisiopatológicos que induzem a produção de queratina de baixa qualidade ainda não são bem entendidos. Contudo, o que tem sido mais aceito é a possibilidade de múltiplos fatores, atuando isoladamente ou em conjunto, afetarem a habilidade da célula epitelial de sintetizar proteínas de queratina e substância intercelular. O aumento na taxa de diferenciação celular pode resultar em queratinização incompleta ou prematura das células epiteliais (disqueratose), resultando em produção de queratina de qualidade inferior (Budras et al., 1996). A duração do ciclo celular no epitélio ruminal de ovinos foi reduzida de 24 para 17 horas, quando os animais foram mudados de uma dieta com 25% de grão de cevada para uma dieta com 100% de cevada (Goodlad, 1981). O tempo de renovação do epitélio foi em torno de 10 dias com a dieta rica em grãos e 16 dias na dieta rica em forragem.

Processos inflamatórios na derme ou sistêmicos, traumas localizados em torno das células-tronco ou da membrana basal ou deficiência de nutrientes (zinco, biotina, enxofre ou cisteína) também podem atuar negativamente sobre o processo de queratinização. A resposta das células epiteliais a agressões é não-específica e pode resultar na produção de queratina de baixa qualidade. A queratina de baixa qualidade pode ser macia e, portanto, mais predisposta a danos físicos ou desintegração (Hoblet & Weiss, 2001). Distúrbios de queratinização podem atuar como fator predisponente de problemas de casco em bovinos.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Local de condução do experimento**

Este experimento foi conduzido no Setor de Bovinocultura de Leite do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O período experimental de coleta de dados foi de março a outubro de 2000. Os animais foram abrigados desde o nascimento até 89 dias de idade em bezerreiros individuais suspensos com piso ripado (FIGURA 5).

### **3.2 Animais e alimentação no período experimental de coleta de dados**

Foram utilizados dezessete bezerros da raça Holandesa, oriundos de rebanhos diversos e transportados para o local do experimento após a ingestão de colostro e o umbigo tratado. Ao longo de todo o período experimental, os animais foram alimentados diariamente com quatro litros de leite integral fornecido em duas alimentações às 7 e às 19 horas e com acesso contínuo a água. Os animais não tiveram acesso a alimento sólido, visando a inibir o desenvolvimento mecanicamente estimulável do estômago aglandular. Foi assumido que qualquer alteração morfológica observada no rúmen foi decorrente dos tratamentos.

### **3.3 Implantação cirúrgica de catéteres no rúmen**

Aos 45 dias de vida, todos os animais tiveram catéteres implantados cirurgicamente no rúmen (FIGURA 6). Foi realizada tricotomia ampla da região da fossa paralombar esquerda, seguida por anti-sepsia com iodo Povidine. Os animais foram sedados com Cloridrato de Xilasina (Rompun<sup>®</sup>) na dose de 0,1

ml/kg de peso vivo, posicionados em mesa cirúrgica em decúbito lateral direito e receberam anestesia local infiltrativa (Lidocaína 2%).em “L” invertido.

Após nova anti-sepsia, foi realizada uma laparotomia pela fossa paralombar esquerda com uma incisão de 10 cm de extensão, iniciando-se aproximadamente 15 cm ventral às apófises transversas das vértebras lombares e 5 cm caudal a última costela. Em seguida, procedeu-se à localização e exteriorização do saco dorsal do rúmen, onde foi feita uma sutura em bolsa de tabaco nas camadas sero-musculares, utilizando-se fio cirúrgico Prolene 0.

Foi realizada uma pequena incisão na pele próxima à tuberosidade coxal do íleo, por onde foi introduzida uma sonda de gastrostomia humana (Ross Flexiflo 20 French, Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, SP). A sonda percorreu o tecido subcutâneo em direção ventral até cerca de 4 cm dorso-caudalmente à incisão, onde a mesma foi introduzida na cavidade abdominal por meio de incisão dos músculos da parede abdominal lateral. Em seguida, uma incisão puntiforme foi feita no centro da sutura em bolsa de tabaco por onde foi introduzida a sonda, tomando-se o cuidado para que não ocorresse queda de conteúdo estomacal na cavidade abdominal. O balão na extremidade da sonda foi inflado com 15 ml de solução salina (FIGURA 7). Em seguida, executou-se a ligadura da sutura em bolsa de tabaco.

Para melhor fixação do rúmen à parede da cavidade abdominal, foram empregados quatro pontos simples separados em torno da inserção da sonda, realizando-se a ruminopexia. A cavidade abdominal foi, em seguida, suturada em três planos de sutura, empregando-se fio cirúrgico Categut 1 nos planos musculares e fio de nylon monofilamentado n°1 para a sutura de pele. A base da sonda que foi exteriorizada próxima à tuberosidade coxal do íleo ficou voltada cranialmente e foi fixada à pele por meio de pontos simples com fio de nylon monofilamentado n°1.

Após a cirurgia, foi administrada Penicilina Benzatina na dose de 22.000 UI/kg de peso vivo, por via intramuscular, com intervalo de 48 horas entre aplicações, perfazendo um total de três aplicações. A sutura da pele foi retirada 14 dias após a cirurgia.

### **3.4 Tratamentos experimentais**

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado. Aos 52 dias de idade (sétimo dia pós-cirúrgico), os animais foram aleatoriamente alocados a um de quatro tratamentos por 37 dias: Infusão de butirato no rúmen (B, quatro animais), infusão de lactato no rúmen (L, cinco animais), infusão de propionato no rúmen (P, quatro animais) ou infusão de salina no rúmen (S, quatro animais). A infusão de salina foi utilizada como tratamento-controle.

Uma hora após o aleitamento da manhã, os animais receberam diariamente infusões intraruminais com 500 ml de salina (cloreto de sódio 0,9%) ou o mesmo volume de soluções contendo propionato (Ácido Propiônico 99%, Farmalabor Comercial Ltda, São Paulo, SP), lactato (Ácido láctico 85% Alimentício, Farmalabor Comercial Ltda, São Paulo, SP) ou butirato (Ácido butírico 99%, Farmalabor Comercial Ltda, São Paulo, SP). Uma hora após o aleitamento da tarde, o mesmo volume de solução foi novamente infundido em todos os animais. O pH das soluções foi ajustado para 6,1 com Hidróxido de Sódio PA Chemo (Alquimia Comércio de Materiais para Laboratórios Ltda., Campinas, SP). A quantidade diária infundida de propionato e butirato foi 0,0744 moles/kg de peso metabólico (peso vivo<sup>0,75</sup>) e a quantidade de lactato foi 0,0639 moles/kg de peso metabólico. A cada três dias, os animais foram pesados e a quantidade infundida, ajustada para a variação no peso vivo.

### 3.5 Amostras de sangue e dosagem de insulina sorológica

Amostras sanguíneas para dosagem de insulina sorológica foram obtidas no 22º dia de aplicação dos tratamentos nos tempos 0, 90, 180 e 360 minutos relativamente à infusão diária da manhã. As amostras foram coletadas na veia jugular externa com tubos vacuntainer 13 x 75 mm, com capacidade para 5 ml (Becton Dickinson, Curitiba, PR). Após a coleta, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente três horas. As amostras foram centrifugadas a 1.500 g por cinco minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi congelado a -20º C, para posterior análise de insulina.

A insulina sorológica foi dosada por radioimunoensaio em fase sólida pelo procedimento do kit para análise de insulina Coat-A Count (DPC Medlab Produtos Médico-Hospitalares Ltda, São Paulo, SP), modificado (Vaughn, Grummer, Bertics, 1993). Uma seqüência de padrões contendo quantidades conhecidas de insulina não marcada foi preparada: 0, 2,6, 9,3, 26,6, 54,0, 112,0 e 200 µUI/ml. Os padrões de insulina foram divididos em alíquotas e congelados para serem utilizados em dois ensaios de dosagem de insulina em dias distintos. Os padrões e as amostras de soro de cada animal em cada tempo (300 µl) foram inseridos em duplicata em tubos de polipropileno revestidos internamente com anticorpos anti-insulina. Foi adicionado 1 ml de insulina iodada (<sup>125</sup>I) em todos os tubos. Os tubos foram, em seguida, incubados por 22 horas em temperatura ambiente. A porcentagem de ligação entre a insulina das amostras e os anticorpos presentes na parede do tubo foi mensurada em um contador de raios gama (Gamma Cord Brand-AMES, São Paulo, SP).

Foram necessários dois ensaios para a determinação da insulina em todas as amostras de soro. As amostras mensuradas em cada ensaio foram escolhidas aleatoriamente. A variação na concentração de insulina em uma amostra escolhida aleatoriamente e analisada nos dois ensaios foi 56,6%. A variação

média entre as duas repetições de cada amostra de soro analisadas em um mesmo ensaio foi 1,5% no ensaio 1 e 2,6% no ensaio 2. O  $r^2$  das regressões traçadas com os padrões foi superior a 0,98 em ambos os ensaios. Devido a grande variação na concentração de insulina entre os dois ensaios e a baixa variação média intra-ensaio, foi realizado um ajuste nos valores de insulina do ensaio 2, aplicando-se um fator de correção igual a 57%.

### **3.6 Dados morfológicos**

Aos 89 dias de vida, uma hora após a primeira infusão, os animais foram pesados e sacrificados *in extremis*. As seguintes variáveis morfológicas foram avaliadas: peso do rumino-retículo, do omaso e do abomaso; peso de mucosa e do restante da parede ruminal; número de papilas por  $\text{cm}^2$  de mucosa ruminal; altura e área das papilas ruminais; áreas de epitélio total e de queratina nos epitélios do rúmen e do plano nasolabial; índice mitótico das células da camada basal nos epitélios queratinizados do rúmen, do plano nasolabial, da *epicera* e do *perioplum* e características histológicas e ultra-estruturais do epitélio ruminal.

#### **3.6.1 Macroscopia do rúmen**

Os animais foram eviscerados, imediatamente após o abate, e os compartimentos do estômago foram isolados: rumino-retículo, omaso e abomaso. Após limpeza e remoção do excesso de tecido conjuntivo circundante, os órgãos foram abertos, esvaziados, lavados em água corrente e pesados em balança de precisão.

Amostras de aproximadamente  $3 \text{ cm}^2$  foram obtidas das paredes do recesso e do saco cranial do rúmen. Essas amostras foram imediatamente colocadas em frascos contendo solução de tampão fosfato (PBS = 0,79 g de

NaCl; 0,223 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,0524 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>O qsp 100 ml), 0,1 M, pH 7,4 e mantidas por três dias em geladeira até a realização das mensurações macroscópicas da parede. O número de papilas por cm<sup>2</sup> de mucosa ruminal foi avaliado nas duas regiões do rúmen. Em cada região do rúmen, um marcador de metal foi utilizado para delimitar três áreas aleatórias de mucosa com área de 1 cm<sup>2</sup>. A contagem de papilas em cada área delimitada foi realizada com uma lupa estereoscópica em aumento 6 X. O número de papilas contabilizadas por animal foi, em média, 268,9 ± 189,7 no recesso e 369,7 ± 107,5 no saco cranial (FIGURA 8).

O peso de mucosa e dos demais tecidos da parede ruminal foi determinado em fragmentos circulares com 1 cm de diâmetro obtidos das amostras das paredes do recesso e do saco cranial mantidas em PBS e resfriadas por três dias. Para a obtenção dos fragmentos, foi utilizado um cortador circular metálico com 1 cm de diâmetro. Em cada fragmento, a mucosa foi separada manualmente dos demais componentes da parede ruminal. Os fragmentos de mucosa e dos demais tecidos foram pesados após secagem com papel absorvente.

### **3.6.2 Microscopia óptica das papilas ruminais, da epiderme do plano nasolabial, da *epicera* e do *perioplum***

Para avaliação histológica das papilas, foram coletados fragmentos de parede no saco cranial, no recesso e no saco cego caudo-ventral do rúmen. Essas amostras foram fixadas por 12 horas em líquido de Bouin (Luna, 1968). Foram também obtidos fragmentos da epiderme do plano nasolabial, da *epicera* direita, do *perioplum* do terceiro dedo do membro dianteiro direito e do quarto dedo do traseiro direito. As amostras das epidermes foram fixadas em formalina a 10% por 24 horas e mantidas em álcool etílico a 70% até serem processadas.

Todo o material fixado foi desidratado em série crescente de álcool etílico, diafanizado em xilol, infiltrado e incluído em parafina histológica. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo manual (Micrótomo Rotativo 781, Ancap Equipamentos Eletro-Eletrônicos Ltda, São Paulo, SP), obtendo-se secções de 7 µm de espessura. Para análise morfométrica da altura e área das papilas ruminais e determinação do índice mitótico das células da camada basal dos epitélios do rúmen, do plano nasolabial, da *epicera* e do *perioplum*, as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H.E), segundo Luna (1968) (FIGURAS 9 a 13). Para mensurações das áreas de epitélio total e de queratina nos epitélios do rúmen e do plano nasolabial, os cortes foram corados com Tricrômico de Masson (Luna, 1968) (FIGURAS 14, 15, 18, 19, 20 e 22).

A avaliação histológica foi baseada nos exames histológicos realizados nas regiões do saco cranial, recesso e saco cego caudo-ventral. O exame histológico constou de uma avaliação de todo corte histológico presente na lâmina de cada animal por tratamento nas diferentes regiões do rúmen (quatro lâminas para infusão de butirato; cinco lâminas para infusão de lactato; quatro lâminas para infusão de propionato; quatro lâminas para infusão de salina em cada região do rúmen). O epitélio ruminal foi caracterizado de acordo com Coelho (1999), porém, com algumas modificações. Foi utilizada a seguinte classificação: normal, desproporção entre as camadas com formação de vacúolos, desproporção entre as camadas com formação de vacúolos e infiltrado inflamatório polimorfonuclear, desproporção entre as camadas com intensa formação de vacúolos e infiltrado inflamatório polimorfonuclear, desproporção entre as camadas com intensa formação de vacúolos, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e áreas de erosão. As alterações histológicas no epitélio ruminal foram avaliadas apenas quanto à porcentagem de alterações por tratamento.

A altura e a área das papilas ruminais foram mensuradas com o software KS300 contido em um analisador de imagens (Kontron Elektronik/Carl Zeiss, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP). As imagens de cada corte foram captadas por uma microcâmara (JVC TK-1270/RGB, JVC do Brasil, Zona Franca de Manaus, AM) para posterior digitalização em aumentos de 4X ou 10X, dependendo do tamanho da papila. A altura de cada papila em  $\mu\text{m}$  foi definida como sendo a linha reta traçada da base ao ápice da papila. Todas as papilas presentes em dois cortes histológicos de cada região do rúmen de cada animal foram mensuradas. Nas mesmas papilas onde foi mensurada a altura, também foi mensurada a área papilar por delimitação computadorizada da papila. O número de papilas mensuradas por animal foi, em média,  $27,4 \pm 8,6$  no saco cranial,  $25,0 \pm 15,4$  no recesso e  $26,2 \pm 12,9$  no saco cego caudo-ventral. As áreas de epitélio total e de queratina no epitélio das diferentes regiões do rúmen e na epiderme do plano nasolabial também foram geradas a partir das imagens obtidas pelo computador. Esse procedimento foi executado em apenas um corte histológico por animal. O número de áreas mensuradas de epitélio total e de queratina por animal foi, em média,  $13,6 \pm 2,4$  no saco cranial,  $11,9 \pm 2,2$  no recesso,  $14,9 \pm 6,9$  no saco cego caudo-ventral e  $18,0 \pm 5,6$  no plano nasolabial. A metodologia empregada para captar imagens e definir estratégias morfométricas foi descrita por Caliani (1997).

Para determinação do índice mitótico, utilizou-se microscópio óptico (Jenamed-Carl Zeiss Jena, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP), em aumento de 400X. Nos dois cortes histológicos de cada região do rúmen e do plano nasolabial e no corte de *epicera* e do *perioplum* dianteiro e traseiro, foram contados todos os núcleos das células da camada basal do epitélio e todas as células com núcleo apresentando figuras mitóticas. O índice mitótico (IM) foi calculado dividindo-se o número de núcleos com figuras mitóticas pelo total de núcleos contados. Dois avaliadores independentes executaram as contagens e o

IM de cada animal foi a média dessas avaliações. O número médio de núcleos contados em cada região anatômica foi:  $12.111,2 \pm 3.975,4$  no saco cranial do rúmen,  $3.969,5 \pm 2.273,8$  no recesso do rúmen,  $4.177,9 \pm 1.919,5$  no saco cego caudo-ventral,  $3.906,3 \pm 1.305,0$  no plano nasolabial,  $3.351,7 \pm 737,7$  na *epicera*,  $5.869,1 \pm 1.705,9$  no *perioplum* dianteiro e  $5.622,0 \pm 2.739,3$  no *perioplum* traseiro.

### **3.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão do epitélio ruminal**

Amostras independentes da parede do recesso e saco-cego caudo-ventral do rúmen foram obtidas para avaliar características ultra-estruturais do epitélio em microscopia eletrônica de transmissão. O material foi processado de acordo com Camargos & Neto (1995). Os fragmentos ruminais foram submetidos à fixação primária com glutaraldeído a 2,5% (MERCK S.A Indústrias Químicas, Belo Horizonte, MG) em tampão fosfato 0,1 M (1:1,  $\text{NaH}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  :  $\text{NaH}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), pH 7,4, em temperatura de 4°C. Após 60 minutos de fixação, o material foi cortado em fragmentos de aproximadamente 1 mm, permanecendo no fixador por mais 8 horas. Após a fixação, o material foi mantido em solução-tampão-fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 4°C sem glutaraldeído até a fixação secundária.

Baseado no exame histológico, foi realizada a seleção de uma amostra representativa de cada tratamento nas regiões do recesso e saco cego caudo-ventral para avaliação ultra-estrutural. As amostras selecionadas pré-fixadas foram lavadas em tampão-fosfato 0,1 M, pH 7,4, por três vezes, antes de se proceder à fixação secundária com Tetróxido de Ósmio 1% (MERCK S. A Indústrias Químicas, Belo Horizonte, MG) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por duas horas à temperatura ambiente. Após a fixação secundária, os fragmentos foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de

álcool etílico (50%, 70%, 95% e 100%), seguido por duas passagens em acetona PA (MERCK S.A Indústrias Químicas, Belo Horizonte, MG). Em seguida, os fragmentos foram pré-infiltrados em solução de resina Epon-acetona na proporção de 2:1 (Polybed 812, Polysciences Inc., Warring, PA, EUA) em temperatura ambiente por uma noite. O material foi posteriormente infiltrado em resina plena à base de Epon (Polybed 812, Polysciences Inc., Warring, PA, EUA) sem polimerizador, por duas horas à temperatura de 45°C. Em seguida, procedeu-se à inclusão em resina plena com polimerizador (DMP-30, Polysciences Inc., Warring, PA, EUA), em moldes de plástico, por uma hora em estufa a 40°C e, posteriormente, por mais quatro dias em estufa a 60°C.

Os blocos foram manualmente preparados para microtomia e, em seguida, cortados em ultramicrotomo automático com navalhas de vidro (Sorvall MT-2, Lodan Comércio e Representações Ltda, São Paulo, SP). Os cortes semifinos (150 nm de espessura) foram corados com Solução de Azul de Toluidina e Borato de Sódio (Luna, 1968) e observados ao microscópio óptico para orientação e seleção das áreas a serem estudadas. Após a seleção das áreas desejadas, os blocos foram microtomizados com navalhas de diamante em cortes ultrafinos (90 nm de espessura). Esses foram duplamente contrastados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo (Camargos & Neto, 1995).

Para estudo ultra-estrutural e obtenção de micrografias eletrônicas, utilizou-se o microscópio eletrônico de transmissão (EM.10 Zeiss, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP). As micrografias eletrônicas foram obtidas em filme fotográfico PSD Lito-Ortocromático (Foto Atacado Ltda, Belo Horizonte, MG) e reproduzidas em papel fotográfico Ilford Multigrade (Foto Atacado Ltda, Belo Horizonte, MG).

### 3.7 Análises estatísticas

Os dados morfológicos foram analisados pelo procedimento GLM do pacote estatístico SAS (1985), utilizando o seguinte modelo:

$$Y_i = \mu + T_i + e_i$$

Em que:

$\mu$  = média geral

$T_i$  = efeito de tratamento (i = B, L, P e S)

$e_i$  = resíduo assumido identicamente e aleatoriamente distribuído em uma distribuição normal com média  $\mu$  e variância  $\sigma^2$ .

A concentração de insulina sorológica ao longo do tempo foi analisada pelo procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (Little et al. 1996) utilizando o seguinte modelo:

$$Y_i = \mu + T_i + P_j + T_i * P_j + e_{ij}$$

Em que:

$\mu$  = média geral

$T_i$  = efeito de tratamento (i = B, L, P e S)

$P_j$  = efeito de tempo de amostragem (j = 0, 90, 180, 360)

$T_i * P_j$  = interação entre tratamento e tempo de amostragem

$e_{ij}$  = resíduo.

O quadrado médio do efeito de bezerro dentro de tratamento foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de tratamento.

Em todas as análises descritas acima, foram testados três contrastes ortogonais com um grau de liberdade: Butirato *versus* Salina, Lactato *versus* Salina e Propionato *versus* Salina.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os AGV induziram aumento, proporcionalmente maior no peso do rumino-retículo que no peso do omaso, sendo butirato aparentemente mais estimulador da massa do estômago aglandular que propionato e lactato (TABELA 1). Nesses animais, não-amamentados *ad libitum* e abatidos aos 89 dias de idade, as infusões de AGV induziram uma relação intermediária entre os pesos do rumino-retículo e os pesos do omaso e abomaso (TABELA 1), comparativamente à observada para bezerros abatidos com 30 ou 60 dias de idade e que tiveram acesso contínuo e irrestrito a alimentos concentrados do nascimento à desmama aos 30 dias (Coelho, 1999). A proporção de estômago aglandular nos animais infundidos com salina (TABELA 1) foi similar à de animais em torno da desmama (Coelho, 1999). Animais com 90 dias de idade tiveram 72% de massa do rumino-retículo e 15% de massa abomasal proporcionalmente à massa total do estômago (Coelho, 1999). A infusão de AGV neste experimento foi capaz de induzir diminuição do peso estomacal comparativamente menor que a observada em animais de mesma idade alimentados convencionalmente.

**TABELA 1:** Peso dos compartimentos que compõem o estômago de bezerros mantidos em dieta exclusivamente líquida e recebendo infusões intra-ruminais de butirato (B), lactato (L), propionato (P) ou salina (S).

	<b>B</b>	<b>L</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>EPM<sup>1</sup></b>	<b>P Trat<sup>2</sup></b>	<b>B vs S<sup>3</sup></b>	<b>L vs S</b>	<b>P vs S</b>
<b>Peso (gramas)</b>									
Rumino-retículo	718	599	642	419	43	<0,01	<0,001	0,01	<0,01
Omaso	154	109	118	93	10	<0,01	0,001	0,29	0,12
Abomaso	279	303	255	278	18	0,33	0,98	0,33	0,40
Estômago total	1150	1010	1015	791	63	<0,05	<0,01	0,03	0,03
<b>% do peso vivo</b>									
Rumino-retículo	1,402	0,974	1,278	0,796	0,052	<0,001	<0,001	0,03	<0,001
Omaso	0,297	0,176	0,234	0,179	0,010	<0,001	<0,001	0,85	<0,01
Abomaso	0,546	0,491	0,511	0,530	0,023	0,35	0,63	0,23	0,57
Estômago total	2,245	1,642	2,023	1,505	0,062	<0,001	<0,001	0,14	<0,001
<b>% do estômago</b>									
Rumino-retículo	62,4	59,3	63,0	52,7	1,3	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001
Omaso	13,3	10,8	11,7	12,0	0,6	0,08	0,17	0,19	0,76
Abomaso	24,3	29,9	25,3	35,3	1,0	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001

<sup>1</sup> Erro-adrão da média. <sup>2</sup> Probabilidade para efeito de tratamento. <sup>3</sup> Probabilidade para os contrastes ortogonais, butirato *versus* salina (B vs S); lactato *versus* salina (L vs S) e propionato *versus* salina (P vs S).

O aumento no peso do estômago aglandular não foi dependente do trabalho mecânico de digestão, desde que os animais foram mantidos em dieta líquida durante todo o período experimental. Rompala et al. (1990) observaram que material inerte presente no rúmen não induziu hipertrofia do órgão, enquanto material inerte passando por todo o trato digestivo foi efetivo. O efeito positivo da ingestão de alimentos sólidos sobre o crescimento ruminal de bezerros (Warner, 1991) pode ser mais dependente dos produtos finais da

fermentação e de outros fatores humorais que do estímulo à motilidade do órgão. Coelho (1999) observou que a adição de feno à dieta de bezerros em aleitamento, alimentados exclusivamente com concentrados, não afetou a anatomia estomacal. O trabalho mecânico de digestão ruminal pode não ser o fator majoritário para o desenvolvimento anatômico do estômago aglandular.

Propionato e butirato induziram aumento na massa do omaso em relação ao tratamento-controle (TABELA 1). O fato de muito pouco AGV chegar ao abomaso (Barcroft et al., 1944) e de não ter sido observado efeito de tratamento sobre a massa do estômago glandular (TABELA 1) possivelmente indica que a resposta em peso estomacal ocorreu apenas em compartimentos do órgão onde houve absorção de AGV. Pode ser que a absorção e metabolização de AGV pela parede do omaso tenham sido tão participativas no metabolismo dos AGV produzidos no rúmen quanto o metabolismo pelo epitélio ruminal, desde que cerca de 50% do *clearance* dos AGV produzidos no rumino-retículo de ruminantes adultos ocorram por passagem com a fase fluida ruminal (Peters et al., 1990; Resende Junior, 2003). Excesso de AGV na digesta abomasal pode causar hipomotilidade do órgão (Svendsen, 1969; Bolton et al., 1976). Atuação sobre a morfologia omasal pode ser tão efetiva no controle de distúrbios digestivos decorrentes da produção e acúmulo excessivo de AGV no rúmen (Bueno et al., 1972) quanto à manipulação da capacidade de absorção da parede ruminal por atuação sobre a morfologia papilar (Dirksen et al., 1984). Não foram encontrados dados publicados sobre metabolismo de AGV pela parede do omaso e tentativas de manipulação da capacidade de absorção daquele órgão.

A infusão de AGV aumentou o peso e a proporção de epitélio e conjuntivo subepitelial na parede do rúmen (TABELA 2). Butirato teve efeito significativo sobre a mucosa do saco cranial, enquanto os outros AGV aumentaram apenas numericamente a massa de mucosa ruminal, sem, no entanto, ter havido poder estatístico para detectar diferenças significativas

( $P > 0,29$ ). A mucosa foi proporcionalmente maior integrante da parede ruminal no saco cranial do que no recesso do rúmen. Assumindo que a média na proporção de mucosa nos dois fragmentos ruminais seja representativa da porcentagem de mucosa na parede do rúmen, foi estimado que a massa de mucosa ruminal, calculada por multiplicação da porcentagem de mucosa (TABELA 2) pelo peso do rúmen (TABELA 1), foi três vezes superior ao controle no tratamento B e duas vezes superior nos tratamentos L e P.

**TABELA 2:** Peso de fragmentos circulares de mucosa com 1 cm de diâmetro retirados nas regiões do saco cranial e recesso do rúmen de bezerros mantidos em dieta exclusivamente líquida e recebendo infusões intra-ruminais de butirato (B), lactato (L), propionato (P) ou salina (S).

	B	L	P	S	EPM <sup>1</sup>	P Trat <sup>2</sup>	B vs S <sup>3</sup>	L vs S	P vs S
<b>Peso de mucosa (gramas)</b>									
Saco Cranial	0,46	0,22	0,30	0,20	0,08	0,17	0,05	0,80	0,41
Recesso	0,21	0,15	0,22	0,11	0,06	0,64	0,33	0,67	0,29
<b>Mucosa (% da parede)</b>									
Saco Cranial	54	36	39	30	9	0,38	0,11	0,67	0,53
Recesso	25	27	25	22	8	0,98	0,82	0,67	0,80

<sup>1</sup> Erro-padrão da média. <sup>2</sup> Probabilidade para efeito de tratamento. <sup>3</sup> Probabilidade para os contrastes ortogonais, butirato *versus* salina (B vs S); lactato *versus* salina (L vs S) e propionato *versus* salina (P vs S).

Embora os AGV tenham aumentado a massa de mucosa ruminal (TABELA 2), esses reduziram o número de papilas por cm<sup>2</sup> de parede ruminal (TABELA 3). Em relação a outros estudos, as papilas ruminais foram menores proporcionalmente à idade dos animais (TABELA 3). Coelho (1999), utilizando técnica de mensuração papilar semelhante à utilizada neste trabalho, observou que a altura papilar em bezerros com acesso contínuo a alimentos concentrados

foi 400  $\mu\text{m}$  ao desmame com 30 dias de idade, 1.500  $\mu\text{m}$  aos 60 dias e 2.000  $\mu\text{m}$  aos 90 dias de idade. Naquele trabalho a área papilar foi 80.000  $\mu\text{m}^2$  à desmama, 800.000  $\mu\text{m}^2$  aos 60 dias e 1.200.000  $\mu\text{m}^2$  aos 90 dias. O crescimento papilar induzido por propionato (TABELA 3) foi semelhante ao observado para bezerros com acesso irrestrito a alimentos sólidos por 30 dias após a desmama. O ganho diário de peso, calculado por regressão linear do peso mensurado a cada três dias durante os 37 dias do período de infusões, foi (média  $\pm$  DP): 0,380  $\pm$  0,060 kg para Lactato; 0,278  $\pm$  0,136 kg para Butirato; 0,284  $\pm$  0,063 kg para Propionato e 0,169  $\pm$  0,065 kg para Salina ( $P = 0,02$  para tratamento;  $P = 0,003$  para o contraste Lactato *versus* Salina). O manejo alimentar e a frequência de infusões adotada neste experimento podem ter determinado o pequeno tamanho papilar proporcionalmente à idade dos animais.

**TABELA 3:** Área e altura das papilas e número médio de papilas por cm<sup>2</sup> nas regiões do saco cranial, recesso e saco cego do rúmen de bezerros mantidos em dieta exclusivamente líquida e recebendo infusões intra-ruminais de butirato (B), lactato (L), propionato (P) ou salina (S).

	B	L	P	S	EPM <sup>1</sup>	$\frac{P}{\text{Trat}}$ <sup>2</sup>	B vs S <sup>3</sup>	L vs S	P vs S
<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>									
Saco Cranial	219,707	428,704	770,179	204,842	220,296	0,35	0,97	0,46	0,11
Recesso	24,173	79,255	76,857	165,106	72,194	0,63	0,21	0,42	0,43
<b>Altura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>									
Saco Cranial	568	950	1,323	581	279	0,27	0,98	0,32	0,09
Recesso	195	484	379	353	134	0,53	0,44	0,50	0,90
<b>Número de papilas/cm<sup>2</sup></b>									
Saco cranial	328	291	392	519	34	<0,01	<0,01	<0,001	0,04
Recesso	257	338	375	426	84	0,72	0,31	0,43	0,66

<sup>1</sup> Erro-padrão da média. <sup>2</sup> Probabilidade para efeito de tratamento. <sup>3</sup> Probabilidade para os contrastes ortogonais, butirato *versus* salina (B vs S); lactato *versus* salina (L vs S) e propionato *versus* salina (P vs S).

Assumindo que a massa de mucosa ruminal reflita em parte a área total de parede, desde que a porcentagem de mucosa na parede ruminal foi pouco diferente entre tratamentos (TABELA 2), o número total de papilas ruminais seria maior nos animais que receberam infusões de AGV que nos animais que receberam salina. O número de papilas por cm<sup>2</sup> foi cerca de 1,5 vez maior no tratamento S que nos tratamentos com AGV; no entanto, a massa de mucosa ruminal foi de duas a três vezes inferior nesse tratamento-controle, como já foi discutido (TABELA 3). O maior número de papilas por cm<sup>2</sup> no tratamento S pode ter sido o resultado da concentração de papilas em uma menor área de parede ruminal. Julgando-se por esse parâmetro, os AGV foram estimuladores do desenvolvimento papilar.

A infusão de butirato, apesar de ter resultado em aumento no número calculado de papilas ruminais, foi incapaz de induzir ganho em área ou altura das papilas (TABELA 3). O propionato, além de ter sido menos inibidor do número de papilas por cm<sup>2</sup> que butirato e lactato, também tendeu a aumentar o tamanho papilar no saco cranial do rúmen. Os efeitos inibitórios de butirato e estimulatórios de propionato sobre o desenvolvimento papilar são semelhantes a observações *in vitro* (Gálfi et al., 1981; Neogrády et al., 1989; Gálfi et al., 1993), sugerindo que a ação direta dos AGV sobre as células epiteliais pode ter predominado sobre mecanismos humorais. O fato de maiores concentrações plasmáticas de insulina no tratamento com butirato terem sido acompanhadas por baixo tamanho papilar, o oposto do observado para propionato (FIGURA 16), também suporta tal suposição. A insulina é sabidamente estimuladora do desenvolvimento papilar (Sakata et al., 1980; Gálfi et al., 1991; Gálfi et al., 1993).

Todos os AGV induziram aumento na proliferação das células da camada basal do epitélio do rúmen (TABELA 4). Entretanto, maior proliferação celular não se refletiu em maior tamanho papilar (TABELA 3). A frequência de lesões histológicas foi acentuada nos tratamentos L e B (TABELAS 6 a 8). A resposta em mitose celular à infusão de lactato e butirato pode ter ocorrido devido à ruminite induzida por AGV (Hamada, 1975). As lesões histopatológicas causadas por propionato foram moderadas (TABELAS 6 a 8). A resposta em tamanho papilar foi inversamente proporcional à frequência de lesões no epitélio e não foi correlacionada ao IM. Nas FIGURAS 15, 17, 18, 19, 20, 21 e 22 verificam-se cortes histológicos da parede ruminal em cada um dos tratamentos.

**TABELA 4:** Índice mitótico na camada basal do epitélio ruminal, da epiderme no plano nasolabial, da *epicera* e do *perioplum* de bezerros mantidos em dieta exclusivamente líquida e recebendo infusões intra-ruminais de butirato (B), lactato (L), propionato (P) ou salina (S).

	B	L	P	S	EPM <sup>1</sup>	P Trat <sup>2</sup>	B vs S <sup>3</sup>	L vs S	P vs S
	Índice mitótico (%)								
Saco cranial	0,75	0,87	0,78	0,54	0,10	0,24	0,23	0,05	0,18
Recesso	0,53	0,56	0,51	0,28	0,11	0,36	0,17	0,11	0,21
Saco cego caudo-ventral	0,90	0,67	0,56	0,48	0,12	0,63	0,23	0,57	0,81
Plano nasolabial	0,26	0,24	0,41	0,39	0,42	0,28	0,24	0,17	0,86
<i>Epicera</i>	0,33	0,51	0,89	1,04	0,14	0,02	0,01	0,03	0,55
<i>Perioplum</i> dianteira	0,30	0,55	0,39	0,49	0,08	0,23	0,16	0,62	0,14
<i>Perioplum</i> traseira	0,42	0,32	0,65	0,23	0,05	<0,01	0,04	0,30	<0,001

<sup>1</sup> Erro-padrão da média. <sup>2</sup> Probabilidade para efeito de tratamento. <sup>3</sup> Probabilidade para os contrastes ortogonais, butirato *versus* salina (B vs S); lactato *versus* salina (L vs S) e propionato *versus* salina (P vs S).

Os AGV aumentaram a área de epitélio total e a área de células metabolicamente ativas no epitélio ruminal (TABELA 5). Esses dados também não são coerentes com os dados de tamanho papilar (TABELA 3), pois sugerem que todos os AGV foram igualmente capazes de induzir crescimento de tecido epitelial metabolicamente ativo. Essa incoerência nos resultados pode ser explicada pelo fato de o butirato ter induzido o crescimento epitelial sem, no entanto, induzir o desenvolvimento de papilas. A mensuração morfométrica da área de epitélio foi executada em toda a superfície epitelial presente nos cortes histológicos e não apenas no epitélio papilar. O butirato foi visualmente incapaz de estimular o desenvolvimento papilar, enquanto lactato e propionato foram mais efetivos. Os fatores reguladores da formação das papilas ruminais podem não atuar de maneira idêntica aos fatores determinantes do crescimento epitelial.

O desenvolvimento papilar pode não ser um indicador preciso da capacidade de metabolização de AGV pela parede do rúmen. Bovinos que receberam concentrados e com alta capacidade ruminal de absorção de AGV (Sutton et al., 1963; Gäbel et al., 1993; Perrier et al., 1994; Weiss, 1994) podem apresentar hiperqueratose e atrofia papilar (Haskins et al., 1969; Weigand et al., 1975; McGavin & Morrill, 1976). Várias respostas à infusão de AGV, principalmente butirato (TABELAS 1, 2, 4, e 5), contrastam-se à resposta não observada em tamanho papilar (TABELA 3) e aparentemente suportam essa suposição. Butirato aparentemente não estimulou o desenvolvimento papilar, mas estimulou o crescimento epitelial, apesar de esse crescimento ter sido patológico.

**TABELA 5:** Áreas de epitélio total, queratina e diferença entre área de epitélio total e área de queratina e porcentagem de queratina nos epitélios do rúmen e plano nasolabial de bezerros mantidos em dieta exclusivamente líquida e recebendo infusões intra-ruminais de butirato, lactato, propionato ou salina.

	B	L	P	S	EPM <sup>1</sup>	P Trat <sup>2</sup>	B vs S <sup>3</sup>	L vs S	P vs S
<b>Epitélio total (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>									
Saco Cranial	214,747	219,425	268,082	146,146	20,90	0,03	0,07	0,03	<0,01
Recesso	150,868	123,603	162,083	76,171	13,76	<0,01	<0,01	0,03	0,001
Saco cego caudo-ventral	285,087	147,701	147,969	100,104	43,27	0,06	0,01	0,45	0,47
Plano nasolabial	393,540	432,272	378,498	529,170	35,51	0,06	0,02	0,08	0,01
<b>Queratina (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>									
Saco Cranial	13,012	4,429	22,560	7,396	4,68	0,10	0,47	0,67	0,07
Recesso	9,589	3,713	9,293	6,793	2,10	0,21	0,39	0,32	0,44
Saco cego caudo-ventral	16,702	4,691	14,919	4,655	4,640	0,19	0,11	0,99	0,16
Plano nasolabial	41,748	43,801	36,628	37,514	5,10	0,72	0,59	0,40	0,90
<b>Epitélio total - queratina (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>									
Saco Cranial	201,735	214,996	245,522	138,749	21,15	0,05	0,09	0,03	0,01
Recesso	141,280	119,889	152,790	69,377	13,96	<0,01	<0,01	0,02	0,001
Saco cego caudo-ventral	268,384	143,010	133,051	95,450	41,49	0,07	0,01	0,43	0,55
Plano nasolabial	351,792	388,470	362,952	491,655	36,48	0,08	0,02	0,07	0,03
<b>Queratina (%)</b>									
Saco Cranial	6,65	2,11	8,43	4,38	2,27	0,28	0,55	0,50	0,29
Recesso	6,24	3,09	6,28	9,14	2,20	0,28	0,37	0,06	0,38
Saco cego caudo-ventral	6,36	3,01	12,31	5,50	3,30	0,30	0,86	0,60	0,19
Plano nasolabial	10,92	10,20	9,61	7,29	1,25	0,26	0,07	0,12	0,23

<sup>1</sup> Erro-padrão da média. <sup>2</sup> Probabilidade para efeito de tratamento. <sup>3</sup> Probabilidade para os contrastes ortogonais, butirato *versus* salina (B vs S); lactato *versus* salina (L vs S) e propionato *versus* salina (P vs S).

No tratamento B, o epitélio ruminal foi mensurado apenas nas regiões do corte histológico onde o epitélio não tinha erosão (TABELA 5). Subjetivamente, no máximo 10% do epitélio fixado no tratamento B não foi não-sujeito às

mensurações em consequência dessas lesões. Nos tratamentos P e S, as mensurações foram executáveis em todos os segmentos de epitélio, pois todas as áreas tinham epitélio íntegro. Os dados do tratamento L devem ser interpretados com cautela. Nesse tratamento, em todas as regiões de todos os cortes histológicos, o epitélio tinha degeneração hidrópica. Não existia epitélio íntegro no tratamento L, mas esse tinha o contorno epitelial definido, tornando-o apto de ser mensurado. Apesar da resposta positiva em crescimento de células metabolicamente ativas à infusão de lactato, o epitélio foi completamente danificado por esse AGV (TABELAS 6 a 8) e grande parte da área epitelial era composta por vacúolos e células vacuolizadas (FIGURAS 18, 19 e 20). Degenerações hidrópicas foram relatadas em novilhas sujeitas à indução experimental de acidose láctica e após infusão intraruminal de lactato (Ahrens, 1967). Lesões histopatológicas não foram observadas nos cortes dos epitélios do plano nasolabial, epicera cornual e região perióplica do casco, mostrando que essas são consequências do efeito direto dos AGV sobre o epitélio ruminal.

O lactato reduziu a queratinização do epitélio ruminal (TABELA 5). A menor proporção de queratina no epitélio após infusão de lactato foi consequência tanto da pequena área de tecido queratinizado quanto do aumento na área total de epitélio, em consequência da vacuolização das células epiteliais. Butirato resultou em queratinização similar à propionato. Esse achado não era esperado, já que butirato é sabidamente estimulador de diferenciação celular em epitélios estratificados (Staiano-Coico et al., 1990; Gálfi et al., 1993). No entanto, nos cortes histológicos dos animais que receberam butirato, foram freqüentemente observadas camadas de queratina desprendidas do epitélio e essas não foram incluídas nas mensurações de área (FIGURA 21). Hiperqueratose é reconhecidamente uma consequência de dietas ricas em concentrados (Jensen et al., 1954) e esse achado é freqüentemente associado à perda *in vivo* da camada de queratina (Gilliland et al., 1962; Tamate & Kikuchi,

1978). As técnicas histológicas utilizadas podem não ter sido as mais adequadas para quantificar possíveis diferenças de queratinizações do epitélio ruminal em resposta à infusão de butirato no rúmen.

A área de epitélio não-queratinizado no plano nasolabial foi reduzida pela infusão de AGV (TABELA 5). Tanto lactato como butirato reduziram numericamente o IM das células da camada basal da epiderme da pele na região do focinho (TABELA 4). A maior porcentagem de queratina em resposta à infusão de AGV não resultou do aumento na área de queratina e sim da redução na área de tecido não-queratinizado (TABELA 5). O efeito da infusão de AGV nesse tecido foi contrário ao efeito observado no rúmen. Não ficou evidente se o efeito indireto dos AGV sobre o epitélio do plano nasolabial poderia ter sido mediado por insulina, já que a maior concentração sorológica de insulina no tratamento B (FIGURA 16) não resultou em resposta diferenciada a esse AGV (TABELAS 4 e 5).

O efeito dos AGV sobre o IM na *epicera* foi semelhante ao efeito observado no plano nasolabial (TABELA 4). Butirato e lactato foram inibidores de mitose. Contrariamente ao efeito sobre o plano nasolabial e *epicera*, os AGV aumentaram o IM no *perioplum* traseiro dos cascos (TABELA 4). O efeito dos AGV sobre o *perioplum* dianteiro foi não significativo (TABELA 4). Esse achado merece consideração, pois a incidência de problemas nos locomotores de bovinos é prevalente nos membros posteriores (Nilsson, 1963; Weaver et al., 1981; Tranter & Morris, 1991), mais responsivos, neste trabalho, à infusão intraruminal de AGV. Distúrbios de queratinização podem atuar como fator predisponente de problemas de casco por atuar sobre a morfologia e a dureza dos cascos bovinos (Budras et al., 1996; Hendry et al., 1999). Parece que biópsias extra-ruminais podem ser utilizadas para detectar efeitos de AGV sobre o epitélio estratificado do rúmen. Essas técnicas são menos invasivas que o acesso cirúrgico ao rúmen de animais canulados. Julgando-se pela similaridade

na resposta, parece que o *perioplum* traseiro tem potencial como representante da resposta ruminal em IM. No entanto, como indicador de integridade do epitélio ruminal, biópsias na *epicera* podem ser interessantes, julgando-se pela similaridade em IM entre os tratamentos P e S e o menor IM nos tratamentos B e L, esses últimos também causadores de danos histopatológicos na parede ruminal. Apesar de não ter sido detectado efeito significativo de tratamento sobre o IM no plano nasolabial, a similaridade numérica entre a resposta nesse tecido e a resposta na *epicera* tornam biópsias no focinho promissoras, tanto pela facilidade de execução quanto pelo fato de biópsias na *epicera* não serem executáveis em bovinos leiteiros descornados. A interpretação de tal biópsias como representante de eventos ruminais requer validações futuras.

Suter et al. (1997) revisaram a regulação do crescimento e diferenciação celular em tecidos queratinizados. Esses autores citam que baixas concentrações de ácido retinóico ( $10^{-7}$  a  $10^{-10}$  M) podem ser estimulatórias da proliferação celular em células epiteliais humanas, enquanto altas concentrações ( $10^{-6}$  M) podem ser inibitórias em camundongos, mostrando que a resposta de epitélios estratificados a moduladores de divisão celular pode ser inversa e dependente da espécie e da concentração sorológica. A infusão de uma mistura de AGV no cólon proximal de ratos anestesiados estimulou o IM nesse local e em locais proximais do trato digestivo sem contato direto com a solução de AGV infundida. Entretanto, não foi detectado efeito dos AGV sobre o IM nas regiões do duodeno, ceco, cólon distal e epiderme da orelha desses animais (Sakata & Engelhardt 1983), sugerindo que a estimulação mitótica dos AGV pode estar restrita a certos tecidos.

## **4.1 Descrição histopatológica do epitélio ruminal**

### **4.1.1 Salina**

Nos quatro animais infundidos com salina, a mucosa ruminal estava íntegra e com papilas de contorno regular (FIGURA 15). Os exames histológicos do saco cranial, recesso e saco cego caudo-ventral revelaram epitélio sem alterações nas camadas celulares, com fina camada de células queratinizadas apresentando ou não núcleos achatados.

A avaliação ultra-estrutural do epitélio ruminal nas regiões do recesso e saco cego caudo-ventral dos animais no tratamento-controle revelou a presença de características relacionadas com a biossíntese de substâncias queratinosas (FIGURAS 23 a 27) similares às descritas na literatura (Steven & Marshal, 1970; Dellmann & Brown, 1982; Banks, 1992). As células da camada basal apresentaram núcleos ovóides e vesiculosos e citoplasma contendo ribosomas livres e algumas mitocôndrias alongadas com cristas proeminentes. Ocasionalmente, foram visualizados cisternas de RER, vesículas de tamanhos variados e materiais finos filamentosos. O espaço intercelular apresentou-se relativamente amplo, vazio e com junções desmosômicas dispostas intermitentemente entre membranas celulares vizinhas. Houve presença de grande quantidade de hemidesmosomas dispostos ao longo das membranas das células basais faceando a membrana basal, que se apresentou ligeiramente pregueada.

Próximo à transição das camadas basal e espinhosa, as células da camada espinhosa apresentaram formato poligonal e com aspecto espinhoso, devido aos inúmeros processos citoplasmáticos (FIGURA 26). Observaram-se cisternas de RER, mitocôndrias arredondadas e grande quantidade de ribosomas livres dispersos pelo citoplasma. Pequenos grânulos arredondados contendo material finamente granular foram visualizados próximo à região perinuclear. Células

vizinhas apresentaram-se unidas por diversos desmosomas, dispostos em intervalos regulares. As membranas celulares entre as junções mostraram-se altamente pregueadas e com prolongamentos projetando-se para o espaço intercelular. Numerosos feixes de delicadas fibrilas foram visualizados em todo o citoplasma, sem qualquer associação definida com os desmosomas.

Próximo à camada granulosa, as células tornaram-se achatadas e contendo maior quantidade de material filamentoso (FIGURA 25). Grande quantidade de grânulos limitados por membrana foram observados próximos à membrana apical da célula. A camada granulosa constituiu-se de duas a três fileiras de células achatadas contendo núcleo alongado e com heterocromatina compactada. O citoplasma apresentou-se moderadamente elétron-denso, com maior quantidade de fibrilas e apresentando grânulos de queratohialina. As membranas celulares mostraram-se menos pregueadas e apenas salpicadas com desmosomas. O espaço intercelular apresentou-se preenchido com material floculento e com algumas vesículas vazias. Próximo à junção com a camada córnea, as membranas das células granulosas mostraram-se mais espessas e escuras. Desmosomas, embora menos freqüentes, mantiveram sua estrutura típica.

A camada córnea constituiu-se de três a quatro fileiras de células queratinizadas, com considerável variação nos seus constituintes celulares (FIGURA 26). Frequentemente, as células mostraram-se preenchidas por material amorfofilamentoso associado a grânulos de queratohialina e restos celulares. O epitélio paraqueratótico foi considerado normal.

#### **4.1.2 Propionato**

Nenhuma área avaliada dos epitélios do rúmen de animais que receberam infusões de AGV foi considerada normal, devido à presença de lesões

celulares, as quais sugeriram processos degenerativos (TABELAS 6, 7 e 8). O epitélio nas diferentes regiões do rúmen dos animais que receberam propionato apresentou lesões leves ou moderadas (FIGURA 17). Visualmente, as papilas ruminais mostraram-se mais desenvolvidas que nos animais-controle e ligeiramente ramificadas. No saco cranial e recesso do rúmen de um dos quatro animais que receberam propionato, foi observada desproporção entre as camadas celulares do epitélio relativamente ao tratamento-controle, sendo o mesmo observado no saco cego caudo-ventral em três desses animais. Nessas, apresentando desproporção entre as camadas do epitélio, as células da camada granulosa apresentaram halos claros perinucleares e citoplasma ligeiramente vacuolizado. O saco cego caudo-ventral de um animal apresentava lesões moderadas, definidas pela presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear, associado às lesões já descritas. Papilas mais desenvolvidas foram mais ramificadas e com maior proporção de células vacuolizadas.

As células basais no epitélio ruminal de animais que receberam infusões de propionato apresentaram características ultra-estruturais semelhantes às dos animais que receberam o tratamento S (FIGURAS 28 a 30). Entretanto, maior quantidade de mitocôndrias arredondadas com cristas proeminentes, ribosomas livres e agrupados, cisternas de RER e feixes de filamentos finos foram observados espalhados pelo citoplasma, sugerindo que o propionato estimulou aumento no metabolismo celular da camada basal.

A camada espinhosa apresentou-se bem desenvolvida e com características morfológicas também similares às do tratamento S, porém observou-se maior quantidade de feixes filamentosos espalhados pela célula. Células granulares apresentaram núcleos achatados com características degenerativas e maior quantidade de grânulos de queratohialina que os animais no tratamento S. Ocasionalmente foram observados núcleos contendo cromatina compactada, sugerindo a presença de corpos apoptóticos, sinais morfológicos de

morte celular por apoptose (FIGURA 29). O aumento da quantidade de feixes filamentosos nas camadas basal e espinhosa e a grande quantidade de grânulos de queratohialina indicam que houve síntese de queratina completa na camada espinhosa e acelerada taxa de diferenciação pós-mitótica.

A camada córnea apresentou-se relativamente espessa e formada por células bem achatadas contendo restos nucleares e material fibrilar (FIGURA 30). Em algumas áreas, observou-se a presença de desmosomas. O espaço intercelular mostrou-se amplo e vazio. A retenção de núcleo e a presença de rede fibrosa na camada córnea sugerem alterações nas atividades das enzimas lisosômicas. O propionato aparentemente causou ruminite química branda com síntese precoce de queratina, caracterizando um quadro de disqueratose, hiperqueratose e paraqueratose típica de ruminantes (Tamate & Kikuchi, 1978).

#### **4.1.3 Lactato**

Em todos animais do grupo que recebeu infusões intra-ruminais de lactato, as alterações ruminais foram consideradas graves (TABELAS 6, 7 e 8). Em todos os animais, foram observadas papilas bem ramificadas e com desproporção entre as camadas celulares, comparado ao tratamento S (FIGURAS 18, 19 e 20). As camadas espinhosa e granular apresentaram-se bastante espessadas e constituídas por células com halos claros perinucleares. Observou-se intensa vacuolização citoplasmática, podendo-se observar também a presença de grandes vacúolos intra e extracitoplasmáticos e espaço intercelular aparentemente aumentado. A camada córnea apresentou-se descontínua e formada apenas por algumas células queratinizadas e com núcleos em degeneração. Essas alterações estão de acordo com a descrição microscópica das lesões observadas no epitélio ruminal de novilhos fistulados submetidos à sobrecarga alimentar com cereais (Ahrens, 1967).

A infusão intra-ruminal de lactato aumentou a quantidade de ribossomas livres e agrupados e causou degeneração de mitocôndrias nas células da camada basal (FIGURA 31). Hemidesmosomas e desmosomas foram pouco evidenciados e a presença de membrana basal íntegra foi pouco freqüente.

A camada espinhosa constituiu-se de várias fileiras de células também poligonais, com núcleo ovóide e heterocromatina formando massas compactas (FIGURAS 32, 33 e 34). Observaram-se no citoplasma dessas células muitas cisternas dilatadas de RER, ribossomas agrupados e vacúolos intercalados com feixes de filamentos finos. O espaço intercelular mostrou-se bastante amplo, sugerindo retração celular e menor quantidade de desmosomas.

As células da camada granulosa mostraram-se bastante vacuolizadas, contendo mitocôndrias em degeneração, pequenos grânulos limitados por membrana, algumas vesículas sugerindo a presença de gotículas lipídicas entremeadas com grânulos de queratohialina e material fibrilar (FIGURA 34). O espaço intercelular mostrou-se ligeiramente reduzido e preenchido por material finamente granular. Em algumas regiões, observou-se a presença de desmosomas.

As células queratinizadas mostraram-se elétron-densas, preenchidas com restos de organelas degeneradas associadas a material amorfo-fibrilar e com poucas regiões de contato entre células (FIGURA 35). O espaço intercelular apresentou-se bastante aumentado e com poucas regiões unidas por desmosomas. Observaram-se estruturas esféricas entre as células queratinizadas, sugerindo a presença de protozoários, um indicador de dano na barreira física entre o conteúdo ruminal e a membrana basal (FIGURA 35).

A diminuição da atividade da bomba de íons sódio-potássio é seguida por um influxo de sódio, cálcio e água para dentro da célula, e pela difusão de potássio e magnésio para fora da célula (Jones, Hunt, King, 2000). O lactato pode ter alterado o funcionamento da bomba de íons, necessário para a

manutenção da pressão osmótica intracelular. Conseqüentemente, o aumento do conteúdo de água provocou dilatação de organelas, desarranjo da membrana celular com relação ao citoesqueleto e progressiva tumefação celular. Esse quadro foi classificado como ruminite química com degeneração hidrópica. Desde que maior atividade mitótica não tenha resultado em maiores dimensões papilares (TABELA 3), que o lactato tenha induzido proliferação celular, objetivando renovação celular e reestruturação do epitélio ruminal lesado.

#### **4.1.4 Butirato**

Em dois dos quatro animais infundidos com butirato, foram visualizadas alterações muito graves no recesso e saco cego caudo-ventral do rúmen (TABELAS 7 e 8). O epitélio apresentou desproporção entre as camadas celulares, grandes vacúolos intracitoplasmáticos, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e áreas de erosão (FIGURAS 21 e 22). Observaram-se grandes áreas preenchidas por material amorfoeosinofílico com desarranjo na arquitetura epitelial. Em algumas regiões, as células apresentaram núcleos pequenos e condensados (picnóticos) ou fragmentados (cariorrexe), ou mesmo anucleadas (cariólise). Essas alterações foram diagnosticadas como ruminite química severa ulcerativa associada à necrose. Nos outros dois animais, as lesões no recesso e saco cego caudo-ventral foram classificadas como graves, assim como as lesões do saco cranial em todos os animais (TABELAS 6 a 8) (FIGURAS 21).

A camada basal mostrou-se bastante desorganizada, não apresentando um padrão morfológico constante em sua estrutura (FIGURA 36). Algumas células apresentaram núcleo vesiculoso e de contorno regular, enquanto outras apresentaram núcleo irregular e com heterocromatina dispersa. O citoplasma mostrou-se repleto de ribosomas livres, filamentos finos e mitocôndrias vacuolizadas. O espaço intercelular apresentou-se amplo, com presença de

processos citoplasmáticos estirados e poucos desmosomas preservados. A membrana basal em algumas áreas mostrou-se ligeiramente tortuosa e descontínua.

A camada espinhosa constituiu-se de células poligonais com numerosos processos citoplasmáticos ocasionalmente unidos por desmosomas (FIGURA 37). O núcleo apresentou-se também irregular e com cromatina ligeiramente condensada. Foram observadas grandes quantidades de ribosomas livres e agrupados, cisternas de RER e mitocôndrias vacuolizadas com contorno irregular. Pequenos grânulos elétron-densos limitados por membrana foram ocasionalmente observados. O espaço intercelular apresentou-se amplo e vazio. As células localizadas nas proximidades da camada granulosa mostraram-se achatadas e com núcleo contendo cromatina fragmentada (FIGURA 38). O citoplasma apresentou-se repleto de feixes filamentosos e com pequenos grânulos elétron-densos limitados por membrana dispostos na periferia da célula. Mitocôndrias em degeneração foram ocasionalmente observadas, com vacúolos vazios e outros cheios, sugerindo a presença de gotículas lipídicas. A membrana plasmática mostrou-se bastante espessada e o espaço intercelular apresentou-se reduzido e contendo material granular fino.

A camada granulosa constituiu-se de três a quatro fileiras de células achatadas e com padrão morfológico bastante variável (FIGURAS 39 e 40). O núcleo de algumas células apresentou envoltório nuclear irregular e com heterocromatina formando massas compactas. Foram observados grandes vacúolos intracitoplasmáticos associados a mitocôndrias em diversas fases de degeneração. Feixes filamentosos mostraram-se dispostos paralelamente à membrana plasmática, que se mostrou bastante espessada.

A infusão de butirato no rúmen induziu danos estruturais da parede ruminal caracterizada por ruminite química ulcerativa necrosante associada a hiperqueratose e paraqueratose ruminal.

**TABELA 6:** Avaliações histológicas expressas em porcentagem de ocorrência no saco cranial do rúmen de bezerros mantidos em dieta exclusivamente líquida, recebendo infusões intra-ruminais de butirato, lactato, propionato ou salina.

Tratamentos	Alterações (%)				
	1	2	3	4	5
Butirato	0	0	0	100	0
Lactato	0	0	0	100	0
Propionato	0	100	0	0	0
Salina	100	0	0	0	0

1- epitélio normal, 2- desproporção entre as camadas com formação de vacúolos (lesão leve), 3- desproporção entre as camadas com formação de vacúolos e infiltrado inflamatório polimorfonuclear (lesão moderada), 4- desproporção entre as camadas com intensa formação de vacúolos e infiltrado inflamatório polimorfonuclear (lesão grave), 5- desproporção entre as camadas com intensa formação de vacúolos, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e áreas de erosão (lesão muito grave).

**TABELA 7:** Avaliações histológicas expressas em porcentagem de ocorrência no recesso do rúmen de bezerros mantidos em dieta exclusivamente líquida, recebendo infusões intra-ruminais de butirato, lactato, propionato ou salina.

Tratamentos	Alterações (%)				
	1	2	3	4	5
Butirato	0	0	0	50	50
Lactato	0	0	0	100	0
Propionato	0	100	0	0	0
Salina	100	0	0	0	0

1- epitélio normal, 2- desproporção entre as camadas com formação de vacúolos (lesão leve), 3- desproporção entre as camadas com formação de vacúolos e infiltrado inflamatório polimorfonuclear (lesão moderada), 4- desproporção entre as camadas com intensa formação de vacúolos e infiltrado inflamatório polimorfonuclear (lesão grave), 5- desproporção entre as camadas com intensa formação de vacúolos, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e áreas de erosão (lesão muito grave).

**TABELA 8:** Avaliações histológicas expressas em porcentagem de ocorrência no saco cego caudo-ventral do rúmen de bezerros mantidos em dieta exclusivamente líquida, recebendo infusões intra-ruminais de butirato, lactato, propionato ou salina.

Tratamentos	Alterações (%)				
	1	2	3	4	5
Butirato	0	0	0	50	50
Lactato	0	0	0	100	0
Propionato	0	75	25	0	0
Salina	100	0	0	0	0

1-epitélio normal, 2- desproporção entre as camadas com formação de vacúolos (lesão leve), 3- desproporção entre as camadas com formação de vacúolos e infiltrado inflamatório polimorfonuclear (lesão moderada), 4- desproporção entre as camadas com intensa formação de vacúolos e infiltrado inflamatório polimorfonuclear (lesão grave), 5- desproporção entre as camadas com intensa formação de vacúolos, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e áreas de erosão (lesão muito grave).

## 6 CONCLUSÕES

O crescimento anatômico do estômago aglandular foi induzido pela presença de AGV, sem a necessidade de trabalho mecânico de digestão.

Dentre os AGV estudados, butirato e lactato foram os maiores indutores de alterações patológicas no epitélio ruminal.

O propionato foi o AGV responsável pelo crescimento fisiológico de papilas metabolicamente ativas.

Os efeitos direto e indireto dos AGV sobre a morfologia da mucosa ruminal e de outros tecidos queratinizados sugerem que danos morfológicos no epitélio do rúmen e de cascos podem ter causa comum, explicando a ocorrência simultânea de anomalias nessas estruturas em bovinos sujeitos à acidose ruminal.

Biópsias tegumentares podem ter utilidade como indicadores de alterações morfológicas da mucosa do rúmen.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRENS, F. A. Histamine, lactic acid, and hipertonicity as factors in the development of rumenitis in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 28, n. 126, p. 1335-1343, 1967.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, D. J. Differentiated cells and the maintenance of tissues. In: **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, 1994. p. 1139-1193.

ALONSO, L. S. **Marcadores morfológicos em papilas ruminais de bovinos e ovinos**. 2002. 43 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ANDERSSON, L.; BERGMAN, A. Pathology of bovine laminitis especially as regards vascular lesions. **Acta Veterinarian Scandinavian**, Uppsala, Sweden, v. 21, n. 4, 559-566, 1980

BAGGOTT, D. G. , BUNCH, K. J. , GILL, K. R. Variations in some inorganic components and physical properties of claw keratin associated with claw disease in the British Friesian cow. **British Veterinary Journal**, London, v. 144, n. 6, p. 534-542, Nov./Dec. 1988.

BALDWIN, R. L.; JESSE, B. W. Development changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep rumen epithelial cells. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 122, n. 5, p. 1149-1153, May 1992.

BALDWIN, R.; JESSE, B. W. Technical note: isolation and characterization of sheep ruminal epithelial cells. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 69, n. 9, p. 3603-3609, Sept. 1991.

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

BARCROFT, J.; MCNALLY, R. A.; PHILLIPSON, A. T. Absorption of volatile acids from the alimentary tract of the sheep and others animals. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 20, n. 1/2, p. 120-129, 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 Press, 1995. v. 2.

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**, New York, v. 68, n. 1, p. 77, 1983.

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

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 Veterinary Research**, Schaumburg, v. 37, n. 12, p. 1387, 1976.

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.

BUDRAS, K. D.; MÜLLING, C. H.; HOROWITZ, A. Rate of keratinization of the wall segment of the hoof and its relation to width and structure of the zone alba (white line) with respect to claw disease in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 57, n. 4, p. 444-455, Apr. 1996.

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, 1972.

CALIARI, M. V. **Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes**. Belo Horizonte: Ed. Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. 149 p.

CAMARGOS, E. R. S.; NETO, J. A. S. **Técnicas rotineiras de processamento de material biológico em microscopia eletrônica de transmissão**. Belo Horizonte: Ed. Universidade Federal de Minas Gerais, 1995. 56 p.

COELHO, S. G. **Ganho de peso e desenvolvimento do estômago de bezerros desaleitados aos trinta dias de idade e alimentados com concentrado e com ou sem feno.** 1999. 123 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

COIMBRA, L. E. P. **Avaliação da substituição do milho pela polpa cítrica em concentrados para bezerros: Desempenho e parâmetros da fermentação ruminais.** 2002. 65 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CRICHLLOW, E. C. Ruminant lactic acidosis: Forestomach epithelial receptor activation by undissociated volatile fatty acids and rumen fluids collected during loss of reticuloruminant motility. **Research Veterinary Science**, Schaumburg, v. 45, n. 3, p. 364-368, Nov. 1988.

CRICHLLOW, E. C.; CHAPLIN, R. K. Ruminant lactic acidosis: Relationship of fore stomach motility to no dissociated volatile fatty acids levels. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, n. 9, p. 1908-1911, 1985.

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

DIRKSEN, G.; LIEBICH, H. G.; BROSI, G.; HAGEMMEISTER, H.; MAYER, E. Morphologie der pansen-schleimhaut und fettsaureresorption beim rind-bedeutende faktoren fur gesunkheit und leistung. **Zentralblatt fur Veterinar Medizin**, Berlin, v. 31, n. 6, p. 414-430, July 1984.

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**, Savoy, v. 78, p. 1512-1525, July. 1995.

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

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

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

GÁLFI, P.; GABEL, G.; MARTENS, H. Influence of intracellular matrix components on the growth and differentiation of ruminal epithelial cells in primary culture. **Research Veterinary Science**, London, v. 54, n. 1, p. 102-109, Jan. 1993.

GÁLFI, P.; NEOGRÁDY, S.; KUTAS, F. Dissimilar ruminal epithelial response to short-term and continuous intra-ruminal infusion of sodium n-butyrate. **Journal Veterinary Medicine**, Berlin, v. 33, n. 1, p. 47, Jan. 1986.

GÁLFI, P.; NEOGRÁDY, S.; KUTAS, F.; VERESEGYHÁZY, T. Keratinization of cultured ruminal epithelial cells treated with butyrate and lactate. **Zentralblatt Für Veterinar Medizin**, Humburg, v. 30, n. 10, p. 775-781, 1983.

GÁLFI, P.; NEOGRÁDY, S.; SAKATA, T. Effects of volatile fatty acids on the epithelial cell proliferation of the digestive tract and its hormonal mediation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 7., 1991, Sendai. **Proceedings ...** San Diego: Academic Press, 1991. p. 49-59.

GÁLFI, P.; VERESEGYHÁZY, T.; NEOGRÁDY, S. , KUTAS, F. Effect of sodium n-butyrate on primary ruminal epithelial cell culture. **Zentralblatt Für Veterinar Medizin**, Hamburg, v. 28, n. 10, p. 259-261, 1981.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Interamericana, 1981. 2000 p.

GILLILAND, R. L.; BUSH, L. J.; FRIEND, J. D. Relation of ration composition to rumen development in early-weaned dairy calves with observations on ruminal parakeratosis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 45, n. 10, p. 1211-1217, Oct. 1962.

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**, New York, v. 66, n. 4, p. 487-499, Oct. 1981.

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

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.

HAMADA, T. Effects of 1,2 propanediol on the rumen mucosal growth of kids. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 58, n. 9, p. 1352-1359, Sept. 1975.

HARMON, D. L.; BRITTON, R. A.; PRIOR, R. Influence of diet on glucose turnover and rates of gluconeogenesis, oxidation and turnover of D-(-)- lactate in the bovine. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 113, n. 9, p. 1842-1850, Sept. 1983.

HARMON, D. L.; BRITTON, R. A.; PRIOR, R. L.; STOCK, R. A Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose induced acidosis or fed a 70 % concentrate diet ad libitum. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 60, n. 2, p. 560-569, Feb. 1985.

HASKINS, B. R.; WISE, M. B.; CRAIG, H. B.; BLUMER, T. N.; BARRICK, E. R. Effects of adding low levels of roughages or roughage substitute to high energy ration for fattening steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 29, n. 2, p. 345, Aug. 1969.

HENDRY, K. A. K.; MACCALLUM, A. . J.; KNIGHT, C. H.; WILDE, C. J. Effect of endocrine and paracrine factors on protein synthesis and cell proliferation in bovine hoof tissue culture. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 66, n. 1, p. 23-33, Mar. 1999.

HENDRY, K. A. K.; MACCALLUM, A. J.; KNIGHT, C. H.; WILDE, C. J. Laminitis in the dairy cow: a cell biological approach. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 475-486, Mar. 1997.

HENDRY, K. A. K.; MACCALLUM, A. J.; KNIGHT, C. H.; WILDE, C. J. Synthesis and distribution of cytoketatins in healthy and ulcerated bovine claw epidermis. **Journal of Dairy Research, Cambridge**, v. 68, n. 4, p. 525-537, Nov. 2001.

HENRIKSON, R. C. Ultrastructure of ovine ruminal epithelium and localization of sodium in the tissue. **Journal of Ultra structure Research**, San Diego, v. 30, n. 3/4, p. 385, 1970.

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

HOBLET, K. H.; WEISS, W. Metabolic hoof horn disease. Claw horn disruption. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 111-127, Mar. 2001.

HUNGATE, R. E.; DOUGHERTY, R. W.; BRYANT, M. P.; CELLO, R. M. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. **Cornell Veterinary**, Ithaca, v. 42, n. 4, p. 423, 1952.

ISTASSE, L.; HOVELL, F. D. DeB; MACLEOD, N. A.; ORSKOV, E. R. The effects of continuous or intermittent infusion of propionic acid on plasma insulin and milk yield in dairy cows nourished by intragastric infusion of nutrients. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 201-214, Apr. 1987.

JENSEN, R.; DEANE, H. M.; COOPER, L. J.; MILLER, V. A.; GRAHAM, W. R. The rumenitis-liver abscess complex in beef cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Shaumburg,, p. 277-282, Apr 1958.

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**, Shaumburg, v. 15, n. 55, p. 202-216, 1954.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

KRAJCARSKI-HUNT, H.; PLAIZIER, J. C.; WALTON, J. P.; SPRATT, R.; MCBRIDE, B. W. Short communication: effect of subacute ruminal acidosis on in situ fiber digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, n. 3, p. 570-573, Mar. 2002.

KREHBIEL, C. R.; HARMON, D. L.; SCHNIEDER, J. E. Effect of increasing ruminal butyrate on portal and hepatic nutrient flux in steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 3, p. 904, Mar. 1992.

KUTAS, F.; GÁLFI, P.; NEOGRÁDY, S. Effect of monensin on development of ruminal parakeratosis in fattening lambs. **Zentralblatt Für Veterinar Medizin**, Hamburg, v. 30, n. 7, p. 506-510, 1983.

LANDSVERK, T. Indigestion in young calves. IV. Lesions of ruminal papillae in young calves fed barley and barley plus hay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Uppsala, Sweden, v. 19, p. 377-391, 1980.

LEEK, B. F.; HARDING, R. H. Sensory nervous receptors in the ruminant stomach and the reflex control of reticulo-ruminal motility. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF RUMINANT PHYSIOLOGY, DIGESTION AND METABOLISM IN THE RUMINANT, 4., 1975, Sydney. **Proceedings...** Sydney, Australia, 1975.

LAVKER, R.; CHALUPA, W.; DICKEY, J. F. An electron microscopic investigation of rumen mucosa. **Journal of Ultrastructure Research**, San Diego, v. 28, n. 1/2, p. 1, 1969.

LAVKER, R. M.; MALTOLTSY, A. G. The fate of cell organelles and differentiation products in ruminal epithelium. **Journal Cell Biology**, New York, v. 44, p. 501, 1970.

LITTLE, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D. **Sas® system for mixed models**. Cary, NC: SAS Institute, 1996. 633 p.

LUNA, L. G. **Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute Pathology**. 3. ed. New York: McGraw hill, 1968. 258 p.

MACLEAN, C. W. The histopathology of laminitis in dairy cows. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 81, n. 4, p. 563-571, 1971.

MAYER, E. Changements de régimes alimentaires et variations morphologiques des papilles du rumen chez la vache laitière à haute production. **Bull Académie Vétérinaire de France**, Paris, v. 59, p. 159, 1986.

MCGAVIN, M. D.; MORRIL, J. L. Scanning electron microscopy of ruminal papillae in calves fed various amounts and forms of roughage. **American Journal Veterinary Research**, Shaumburg, v. 37, p. 497-508, 1976.

NEOGRÁDY, S.; GÁLFI, P.; KUTAS, F. Effects of intraruminal butyrate infusion on the plasma insulin level in sheep. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 37, p. 247, 1989.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. **The anatomic of the domestic animals: the circulatory system, the skin and the cutaneous organs of the domestica mamals**. Berlin-Hamburg: Verlag Paul Parey, 1981. v. 3, 610 p.

NILSSON, S. A. Clinical, morphological, and experimental atudies of laminitis in cattle. **Acta Veterinaria Scandinava**, Uppsala, v. 1, 1963. Suplement 1.

NOCEK, J. E.; HEALD, C. W.; POLAM, C. E. Influence of ration physical form and nitrogen availability on ruminal morphology of growing bull calves. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 67, n. 2, p. 334-343, Feb. 1984.

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

NOMINA ANATOMICA VETERINARIA, 4 ed.; NOMINA HISTOLOGICA, revised 2 ed.; NOMINA EMBRYOLOGICA VETERINARIA, 1 ed. **World Association of Veternary Anatomist**. Zurich and Ithaca, New York, 1994.

OBEL, N. Studies on the histopathology of acute laminitis. Dissertation, Stockholm, Sweden. In: EKFAŁCK, A.; FUNKQUIST, B.; JONES, B.; OBEL, N. Incorporation of <sup>35</sup>S-cystine in tissue fragments from the matrix of the bovine claw and effect on incorporation rate of adding blood serum and some serum fractions. **Zentralblatt Für Veterinar Medizin**, Berlin, v. 32, p. 785, 1948.

OETZEL, G. R.; NORDLUND, K. V.; GARRET, E. F. Effect of ruminal pH and stage of lactation on ruminal lactate concentrations in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82, Suppl. 1, p. 38-39, 1999.

OSSENT, P.; GREENOUGH, P. R.; VERMUNT, J. J. Laminitis. In: GREENOUGH, P. R.; WEAVER, A. D. **Lameness in Cattle**. 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997. p. 277-292.

PEREIRA, M. N.; GARRET, E. F.; OETZEL, G. R.; ARMENTANO, L. E. Partial replacement of forage with no forage fiber sources in lactating cow diets. I. Performance and health. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82, n. 12, p. 2716-2730, Dec. 1999.

PERRIER, R.; FERCHAL, E.; DURIER, C.; DOREAU, M. Effect of undernutrition 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. 1990.

POLLITT, C. C. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 28, n. 1, p. 38-46, Jan. 1996.

RESENDE JÚNIOR, J. C. **Comparação entre técnicas para a determinação do clearance ruminal de ácidos graxos voláteis**. 2003. 133 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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, MG.

ROMPALA, R. E.; HOAGLAND, T. A.; MEISTER, J. A. Modification in growth and morphology of ovine jejunum and ruminal epithelial as affected by inert dietary substances. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 8, p. 2530-2535, Aug. 1990.

ROSS, R. L.; KITTS, W. D. Relations between postprandial plasma volatile fatty acids, glucose and insulin levels in sheep fed different feeds. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 103, n. 4, p. 488-493, Apr. 1973.

SAS institute. **SAS<sup>®</sup> user's guide**: statistics. 5. ed. Cary, 1985. 1290 p.

SAKATA, T. Stimulatory effect of short chain fatty acids on the epithelial cell proliferation in rat large intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fiber, gut microbes and luminal trophic factors. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 58, p. 95-103, 1987.

SAKATA, T.; ENGELHARDT, W. V. Stimulatory effect of short chain fatty acids on the epithelial cell proliferation in rat large intestine. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 74, n. 2, p. 459-462, 1983.

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, 1980.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Effect of intra-ruminal injection of n-sodium butyrate on the mitotic indices in sheep ruminal epithelium: **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Sandai-shi, v. 27, p. 133-135, 1976.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Effect of the intermittent feeding on the index and the ultrastructure of basal cells of the ruminal epithelium in sheep. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Sandai-shi, v. 25, p. 156-163, 1974.

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

SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelium cell proliferation accelerated by rapid increase in intra-ruminal butyrate. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 61, p. 1102-1109, Aug. 1978.

SAKATA, T.; YAJIMA, T. Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, New York, v. 69, n. 3, p. 639-648, 1984.

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

SANO, H.; HAYAKAWA, S.; TAKAHASHI, H.; TERASHIMA, Y. Plasma insulin and glucagon responses to propionate infusion into femoral and mesenteric veins in sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n.1, p. 191-197, Jan. 1995a.

SANO, H.; TANO, S.; TAKAHASHI, H.; TERASHIMA, Y. Dose response of plasma insulin and glucagon to intravenous n-butyrate infusion in sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 10, p. 3038-3043, Oct. 1995b.

SCHNORR, B.; VOLLMERHAUS, B. Das oberflächenrelief der pansenschleimhaut bei rind und ziege (Erste mitteilung zur funktionellen morphologie der vormagen der hauswiederkauer). **Zentralblatt Für Veterinar Medizin**, Berlin, v. 14, n. 1, p. 93, 1967.

SINGH, S. S.; MURRAY, R. D.; WARD, W. D. Histopathological and morphometric studies on the hooves of dairy and beef cattle in relation to overgrown sole and laminitis. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 107, n. 3, p. 319-328, Oct. 1992.

STAIANO-COICO, L.; KHANDKE, K.; KRANE, J. F.; GOTTLIEB, B.; KRUEGER, J. G.; RIGAS, B.; HIGGINS, P. J. TGF-alpha and TGF-beta expression during sodium-N-butyrate-induced differentiation of human keratinocytes: evidence for subpopulations-specific up-regulation of TGF-beta mRNA in suprabasal cells. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 191, n. 2, p. 286-291, Dec. 1990.

STEVEN, D. H.; MARSHALL, A. B. Absorption. Organization of the rumen epithelium. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHYSIOLOGY OF DIGESTION AND METABOLISM IN THE RUMINANT., 3., 1969, Cambridge. **Proceedings...** Cambridge: Oriel Press, 1970. p. 80-100.

SUTER, M. M.; CRAMERI, F. M.; OLIVRY, T.; MUELLER, E.; TSCHARNER, C. V.; JENSEN, P. J. Review article. Keratinocyte biology and pathology. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 67-100, June 1997.

SUTTON, J. D.; MCGILLIARD, A. D.; JACOBSON, N. L. Functional development of rumen mucosa. I. Absorptive ability. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 46, n. 6, p. 426, June 1963.

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. 4, p. 359-364, 1977.

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

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, p. 142-152, 1974.

TAMATE, H.; MCGILLIARD, A. D.; JACOBSON, N. L.; GETTY, R. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 45, n. 8, p. 408-420, 1962..

THYE, F. W.; WARNER, R. G.; MILLER, P. D. Relations of various blood metabolites to voluntary feed intake in lactating ewes. **Journal Nutrition**, Bethesda, v. 100, n. 5, p. 565, May 1970.

TRANTER, W. P.; MORRIS, R. S. A case study of lameness in three dairy herds. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 39, n. 3, p. 88-96, Sept. 1991.

VAIR, C.; WARD, G. M.; FRANDSON, R. D.; FLAMBOE, E. E. Influence of sodium salts of volatile fatty acids on rumen development in the young calf. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 43, n. 6, p. 890, June 1960.

VAUGHN, A. S.; GRUMMER, R. R.; BERTICS, S. J. Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 76, n. 10, p. 2931-2932, Oct. 1993.

WARNER, R. G. Nutritional factors affecting the development of a functional ruminant- A historical perspective. In: CORNELL CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 1991, Rochester. **Proceedings...** Cornell University, Ithaca, 1991. p. 1-13.

WEAVER, A. D.; ANDERSSON, L.; DE LAISTRE BANTING, A.; DEMERZIS, P. N.; KNEZEVIC, P. F.; PETERSE, D. J.; SANKOVIC, F. Review of disorders of the ruminant digit with proposals for anatomical and pathological terminology and recording. **Veterinary Record**, London, v. 108, n. 6, p. 117, 1981.

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**, Savoy, v. 58, n. 8, p. 1294-1300, Aug. 1975.

WEISS, B. Untersuchungen über beziehungen zwischen der azidität des panseninhaltes und dem proliferationszustand der pansen-schleimhaut beim rind. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v. 107, n. 3, p. 73-78, Mar. 1994.

## ANEXOS

- FIGURA 1:** Corte sagital do rúmen e do retículo (esquemático). Os asteriscos mostram os locais de coleta de fragmentos da parede ruminal. .... 84
- FIGURA 2:** Desenho esquemático da superfície do plano nasolabial de bovino. O asterisco mostra o local de coleta do fragmento de pele. .... 84
- FIGURA 3:** Desenho esquemático do órgão digital posterior de bovino. A seta indica o local de coleta do fragmento no perioplum. .... 85
- FIGURA 4:** Desenho esquemático da cabeça de bezerro. A seta indica o local de coleta do fragmento na epicera. .... 85
- FIGURA 5:** Animais mantidos em bezerreiros individuais com piso ripado. . 86
- FIGURA 6:** Animal com cateter de infusão no rúmen durante o período experimental. .... 86
- FIGURA 7:** Cateter no rúmen mostrando o balão de fixação inflado após o abate do animal. .... 87
- FIGURA 8:** Delimitação da área (1 cm<sup>2</sup>) para contagem do número de papilas na parede do recesso e saco cranial do rúmen. .... 87
- FIGURA 9:** Corte histológico longitudinal da papila na região do saco cego caudo-ventral do rúmen de bezerro que recebeu infusões de salina. As setas indicam figuras de mitose na camada basal do epitélio. A cabeça de seta indica núcleos achatados na camada córnea evidenciando paraqueratose típica dos ruminantes. Hematoxilina-eosina.400x. .... 88

- FIGURA 10:** Corte histológico longitudinal de pele espessa na região do plano nasolabial de bezerro que recebeu infusões de salina. Notar as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epiderme. Camada córnea (CC). Hematoxilina-eosina.100x. .... **88**
- FIGURA 11:** Corte histológico longitudinal da epicera (epiderme) e derme cornual de bezerro que recebeu infusões de lactato. Notar as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epicera cornual. Camada córnea (CC). Hematoxilina-eosina.100x. .... **89**
- FIGURA 12:** Corte histológico longitudinal da epiderme e derme da região perióplica dianteira do casco de bezerro que recebeu infusões de salina. Notar as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epiderme. A seta indica papila epidérmica interdigitada com papila dérmica, formando as papilas primárias. Hematoxilina-eosina.100x. .... **89**
- FIGURA 13:** Corte histológico longitudinal da epiderme e derme da região perióplica traseira do casco de bezerro que recebeu infusões de propionato. Notar as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epiderme. A seta indica papila epidérmica interdigitada com papila dérmica, formando as papilas primárias. Hematoxilina-eosina.200x. .... **90**
- FIGURA 14:** Corte histológico longitudinal de pele espessa na região do plano nasolabial de bezerro que recebeu infusões de salina. Notar as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epiderme. Camada córnea corada em vermelho (CC). A seta indica ductos de glândulas sudoríparas presentes na derme. Tricrômico da Masson.100x. .... **90**
- FIGURA 15:** Corte histológico longitudinal da mucosa no saco cranial do rúmen de bezerro que recebeu infusões de salina. Observar a presença de papilas com contorno regular e fina camada de queratina corada em vermelho. Lâmina própria (LP). Tricrômico de Masson.100x. .... **91**

- FIGURA 16:** Insulina plasmática de bezerros que receberam infusões intraruminais de butirato, lactato, propionato ou salina nos tempos 0, 90, 180, 360 pós-infusão. ( $P < 0,05$  para o efeito de tratamento;  $P = 0,0001$  para efeito de tempo;  $P = 0,07$  para interação entre tratamento e tempo). ..... 91
- FIGURA 17:** Corte histológico longitudinal de papila com contorno irregular na região do recesso do rúmen de bezerro que recebeu infusões de propionato. Observar a presença de espessa camada córnea. Lâmina própria (LP). Hematoxilina-Eosina. 100x. .... 92
- FIGURA 18:** Corte histológico longitudinal de papila com contorno irregular na região do saco cranial do rúmen de bezerro que recebeu infusões de lactato. Observar a presença de apenas poucas células queratinizadas, coradas em vermelho, no epitélio ruminal. Lâmina própria (LP). Tricrômico de Masson. 100x. .... 92
- FIGURA 19:** Corte histológico longitudinal de papila ramificada na região do recesso do rúmen de bezerro que recebeu infusões de lactato. Observar a presença de apenas poucas células queratinizadas, coradas em vermelho, no epitélio ruminal. Lâmina própria (LP). Tricrômico de Masson. 100x. .... 93
- FIGURA 20:** Corte histológico longitudinal de papila na região do saco caudo-ventral do rúmen de bezerro que recebeu infusões de lactato. Notar a presença de várias células vacuolizadas e grandes vacúolos intercelulares no epitélio ruminal. Lâmina própria (LP). Hematoxilina-eosina. 200x. .... 93
- FIGURA 21:** Corte histológico longitudinal da mucosa ruminal na região do recesso do rúmen de bezerro que recebeu infusões de butirato. Observar a presença de epitélio espesso, paraqueratótico porém, sem crescimento papilar. A seta indica camada espessa de queratina sofrendo descamação para o lume ruminal. Hematoxilina-Eosina. 100x. .... 94

**FIGURA 22:** Corte histológico longitudinal da mucosa ruminal na região do saco cego caudo-ventral do rúmen de bezerro que recebeu infusões de butirato. Observar a extensa área de erosão epitelial, e fina camada de queratina corada em vermelho sugerindo intensa descamação. Tricrômico de Masson. 100x. .... 94

**FIGURA 23:** Micrografia eletrônica da camada basal (CB) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais com salina. Observar a presença de vacúolos (V) intracitoplasmáticos e hemidesmosomos ao longo das membranas das células basais faceando a lâmina própria (LP). As setas indicam a membrana basal ligeiramente tortuosa. Fibrilas colágenas (FC). 7.760x. .... 95

**FIGURA 24:** Micrografia eletrônica da camada basal (CB) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais com salina. Observar a presença de numerosos ribosomas livres e feixes filamentosos (\*) espalhados pelo citoplasma da célula basal. O espaço intercelular (E) apresenta-se amplo e com projeções citoplasmáticas. A cabeça de seta branca indica a presença de desmosoma. Vacúolos (V), hemidesmosomos (cabeça de seta preta) e lâmina própria (LP). 32.064x. .... 95

**FIGURA 25:** Micrografia eletrônica da transição da camada espinhosa (CE) para camada granular (CG) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais com salina a 0,9%. A seta indica a presença de grânulos limitados por membrana localizados na superfície apical da célula da camada espinhosa. O espaço intercelular (E) apresenta-se dilatado e contendo material ligeiramente floculento. Observar a presença de célula em degeneração na camada granulosa. 7.760x. .... 96

**FIGURA 26:** Micrografia eletrônica das camadas basal (CB) e espinhosa (CE) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais com salina a 0,9%. Observar na camada espinhosa presença de maior quantidade de desmosomos (cabeça de seta branca) unindo uma célula à outra e, espaço intercelular bastante reduzido. Vacúolos (V) e lâmina própria (LP). 6.320x. . 96

**FIGURA 27:** Micrografia eletrônica das camadas espinhosa (CE), granular (CG) e córnea (CC) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais com salina a 0,9%. Observar célula da camada espinhosa com núcleo alongado e, grande quantidade de grânulos de queratohialina (GQ) espalhados pelo citoplasma das células das camadas granular e córnea. O espaço entre as células granulares apresenta-se amplo e contendo material finamente granular. A seta indica membrana plasmática espessa de célula queratinizada. 10.272x. .... 97

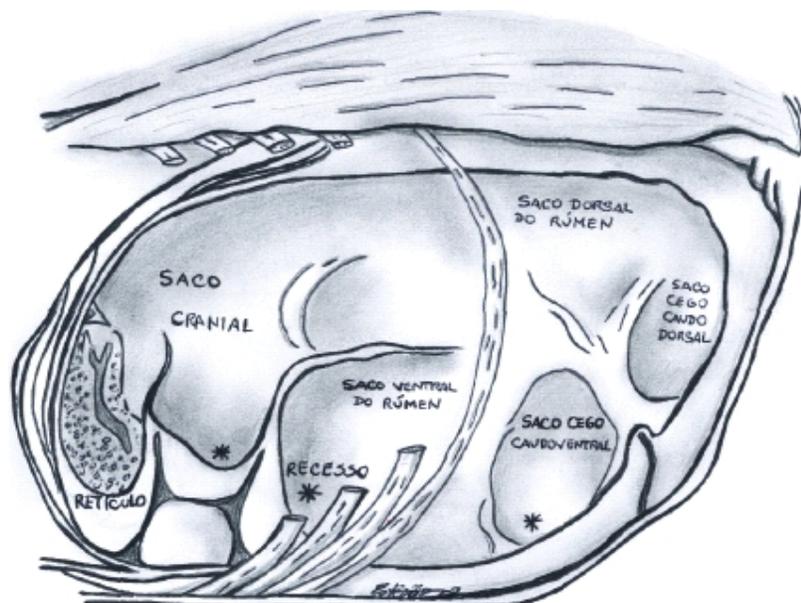
**FIGURA 28:** Micrografia eletrônica da camada basal (CB) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais com propionato. Observar a presença de grande quantidade de mitocôndrias arredondadas e com cristas proeminentes (M), cisternas de retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres e agrupados distribuídos pelo citoplasma da célula basal. Filamentos podem ser visualizados formando desenvolvidos feixes. O espaço intercelular apresenta-se amplo, vazio e com longas interdigitações citoplasmáticas. A seta branca indica a presença de desmosoma unindo duas células vizinhas. A membrana basal apresenta-se íntegra (seta preta) e salpicada por hemidesmosomas (cabeça de seta preta). Lâmina própria (LP). 16.032x. .... 98

**FIGURA 29:** Micrografia eletrônica da camada granular (CG) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais com propionato. Presença de célula granular com núcleo alongado e apresentando massas compactas de heterocromatina (\*), sugerindo a presença de corpos apoptóticos. A seta indica feixes filamentosos intracitoplasmáticos e a cabeça de seta branca evidencia a presença ainda de desmosomas na camada granular. Vacúolos (V). 12.880x. .... 99

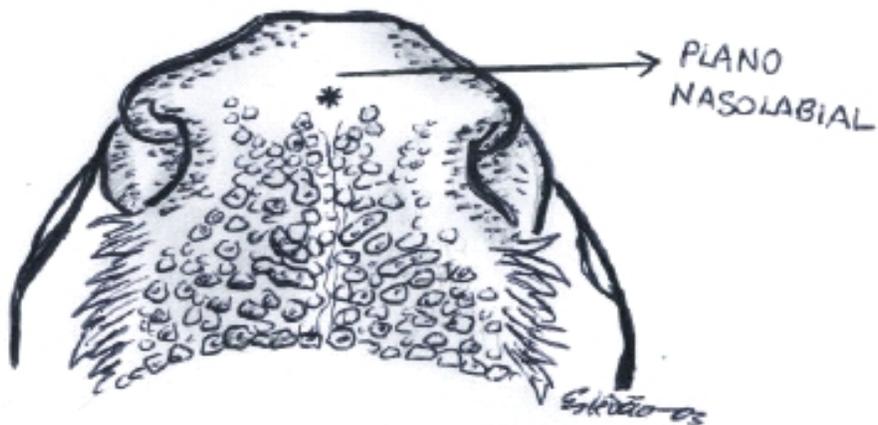
- FIGURA 30:** Micrografia eletrônica da transição da camada granular (CG) para camada córnea (CC) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais com propionato. Células da camada granular mostram-se bastante elétron-densas e contendo grânulos de queratohialina de tamanhos variados. A camada córnea apresenta-se formada por células achatadas com membrana plasmática espessada e preenchidas por material amorfo-filamentoso. 7.760x. .... 100
- FIGURA 31:** Micrografia eletrônica da camada basal (CB) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais de lactato. Observar a presença de mitocôndrias de contorno irregular e tumefatas (M). A seta indica a membrana basal pouco nítida e descontínua. Espaço intercelular (E) e lâmina própria (LP). 12.880x. .... 101
- FIGURA 32:** Micrografia eletrônica da camada espinhosa (CE) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais de lactato. Observar a presença de espaços claros (E) entre as células da camada espinhosa em áreas onde essas células perderam contatos celulares. Visualiza-se na célula espinhosa núcleo de contorno irregular e com heterocromatina formando massas compactas aderidas ao envoltório nuclear. O citoplasma dessas células apresenta-se repleto de material amorfo-fibrilar e com mitocôndrias sofrendo degeneração. Evidenciam-se grandes vacúolos (V) e gotículas lipídicas (L) no citoplasma da célula espinhosa. 7.760x. .... 102
- FIGURA 33:** Micrografia eletrônica da camada espinhosa (CE) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais de lactato. Observar a presença de espaços claros (E) entre as células da camada espinhosa e desmosomas nas regiões de contatos dessas células (cabeça de seta branca). A seta preta indica a presença de filamentos inseridos na placa desmosômica. Presença de grânulos envoltos por membrana intercalados com material amorfofibrilar intracitoplasmático (seta branca). 16.032x. .... 103

- FIGURA 34:** Micrografia eletrônica das camadas espinhosa (CE), granular (CG) e córnea (CC) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais de lactato. Observar a presença grânulos envoltos por membrana (seta branca) e gotículas lipídicas (L) nos citoplasmas das células espinhosa e granular. Visualizar na célula granular a presença de grandes vacúolos (V) e grânulos de queratohialina (GQ) citoplasmáticos intercalados com material finamente granular. A seta preta indica mitocôndria em degeneração. Na transição com a camada córnea o espaço intercelular (E) torna-se dilatado e preenchido com bastante material elétron-denso. 7.760x. .... 104
- FIGURA 35:** Micrografia eletrônica das camadas granular (CG) e córnea (CC) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais de lactato. Visualizar no citoplasma da célula granulosa grandes vacúolos (V), restos nucleares e grânulos de queratohialina. A seta indica a presença de estruturas esféricas no espaço intercelular (E), sugerindo a presença de microorganismos ciliados intra-epiteliais. 12.880x. ....105
- FIGURA 36:** Micrografia eletrônica das camadas basal (CB) e espinhosa (CE) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais de butirato. Observar a presença de núcleo de contorno irregular e com heterocromatina bastante dispersa na célula basal. Visualizar no citoplasma dessas células grande quantidade de ribossomos livres, filamentos finos e mitocôndrias (M) vacuolizadas. O espaço intercelular mostra-se dilatado e com processos citoplasmáticos estirados. Lâmina própria (LP). 7.760x. .... 106
- FIGURA 37:** Micrografia eletrônica da camada espinhosa (CE) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais de butirato. Observar célula espinhosa apresentando núcleo irregular e heterocromatina ligeiramente condensada. O citoplasma mostra grandes quantidades de ribossomos livres e agrupados, cisternas de retículo endoplasmático rugoso, vacúolos (V), e mitocôndrias (M) em degeneração. Desmosomas são evidenciados nas regiões de contatos celulares. Espaço intercelular (E). 4.048x. ....107

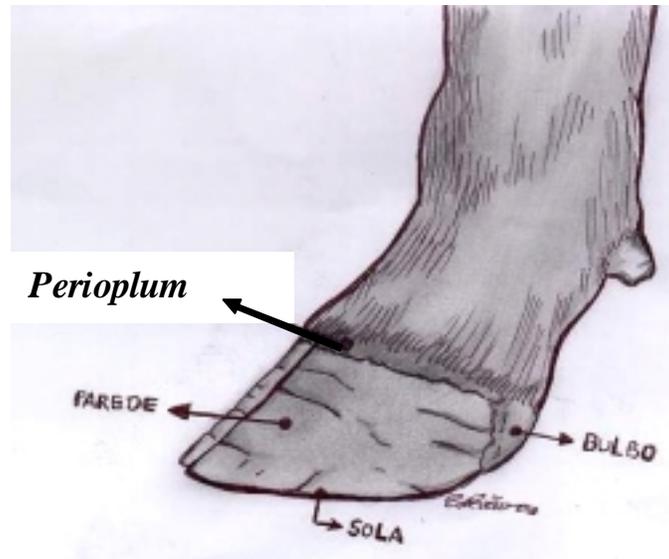
- FIGURA 38:** Micrografia eletrônica da transição da camada espinhosa (CE) para camada granular (CG) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra-ruminais de butirato. Observar células achatadas contendo núcleos com cromatina fragmentada. O citoplasma dessas células mostra feixes de filamentos grosseiros (seta preta) e finos, vacúolos (V), gotículas lipídicas (L) e numerosos ribosomas livres. O espaço intercelular (E) apresenta-se bastante reduzido e contendo material amorfo e elétron-denso. 16.032x. .... 108
- FIGURA 39:** Micrografia eletrônica da camada granular (CG) do epitélio ruminal de bezerro recebendo infusões intra-ruminais de butirato. Observar célula granulosa contendo núcleo de contorno irregular e heterocromatina formando massas compactas. O citoplasma evidencia numerosas mitocôndrias em degeneração (M), vacúolos (V) e feixes de filamentos finos dispostos na periferia da célula. 10.272x. .... 109
- FIGURA 40:** Micrografia eletrônica das camadas granular (CG) e córnea do epitélio ruminal de bezerro recebendo infusões intra-ruminais de butirato. Visualizam-se grânulos de queratohialina associados à grandes vacúolos (V) e restos de organelas no citoplasma das células das camadas granulosa e córnea. Espaço intercelular (E). 7.760x. ....110



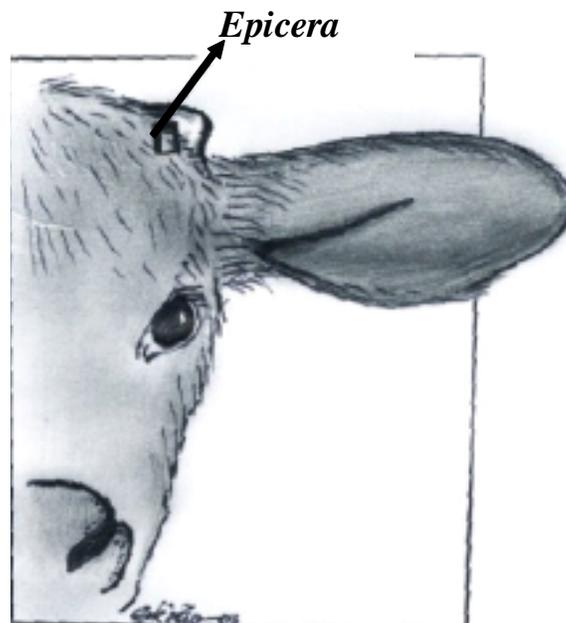
**FIGURA 1:** Corte sagital do rúmen e do retículo (esquemático). Os asteriscos mostram os locais de coleta de fragmentos da parede ruminal.



**FIGURA 2:** Desenho esquemático da superfície do plano nasolabial de bovino. O asterisco mostra o local de coleta do fragmento de pele.



**FIGURA 3:** Desenho esquemático do órgão digital posterior de bovino. A seta indica o local de coleta do fragmento no *perioplum*.



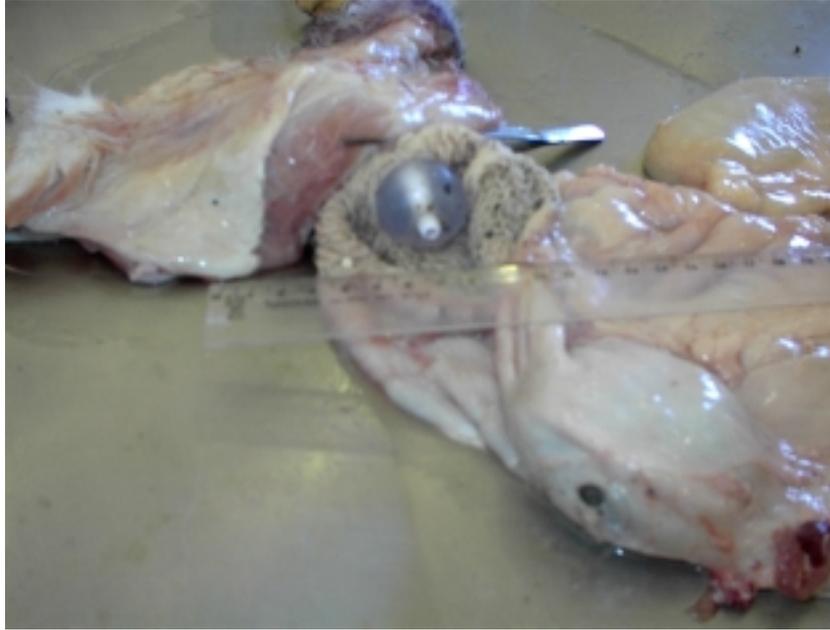
**FIGURA 4:** Desenho esquemático da cabeça de bezerro. A seta indica o local de coleta do fragmento na *epicera*.



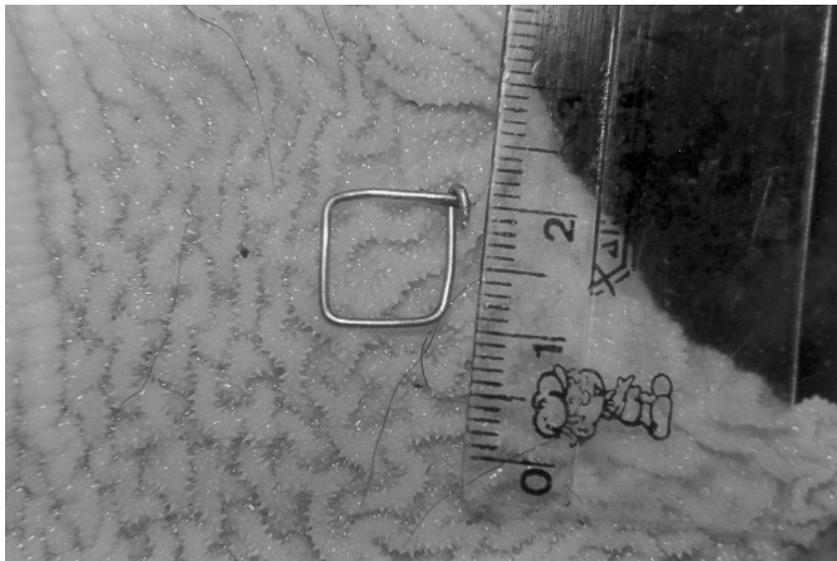
**FIGURA 5:** Animais mantidos em bezerreiros individuais com piso ripado.



**FIGURA 6:** Animal com cateter de infusão no rúmen durante o período experimental.



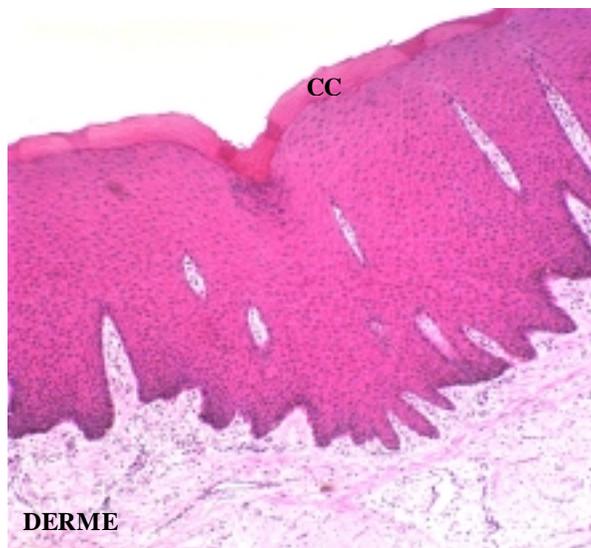
**FIGURA 7:** Cateter no rúmen mostrando o balão de fixação inflado após o abate do animal.



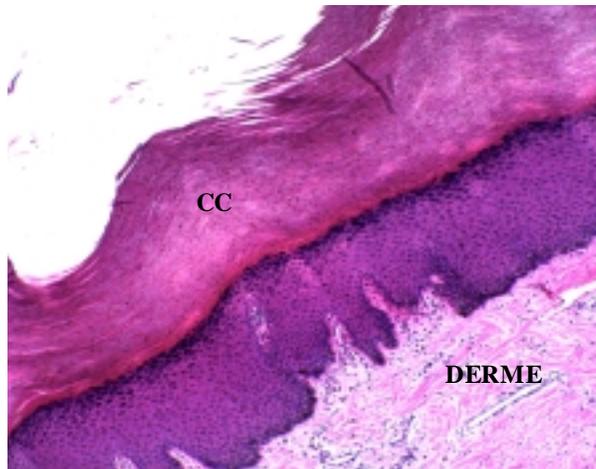
**FIGURA 8:** Delimitação da área ( $1 \text{ cm}^2$ ) para contagem do número de papilas na parede do recesso e saco cranial do rúmen.



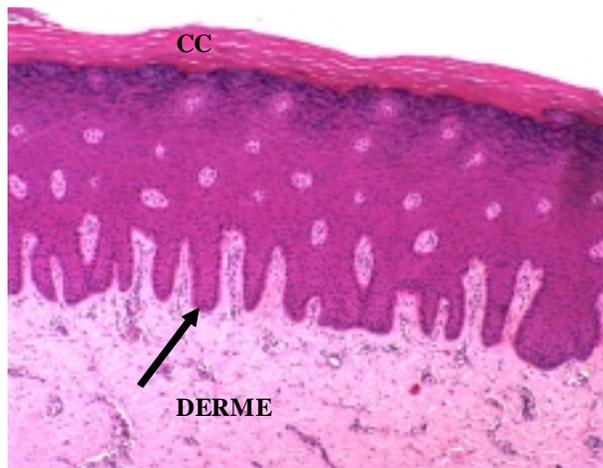
**FIGURA 9:** Corte histológico longitudinal da papila na região do saco cego caudo-ventral do rúmen de bezerro que recebeu infusões de salina. As setas indicam figuras de mitose na camada basal do epitélio. A cabeça de seta indica núcleos achatados na camada córnea evidenciando paraqueratose típica dos ruminantes. Hematoxilina-eosina.400x.



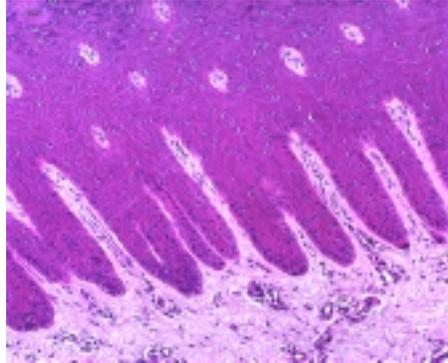
**FIGURA 10:** Corte histológico longitudinal de pele espessa na região do plano nasolabial de bezerro que recebeu infusões de salina. Notar as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epiderme. Camada córnea (CC). Hematoxilina-eosina.100x.



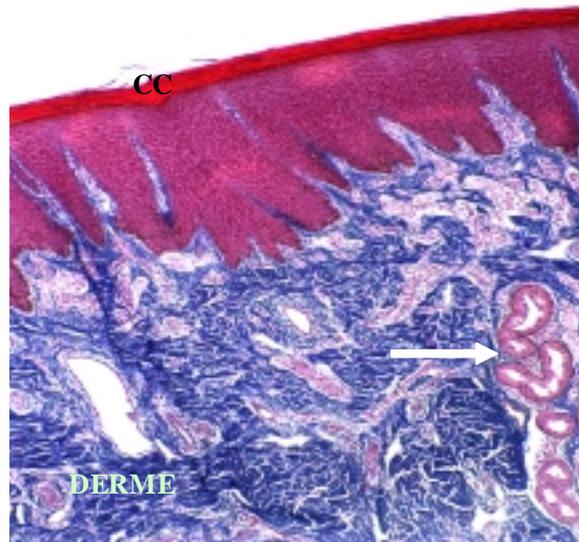
**FIGURA 11:** Corte histológico longitudinal da *epicera* (epiderme) e derme cornual de bezerro que recebeu infusões de lactato. Notar as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epicera cornual. Camada córnea (CC). Hematoxilina-eosina.100x.



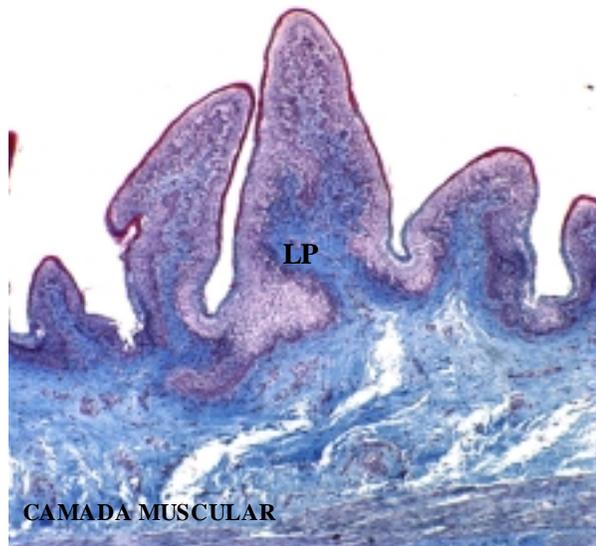
**FIGURA 12:** Corte histológico longitudinal da epiderme e derme da região perióplica dianteira do casco de bezerro que recebeu infusões de salina. Notar as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epiderme. A seta indica papila epidérmica interdigitada com papila dérmica, formando as papilas primárias. Hematoxilina-eosina.100x.



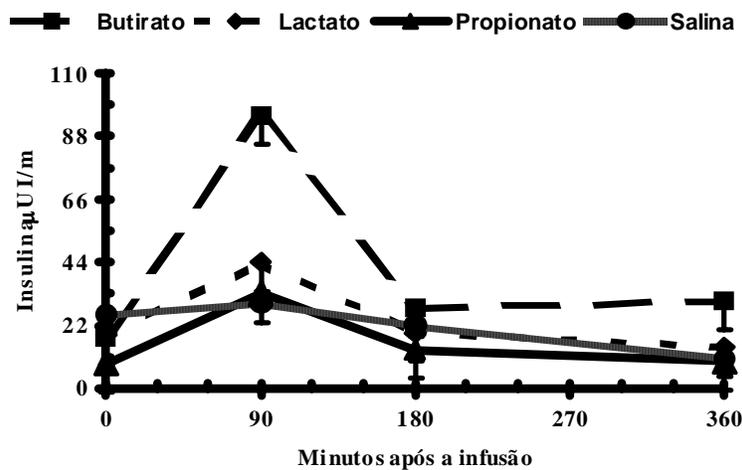
**FIGURA 13:** Corte histológico longitudinal da epiderme e derme da região perióplica traseira do casco de bezerro que recebeu infusões de propionato. Notar as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epiderme. A seta indica papila epidérmica interdigitada com papila dérmica, formando as papilas primárias. Hematoxilina-eosina.200x.



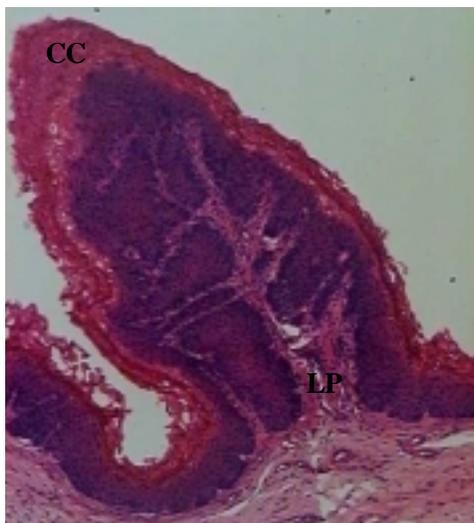
**FIGURA 14:** Corte histológico longitudinal de pele espessa na região do plano nasolabial de bezerro que recebeu infusões de salina. Notar as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da epiderme. Camada córnea corada em vermelho (CC). A seta indica ductos de glândulas sudoríparas presentes na derme. Tricrômico da Masson.100x.



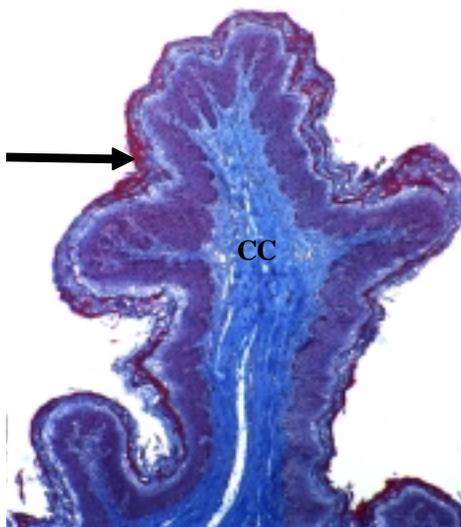
**FIGURA 15:** Corte histológico longitudinal da mucosa no saco cranial do rúmen de bezerro que recebeu infusões de salina. Observar a presença de papilas com contorno regular e fina camada de queratina corada em vermelho. Lâmina própria (LP). Tricrômico de Masson.100x.



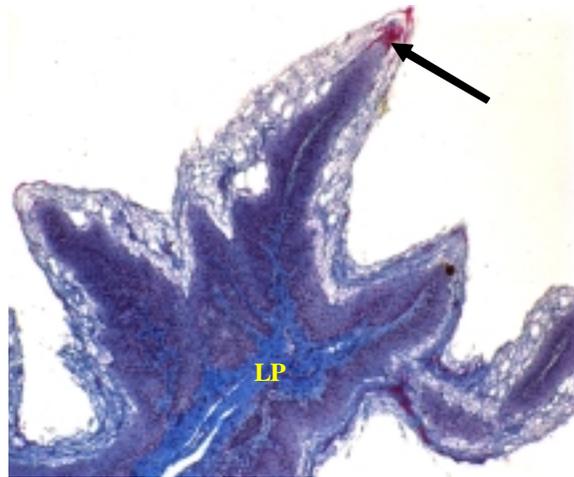
**FIGURA 16:** Insulina plasmática de bezerros que receberam infusões intraruminais de butirato, lactato, propionato ou salina nos tempos 0, 90, 180, 360 pós-infusão. ( $P < 0,05$  para o efeito de tratamento;  $P = 0,0001$  para efeito de tempo;  $P = 0,07$  para interação entre tratamento e tempo).



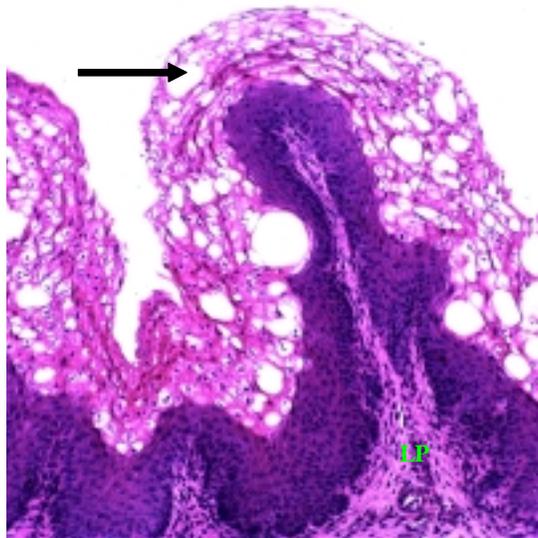
**FIGURA 17:** Corte histológico longitudinal de papila com contorno irregular na região do recesso do rúmen de bezerro que recebeu infusões de propionato. Observar a presença de espessa camada córnea.Lâmina própria (LP). Hematoxilina-Eosina.100x.



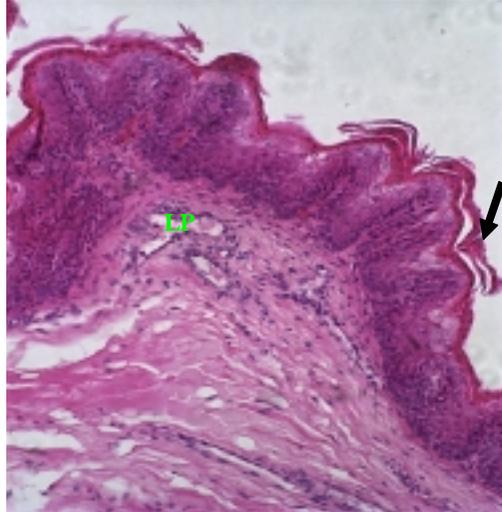
**FIGURA 18:** Corte histológico longitudinal de papila com contorno irregular na região do saco cranial do rúmen de bezerro que recebeu infusões de lactato. Observar a presença de apenas poucas células queratinizadas, coradas em vermelho, no epitélio ruminal.Lâmina própria (LP). Tricrômico de Masson.100x.



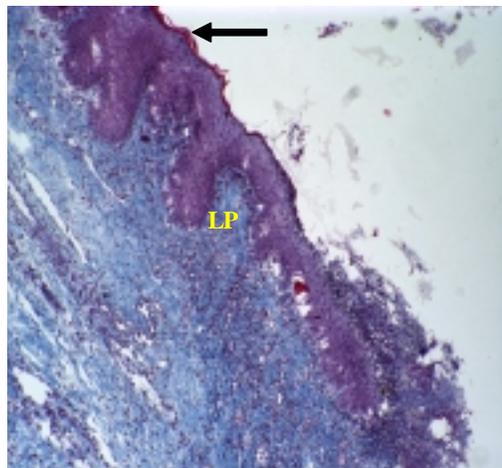
**FIGURA 19:** Corte histológico longitudinal de papila ramificada na região do recesso do rúmen de bezerro que recebeu infusões de lactato. Observar a presença de apenas poucas células queratinizadas, coradas em vermelho, no epitélio ruminal. Lâmina própria (LP). Tricrômico de Masson. 100x



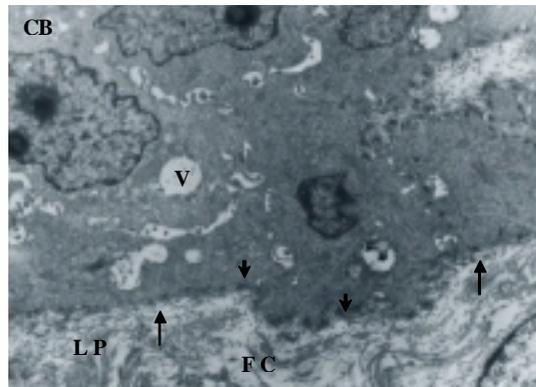
**FIGURA 20:** Corte histológico longitudinal de papila na região do saco cego caudo-ventral do rúmen de bezerro que recebeu infusões de lactato. Notar a presença de várias células vacuolizadas e grandes vacúolos intercelulares no epitélio ruminal. Lâmina própria (LP). Hematoxilina-eosina. 200x



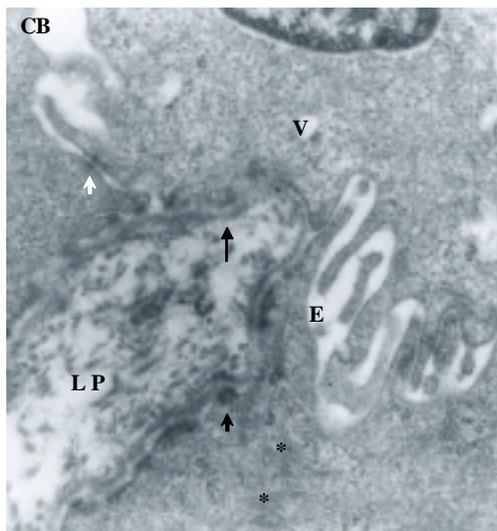
**FIGURA 21:** Corte histológico longitudinal da mucosa ruminal na região do recesso do rúmen de bezerro que recebeu infusões de butirato. Observar a presença de epitélio espesso, paraqueratótico porém, sem crescimento papilar. A seta indica camada espessa de queratina sofrendo descamação para o lume ruminal. Hematoxilina-Eosina.100x.



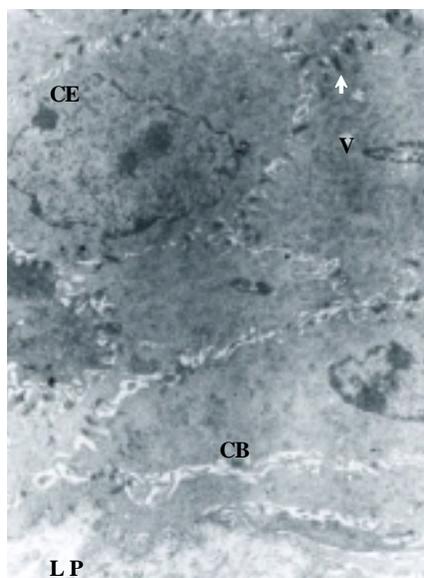
**FIGURA 22:** Corte histológico longitudinal da mucosa ruminal na região do saco cego caudo-ventral do rúmen de bezerro que recebeu infusões de butirato. Observar a extensa área de erosão epitelial, e fina camada de queratina corada em vermelho sugerindo intensa descamação. Tricrômico de Masson. 100x



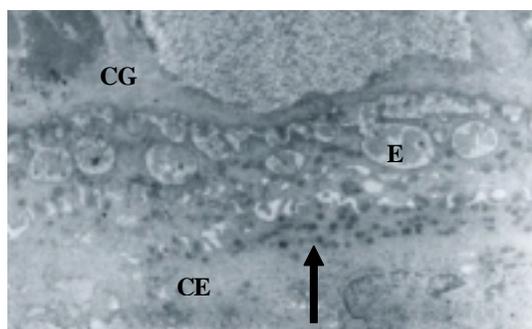
**FIGURA 23:** Micrografia eletrônica da camada basal (CB) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais com salina. Observar a presença de vacúolos (V) intracitoplasmáticos e hemidesmosomos ao longo das membranas das células basais faceando a lâmina própria (LP). As setas indicam a membrana basal ligeiramente tortuosa. Fibrilas colágenas (FC). 7.760x.



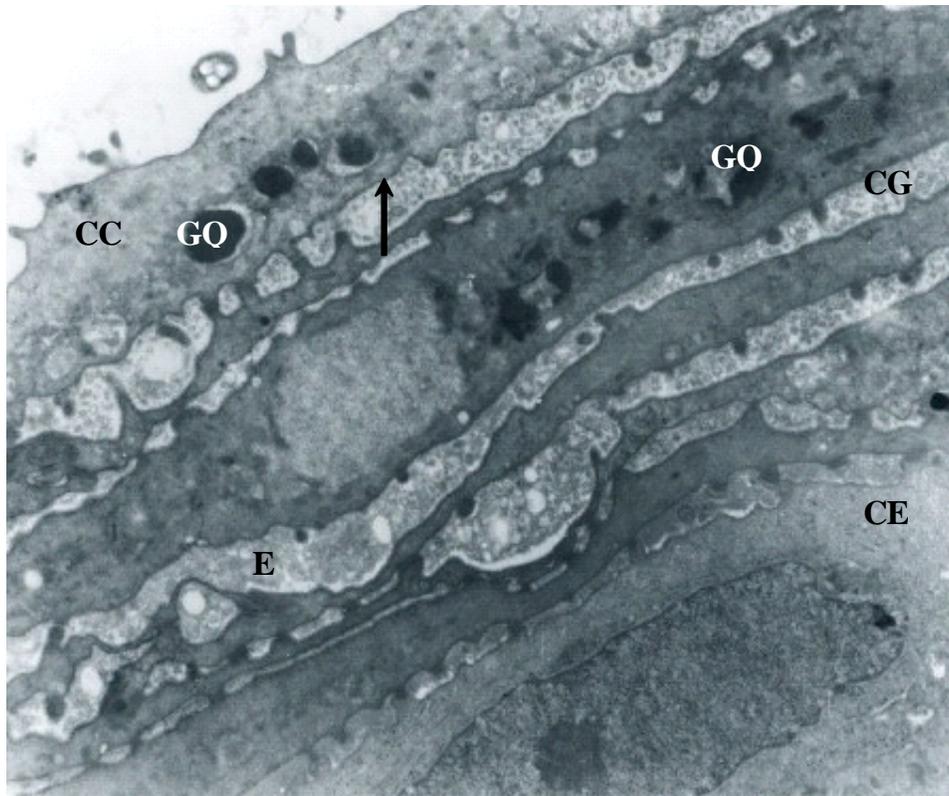
**FIGURA 24:** Micrografia eletrônica da camada basal (CB) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais com salina. Observar a presença de numerosos ribossomos livres e feixes filamentosos (\*) espalhados pelo citoplasma da célula basal. O espaço intercelular (E) apresenta-se amplo e com projeções citoplasmáticas. A cabeça de seta branca indica a presença de desmosoma. Vacúolos (V), hemidesmosomos (cabeça de seta preta) e lâmina própria (LP). 32.064x.



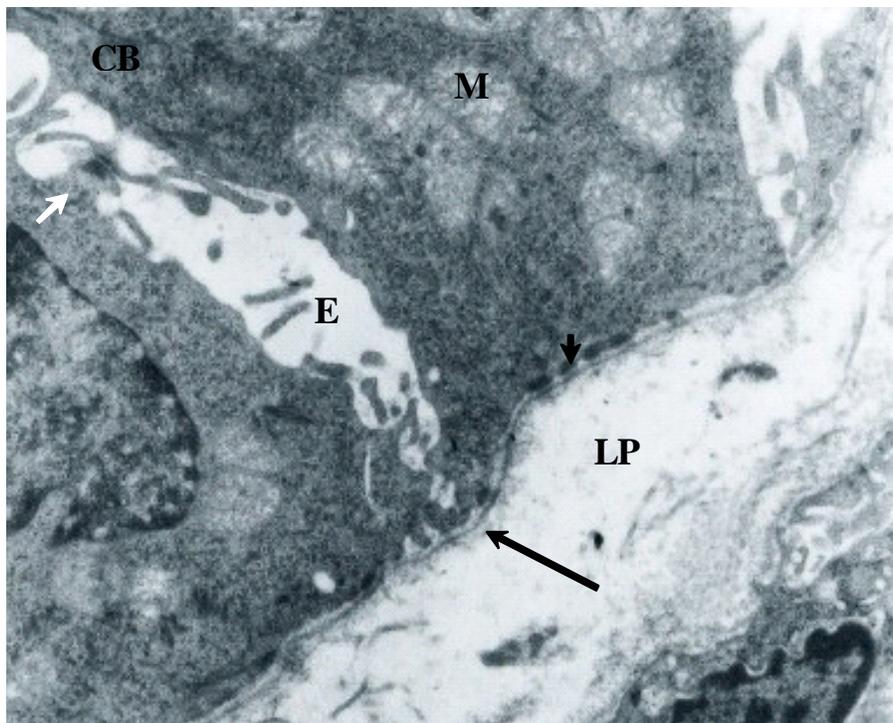
**FIGURA 25:** Micrografia eletrônica da transição da camada espinhosa (CE) para camada granular (CG) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais com salina a 0,9%. A seta indica a presença de grânulos limitados por membrana localizados na superfície apical da célula da camada espinhosa. O espaço intercelular (E) apresenta-se dilatado e contendo material ligeiramente floculento. Observar a presença de célula em degeneração na camada granulosa. 7.760x.



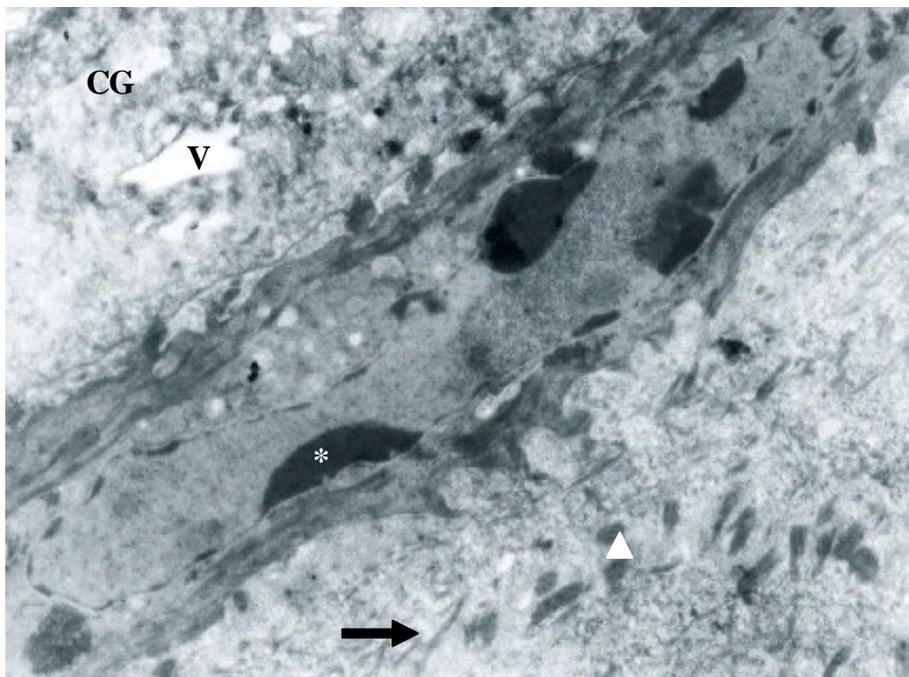
**FIGURA 26:** Micrografia eletrônica das camadas basal (CB) e espinhosa (CE) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais com salina a 0,9%. Observar na camada espinhosa presença de maior quantidade de desmosomos (cabeça de seta branca) unindo uma célula à outra e, espaço intercelular bastante reduzido. Vacúolos (V) e lâmina própria (LP). 6.320x.



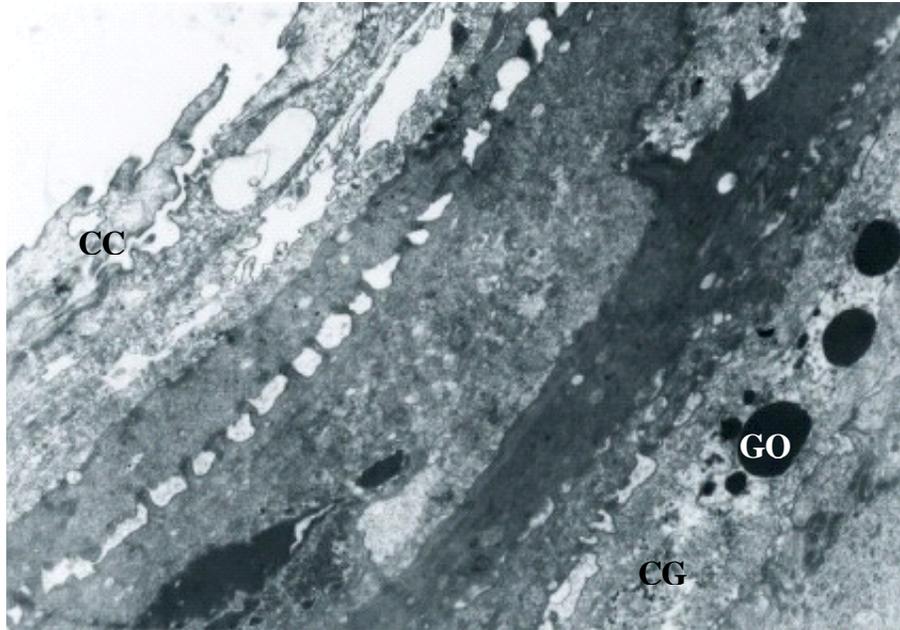
**FIGURA 27:** Micrografia eletrônica das camadas espinhosa (CE), granular (CG) e córnea (CC) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais com salina a 0,9%. Observar célula da camada espinhosa com núcleo alongado e, grande quantidade de grânulos de queratohialina (GQ) espalhados pelo citoplasma das células das camadas granular e córnea. O espaço entre as células granulares apresenta-se amplo e contendo material finamente granular. A seta indica membrana plasmática espessa de célula queratinizada.10.272x.



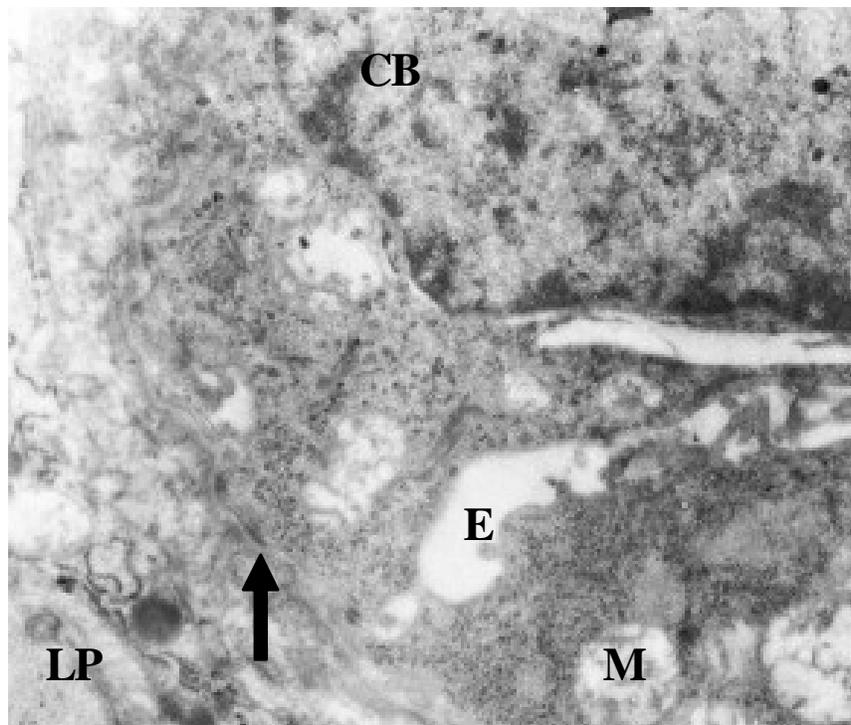
**FIGURA 28:** Micrografia eletrônica da camada basal (CB) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais com propionato. Observar a presença de grande quantidade de mitocôndrias arredondadas e com cristas proeminentes (M), cisternas de retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres e agrupados distribuídos pelo citoplasma da célula basal. Filamentos podem ser visualizados formando desenvolvidos feixes. O espaço intercelular apresenta:se amplo, vazio e com longas interdigitações citoplasmáticas. A seta branca indica a presença de desmosoma unindo duas células vizinhas. A membrana basal apresenta:se íntegra (seta preta) e salpicada por hemidesmosomas (cabeça de seta preta). Lâmina própria (LP). 16.032x.



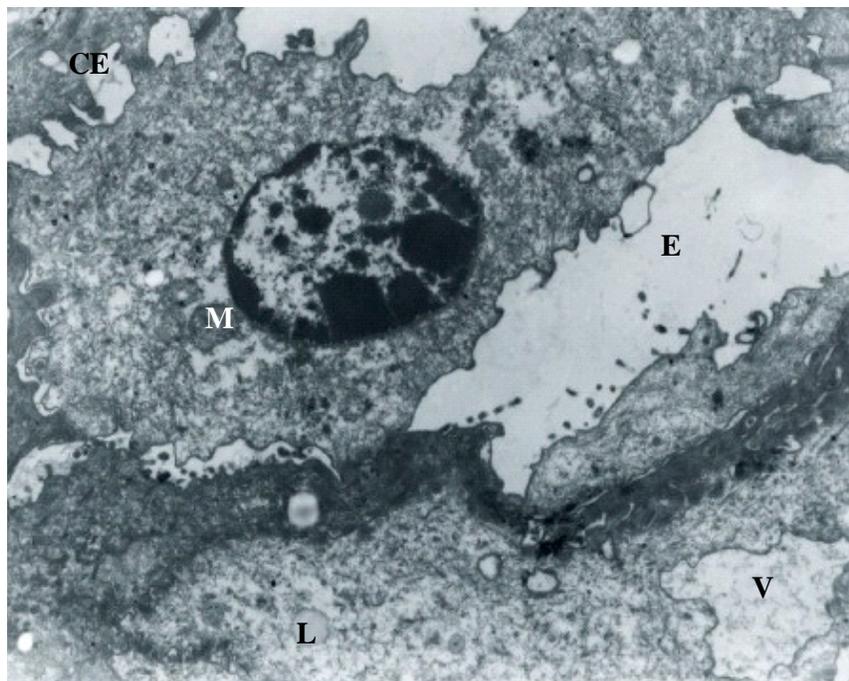
**FIGURA 29:** Micrografia eletrônica da camada granular (CG) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais com propionato. Presença de célula granular com núcleo alongado e apresentando massas compactas de heterocromatina (\*), sugerindo a presença de corpos apoptóticos. A seta indica feixes filamentosos intracitoplasmáticos e a cabeça de seta branca evidencia a presença ainda de desmosomas na camada granular. Vacúolos (V). 12.880x.



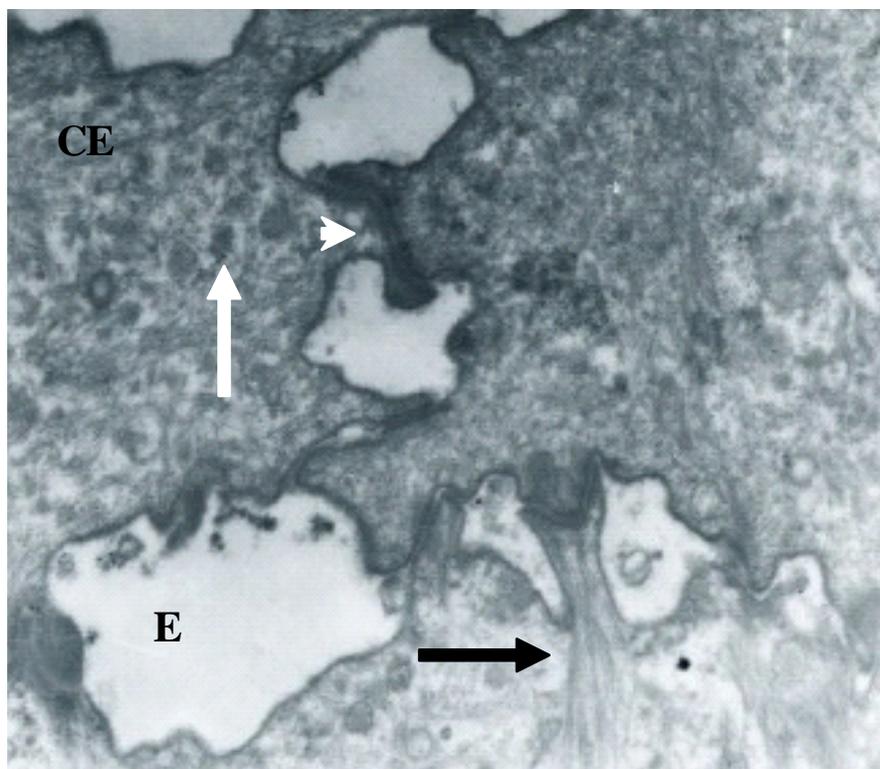
**FIGURA 30:** Micrografia eletrônica da transição da camada granular (CG) para camada córnea (CC) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais com propionato. Células da camada granular mostram-se bastante elétrondensas e contendo grânulos de queratohialina de tamanhos variados. A camada córnea apresenta-se formada por células achatadas com membrana plasmática espessada e preenchidas por material amorfo:filamentoso. 7.760x.



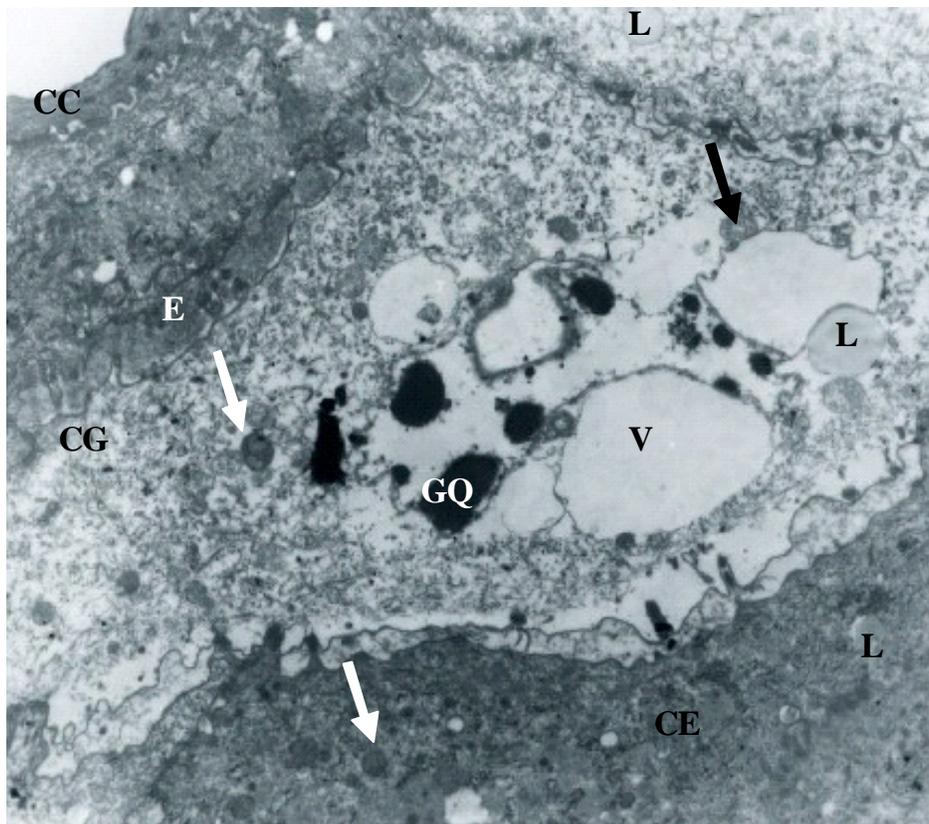
**FIGURA 31:** Micrografia eletrônica da camada basal (CB) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais de lactato. Observar a presença de mitocôndrias de contorno irregular e tumefatas (M). A seta indica a membrana basal pouco nítida e descontínua. Espaço intercelular (E) e lâmina própria (LP). 12.880x.



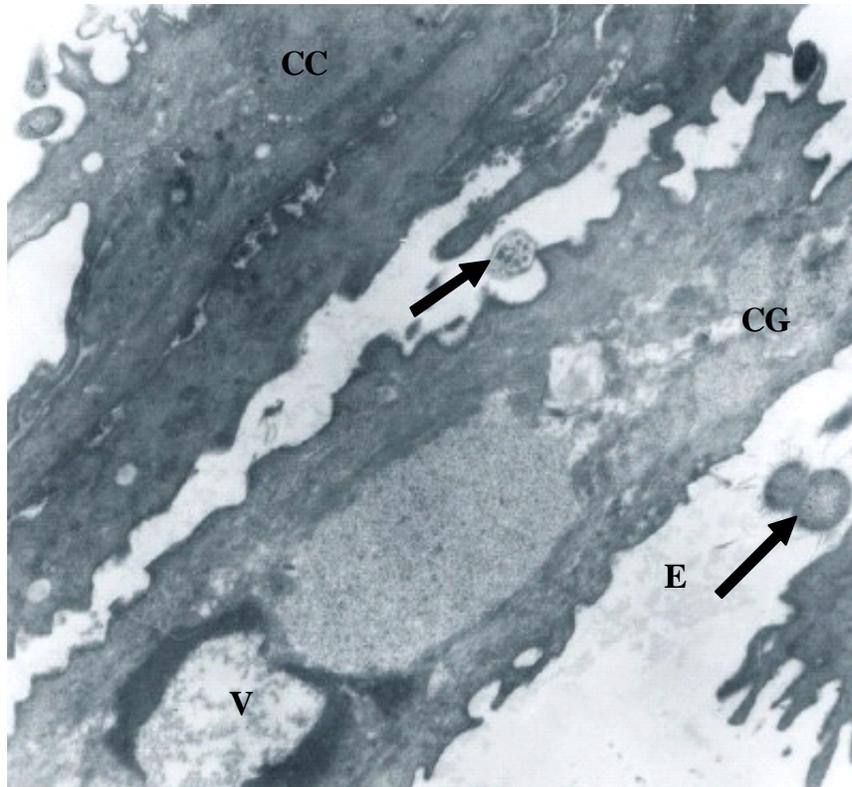
**FIGURA 32:** Micrografia eletrônica da camada espinhosa (CE) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais de lactato. Observar a presença de espaços claros (E) entre as células da camada espinhosa em áreas onde essas células perderam contatos celulares. Visualiza:se na célula espinhosa núcleo de contorno irregular e com heterocromatina formando massas compactas aderidas ao envoltório nuclear. O citoplasma dessas células apresenta:se repleto de material amorfo:fibrilar e com mitocôndrias sofrendo degeneração. Evidenciam:se grandes vacúolos (V) e gotículas lipídicas (L) no citoplasma da célula espinhosa. 7.760x.



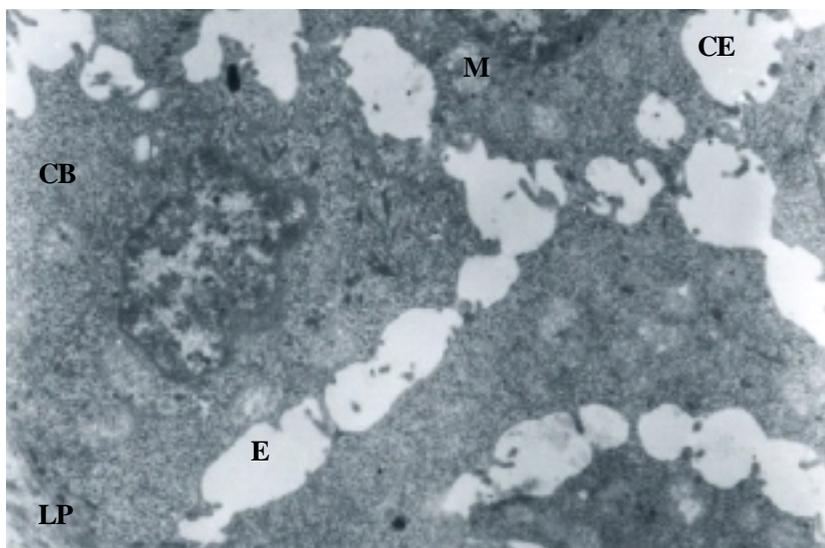
**FIGURA 33:** Micrografia eletrônica da camada espinhosa (CE) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais de lactato. Observar a presença de espaços claros (E) entre as células da camada espinhosa e desmosomas nas regiões de contatos dessas células (cabeça de seta branca). A seta preta indica a presença de filamentos inseridos na placa desmosômica. Presença de grânulos envoltos por membrana intercalados com material amorfo fibrilar intracitoplasmático (seta branca). 16.032x.



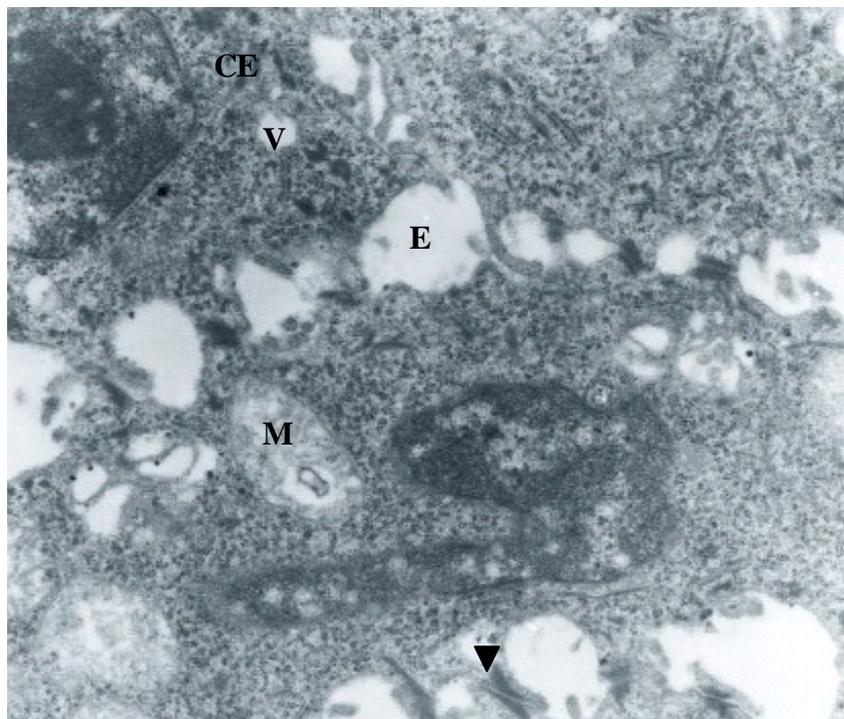
**FIGURA 34:** Micrografia eletrônica das camadas espinhosa (CE), granular (CG) e córnea (CC) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais de lactato. Observar a presença grânulos envoltos por membrana (seta branca) e gotículas lipídicas (L) nos citoplasmas das células espinhosa e granular. Visualizar na célula granular a presença de grandes vacúolos (V) e grânulos de queratohialina (GQ) citoplasmáticos intercalados com material finamente granular. A seta preta indica mitocôndria em degeneração. Na transição com a camada córnea o espaço intercelular (E) torna:se dilatado e preenchido com bastante material elétron:denso. 7.760x.



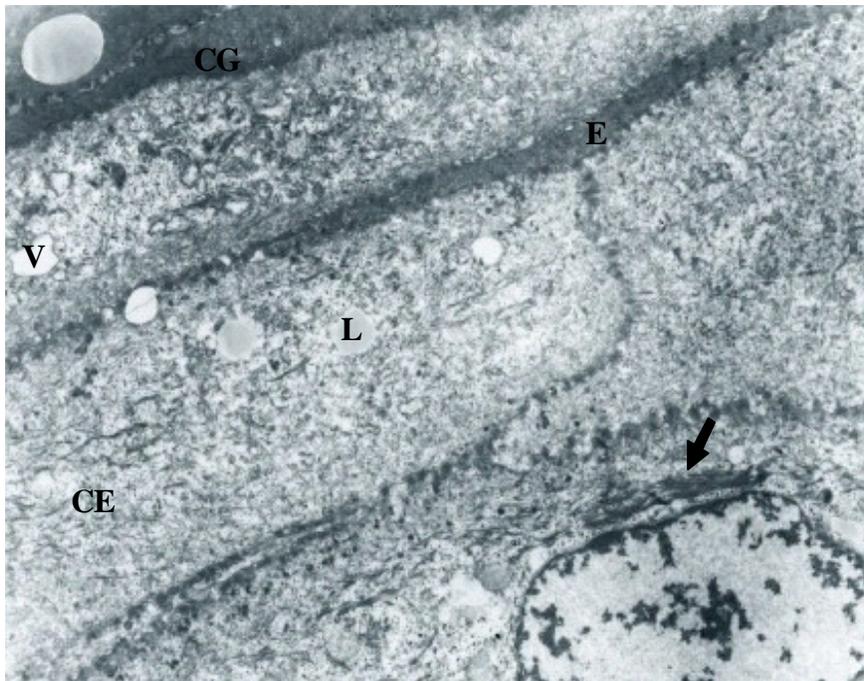
**FIGURA 35:** Micrografia eletrônica das camadas granular (CG) e córnea (CC) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais de lactato. Visualizar no citoplasma da célula granulosa grandes vacúolos (V), restos nucleares e grânulos de queratohialina. A seta indica a presença de estruturas esféricas no espaço intercelular (E), sugerindo a presença de microorganismos ciliados intra:epiteliais. 12.880x.



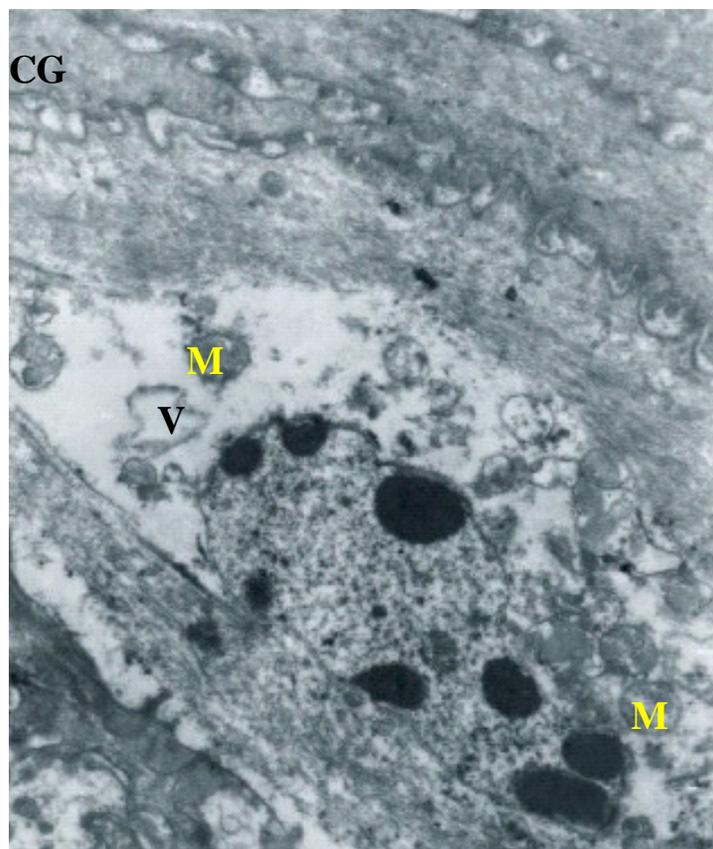
**FIGURA 36:** Micrografia eletrônica das camadas basal (CB) e espinhosa (CE) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais de butirato. Observar a presença de núcleo de contorno irregular e com heterocromatina bastante dispersa na célula basal. Visualizar no citoplasma dessas células grande quantidade de ribossomos livres, filamentos finos e mitocôndrias (M) vacuolizadas. O espaço intercelular mostra:se dilatado e com processos citoplasmáticos estirados. Lâmina própria (LP). 7.760x.



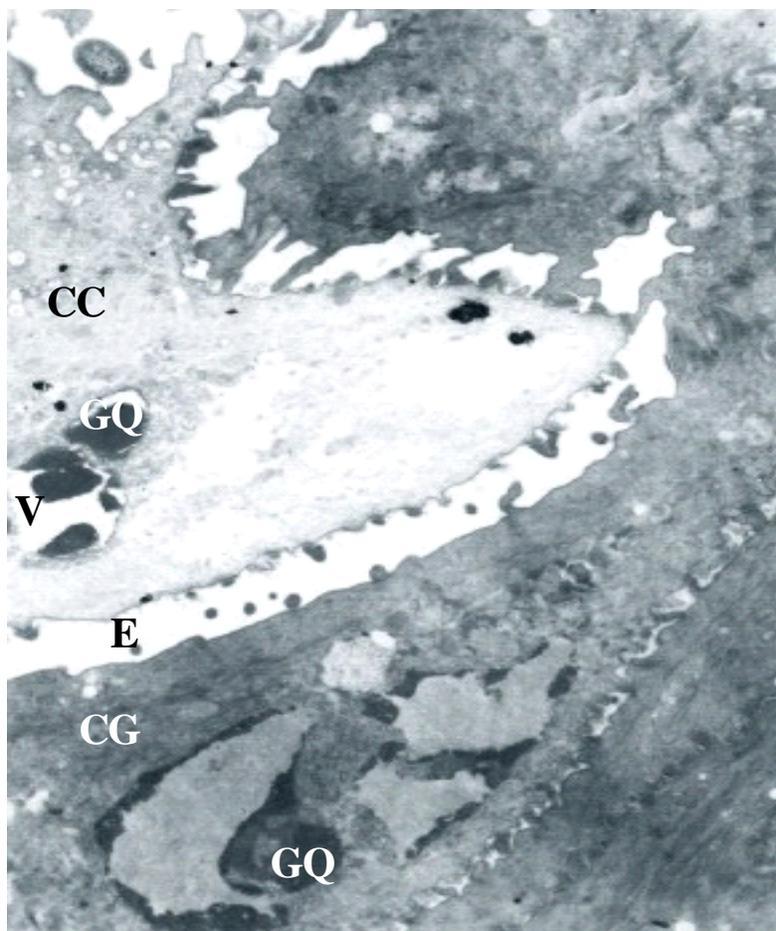
**FIGURA 37:** Micrografia eletrônica da camada espinhosa (CE) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais de butirato. Observar célula espinhosa apresentando núcleo irregular e heterocromatina ligeiramente condensada. O citoplasma mostra grandes quantidades de ribossomos livres e agrupados, cisternas de retículo endoplasmático rugoso, vacúolos (V), e mitocôndrias (M) em degeneração. Desmosomas são evidenciados nas regiões de contatos celulares. Espaço intercelular (E). 4.048x.



**FIGURA 38:** Micrografia eletrônica da transição da camada espinhosa (CE) para camada granular (CG) do epitélio ruminal de bezerro que recebeu infusões intra:ruminais de butirato. Observar células achatadas contendo núcleos com cromatina fragmentada. O citoplasma dessas células mostra feixes de filamentos grosseiros (seta preta) e finos, vacúolos (V), gotículas lipídicas (L) e numerosos ribossomos livres. O espaço intercelular (E) apresenta:se bastante reduzido e contendo material amorfo e elétron:denso. 16.032x.



**FIGURA 39:** Micrografia eletrônica da camada granular (CG) do epitélio ruminal de bezerro recebendo infusões intra:ruminais de butirato. Observar célula granulosa contendo núcleo de contorno irregular e heterocromatina formando massas compactas. O citoplasma evidencia numerosas mitocôndrias em degeneração (M), vacúolos (V) e feixes de filamentos finos dispostos na periferia da célula. 10.272x.



**FIGURA 40:** Micrografia eletrônica das camadas granular (CG) e córnea do epitélio ruminal de bezerro recebendo infusões intra:ruminais de butirato. Visualizam:se grânulos de queratohialina associados à grandes vacúolos (V) e restos de organelas no citoplasma das células das camadas granulosa e córnea. Espaço intercelular (E). 7.760x.