

**MORFOMETRIA RUMINAL E EFEITO DO pH E DO
VOLUME DA DIGESTA SOBRE A ABSORÇÃO
DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS**

LEANDRA QUEIROZ DE MELO

2007

LEANDRA QUEIROZ DE MELO

**MORFOMETRIA RUMINAL E EFEITO DO pH E DO VOLUME DA
DIGESTA SOBRE A ABSORÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS**

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

Orientador

Prof. Marcos Neves Pereira

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

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

Melo, Leandra Queiroz de

Morfometria ruminal e efeito do pH e do volume da digesta sobre a absorção
de ácidos graxos voláteis / Leandra Queiroz de Melo. -- Lavras: UFLA, 2007.
60 p.: il.

Orientador: Marcos Neves Pereira.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Rúmen. 2. Superfície Absortiva. 3. Valerato-CrEDTA. 4. Bovinos. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-636.20855

LEANDRA QUEIROZ DE MELO

**MORFOMETRIA RUMINAL E EFEITO DO pH E DO VOLUME DA
DIGESTA SOBRE A ABSORÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS**

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

Aprovada em 28 fevereiro de 2007.

Prof. Dr. Mário César Guerreiro - UFLA

Prof^a. Dra. Sandra Gesteira Coelho - UFMG

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

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

Dedico

Aos meus pais, Antônio e Maria Helena, e
Aos meus irmãos, Leonardo e Letícia.

Sem vocês nada disso seria possível. Esta conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e pelas oportunidades.

Aos meus pais, Antônio e Maria Helena, aos meus irmãos, Leonardo e Letícia, e ao Ricardo pelo apoio, compreensão e incentivo. Obrigada por tudo sempre.

Ao Professor Marcos Neves Pereira pelo aprendizado e por dedicar parte do seu precioso tempo à minha orientação.

Aos amigos João Luiz, Fernanda, Rooveth e Bruno Zambelli pela imensa colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela confiança e pelo companheirismo.

A Cristina, Bruno e Flávio Costa pela amizade e pelo apoio.

Aos Professores João Chrysostomo de Resende Júnior e Suely de Fátima Costa pela amizade, co-orientação e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Química, em especial ao Professor Mário César Guerreiro, pela grandiosa colaboração nas análises. Obrigada pela paciência e pela dedicação.

Ao Grupo do Leite, especialmente Pedro Henrique e Fernando, pela ajuda na coleta de dados.

A todos os técnicos do Laboratório de Nutrição Animal - DZO, principalmente ao Márcio, e ao “Borginho” e equipe.

Às Fazendas Palmital - FAEPE e São Francisco, ao Departamento de Zootecnia da UFLA e à Escola de Veterinária da UFMG pela liberação dos animais para condução de parte do experimento.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Morfologia do estômago dos ruminantes	4
2.2 Absorção de AGV	5
2.2.1 Absorção de AGV e morfologia ruminorreticular	12
2.3 Osmolaridade, efluxo e influxo de água no ruminorretículo	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Delineamento e unidades experimentais	28
3.2 Tratamentos	28
3.3 Taxa de absorção de valerato pela parede do rúmen	29
3.4 Morfologia das papilas do rúmen	32
3.5 Análise estatística	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5 CONCLUSÕES	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMO

MELO, Leandra Queiroz de. **Morfometria ruminal e efeito do pH e do volume da digesta sobre a absorção de ácidos graxos voláteis**. 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Os efeitos do volume e do pH da digesta sobre a absorção de ácidos graxos voláteis (AGV) e sua correlação com a morfologia da parede ruminal foram avaliados. Nove vacas fistuladas formaram três condições. “Alto”, com vacas Holandesas produzindo 25,9 kg/d de leite e alimentadas com Dieta Completa rica em grãos. “Médio”, com vacas Girolando produzindo 12,3 kg/d e alimentadas com silagem de milho, pastagem tropical e concentrado comercial. “Secas”, com vacas Jersey não lactantes e alimentadas exclusivamente a pasto. O objetivo foi obter disparidade na morfologia ruminal entre as condições. Dentro de cada condição, uma seqüência de três tratamentos foi aplicada a cada vaca em delineamento do tipo Quadrado Latino 3x3, com períodos de sete dias: Volume Alto, pH Alto (VAPA); Volume Baixo, pH Alto (VBPA) e Volume Baixo, pH Baixo (VBPB). Volume Alto foi obtido pelo retorno para o rúmen de toda a digesta evacuada e Volume Baixo pelo retorno de apenas 25 kg. Baixo pH foi obtido pela adição de uma solução de H₂SO₄ a 50%, capaz de reduzir o pH ruminal para cinco (170 ml, em média). A mucosa ruminal foi biopsiada no dia um do primeiro período experimental. A morfometria ruminal envolveu quatro variáveis macroscópicas e quatro microscópicas. A absorção de AGV do rúmen foi estimada pela técnica de Valerato-CrEDTA. A digesta com os marcadores foi retornada depois que o óstio retículo-omasal foi obstruído com uma esponja. A taxa fracional de queda na concentração ruminal de valerato dividida pela concentração de Cr (k Val/Cr) foi estimada por amostragens da digesta a cada vinte minutos, por quatro horas. Houve grande variabilidade na morfologia ruminal entre os grupos de animais. As vacas Holandesas em melhor plano nutricional tiveram maiores área de superfície absorptiva e índice mitótico das células da camada basal do epitélio ruminal, e menores espessuras do epitélio e da camada queratinizada. As médias dos pH ruminais ao longo do período de amostragem de quatro horas foram: 6,78 para VAPA, 7,08 para VBPA e 5,90 para VBPB ($P < 0,01$). Os valores de k Val/Cr para os tratamentos VAPA, VBPA e VBPB foram, respectivamente (% h⁻¹): 19,6; 23,9 e 35,0 (EPM = 2,01; $P = 0,21$ para o contraste VAPA vs VBPA e $P < 0,01$ para o contraste VBPA vs VBPB). O *clearance* ruminal de valerato por absorção foi mais rápido em pH baixo, enquanto a redução no volume da digesta em alto pH não induziu resposta tão

¹ **Comitê Orientador:** Prof. Marcos Neves Pereira – UFLA (Orientador), Prof. João Chrysostomo de Resende Júnior – UFLA e Prof^a. Suely de Fátima Costa – UFLA.

acentuada. A correlação entre a área de superfície absorptiva por cm^2 de parede ruminal e a média entre os três valores de k Val/Cr de cada animal foi 0,90 ($P < 0,01$). Vacas capazes de manter um ambiente ruminal menos ácido tiveram mucosa ruminal mais desenvolvida, foram mais eficientes em absorver AGV e tiveram maior influxo endógeno de água para a cavidade digestiva.

ABSTRACT

MELO, Leandra Queiroz de. **Rumen morphometrics and the effect of digesta pH and volume on volatile fatty acid absorption.** 2007. 60 p. Dissertation (Master Program in Veterinary Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

The effects of digesta volume and pH on volatile fatty acids (VFA) absorption, and its correlation with rumen wall morphology, were evaluated. Nine fistulated cows formed three conditions. “High” had Holsteins, averaging 25.9 kg/d of milk, and fed on a high grain TMR. “Medium” had Holstein-Zebu crossbreds, yielding 12.3 kg/d, and fed on corn silage, tropical pasture and a commercial concentrate. “Dry” had non-lactating, grazing Jerseys, and fed tropical pasture exclusive. The aim was to obtain disparity in rumen morphology among conditions. Within each condition, a sequence of three treatments was applied to each cow in 3x3 Latin Squares, with seven-day periods: High Volume, High pH (HVHP); Low Volume, High pH (LVHP); and Low Volume, Low pH (LVLP). High Volume was obtained by putting back the whole evacuated rumen digesta, and Low Volume by returning only 25 kg. Low pH was obtained with a 50% H₂SO₄ solution, capable of decreasing rumen pH to five (170 ml, on average). Rumen mucosa was biopsied on day one of period one. Rumen morphology involved four macroscopic and four microscopic variables. Rumen VFA absorption was estimated by the Valerate-CrEDTA technique. Digesta with markers were returned after closing the reticulum-omasum orifice with a sponge. The exponential decay rate in rumen valerate to Cr ratio ($k_{\text{Val/Cr}}$) was estimated with digesta samples obtained every 20-minute for four hours. There was strong rumen morphology variability among the groups of cows. Well fed Holsteins had increased rumen wall absorptive surface area and basal cells mitotic index, and decreased thickness of the epithelium and of the keratin layer. Mean rumen pH throughout the four hour sampling period were: 6.78 for HVHP, 7.08 for LVHP and 5.90 for LVLP ($P < 0.01$). The $k_{\text{Val/Cr}}$ values for treatments HVHP, LVHP and LVLP were, respectively ($\% \text{ h}^{-1}$): 19.6, 23.9 and 35.0 (SEM=2.01; $P=0.21$ for contrast HVHP vs. LVHP and $P < 0.01$ for contrast LVHP vs. LVLP). Rumen valerate clearance by absorption was faster in low pH, while decreasing digesta volume in high pH did not elicit such a response. The correlation between the absorptive surface area per cm² of rumen wall, and the mean of the three $k_{\text{Val/Cr}}$ values of each cow was 0.90 ($P < 0.01$). Cows capable of maintaining a less acidic rumen environment had a more developed rumen

¹ **Graduate Committee:** Prof. Marcos Neves Pereira – UFLA (Major Professor), Prof. João Chrysostomo de Resende Júnior – UFLA and Prof^a. Suely de Fátima Costa – UFLA.

mucosa, were more efficient to absorb VFA, and had a greater influx of water to the digestive cavity.

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 destes animais pode ser atendida por acetato, propionato e butirato (Bergman, 1990). Alta taxa de produção e absorção de AGV é requerida para suprir a demanda nutricional de bovinos mantidos em várias das condições comerciais de produção. Em vacas leiteiras de alta produção, a concentração ruminal de AGV foi negativamente correlacionada à capacidade de absorção destes ácidos (Voelker & Allen, 2003). Assim, a manutenção de um ambiente ruminal menos ácido e, portanto, compatível com a manutenção de processos digestivos fisiologicamente eficientes em ruminantes consumindo dietas de alta fermentabilidade, é diretamente dependente da capacidade de absorção da parede do rúmen.

A remoção (*clearance*) de AGV no ambiente ruminal ocorre por dois processos: absorção pela parede do órgão e passagem com a fase fluida ruminal pelo óstio retículo-omasal (Peters et al., 1990). Entender estes processos é importante para melhor compreender a fisiologia ruminal de bovinos. Para determinar a taxa de absorção de AGV diversas técnicas têm sido utilizadas, como coleta de sangue na veia porta e suas tributárias visando mensurar o aparecimento de AGV no sangue (Huntington et al., 1983), infusão intra-ruminal de AGV marcado com isótopos radioativos (Rowe et al., 1979) ou isótopos estáveis (Kristensen, 2001; Nozière et al., 2000), evacuação ruminal e introdução de uma solução de AGV no rúmen lavado (Dijkstra et al., 1993) ou infusão contínua de AGV não marcado em rúmen não evacuado (Peters et al., 1990).

Uma técnica para mensurar o *clearance* ruminal de AGV é baseada no desaparecimento, ao longo do tempo, de uma dose de valerato infundida em

tempo único no rúmen (Allen et al., 2000). O valerato é um dos AGV produzidos naturalmente no ambiente ruminal (Gray et al., 1952). Trata-se de um ácido carboxílico de cinco carbonos, presente em baixas concentrações na digesta e que parece não ser significativamente metabolizado pelos microorganismos ruminais (Allen et al., 2000; Resende Júnior et al., 2006b). As vantagens dessa técnica são baixo custo, simplicidade operacional, baixa invasividade e possibilidade de estimar taxas fracionais de *clearance* de AGV por passagem e absorção mais próximas do fisiológico, pois utiliza infusões diluídas no próprio conteúdo ruminal e pode utilizar animais com alta ingestão de alimentos.

Os efeitos do comprimento da cadeia de carbono (Barcroft et al., 1944), da concentração de AGV (Dijkstra et al., 1993; López et al., 2003; Weigand et al., 1971), da superfície absorptiva (Dirksen et al., 1985), do pH (Dijkstra et al., 1993; Kramer et al., 1996; Sehested et al., 1999a) e do volume ruminal (Dijkstra et al., 1993) sobre a taxa de absorção de AGV têm sido objeto de estudos. Entretanto, os resultados têm sido conflitantes, já que diferentes técnicas experimentais são utilizadas. Muitos experimentos também são conduzidos com ovinos, não podendo ser descartada a possibilidade de diferença inter-espécie na fisiologia ruminal, comparativamente a um bovino.

Dominar técnicas de mensuração da morfologia ruminal e gerar estimativas acuradas da capacidade de absorção deste órgão são necessárias para o estudo da acidose ruminal em bovinos. A correlação entre mensurações de absorção e mensurações morfológicas pode auxiliar na compreensão da etiologia dos distúrbios metabólicos ligados à acidose.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do volume e do pH da digesta ruminal sobre a absorção de AGV do ruminorretículo de bovinos e correlacionar mensurações de absorção com mensurações morfológicas. Neste caso, não se objetiva estudar determinada situação produtiva, mas compreender

as características morfológicas determinantes da capacidade ruminal de absorver AGV. A coerência nos resultados servirá para validar a sensibilidade da técnica utilizando valerato como marcador de absorção a variações nas características ruminais. Espera-se que as taxas fracionais de absorção de valerato sejam maiores em baixo volume e em baixo pH ruminais, validando a técnica de mensuração de absorção com marcador inserido em conteúdo ruminal intacto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Morfologia do estômago dos ruminantes

O estômago dos ruminantes é composto por quatro compartimentos morfológicamente distintos, os três primeiros, rúmen, retículo e omaso, correspondem à parte aglandular, e o abomaso é o compartimento glandular (Dellmann & Brown, 1982). O rúmen é marcado externamente por sulcos que correspondem internamente aos pilares. Estes dividem o órgão em sacos cranial, ventral, dorsal, cego caudo-dorsal e cego caudo-ventral. A extremidade cranial do saco ventral é denominada recesso do rúmen (Nickel et al., 1981).

A parede da porção aglandular é constituída por quatro túnicas que são denominadas, a partir do lúmen do órgão em direção a cavidade abdominal, de mucosa, submucosa, muscular e serosa (Dellmann & Brown, 1982). A mucosa é composta por epitélio de revestimento estratificado pavimentoso queratinizado, que está apoiado na lâmina própria. O epitélio que reveste os compartimentos aglandulares é formado por quatro camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea ou queratinizada, sendo a última voltada para o lúmen do órgão. A camada basal é a parte germinativa do epitélio, onde ocorre a proliferação celular para crescimento e renovação epitelial, expressa por alta atividade mitótica (Pereira, 1997). A lâmina própria é de natureza conjuntiva e altamente vascularizada. As papilas ruminais são projeções da túnica mucosa para o lúmen do órgão e são responsáveis por aumentar a área de superfície de contato, ou seja, a área de troca entre o conteúdo ruminal e a corrente sanguínea.

2.2 Absorção de AGV

Os AGV, compostos com elevado conteúdo calórico por unidade de massa, são produzidos no ruminorretículo majoritariamente a partir da fermentação microbiana de carboidratos, e juntamente com proteínas oriundas da biomassa microbiana, são as principais fontes de nutrientes para o ruminante. A concentração de AGV no rúmen reflete o balanço entre a produção e a remoção. O *clearance* de AGV do rúmen ocorre por passagem com a fase fluida para o omaso ou por absorção através da parede ruminal (Dijkstra et al., 1993; López et al., 2003; Peters et al., 1990; Resende Júnior et al., 2006b). A concentração de AGV no sangue oriundo do rúmen e do retículo é bem próxima, enquanto a concentração no sangue omasal é mais baixa, sendo quase nula nos vasos que drenam o abomaso (Barcroft et al., 1944).

A concentração de AGV no fluido ruminal é bastante variável, podendo oscilar circadianamente de 70 a 150 mM em vacas de alta produção leiteira (Pereira & Armentano, 2000), além de ser dependente da composição da dieta e do tempo após a alimentação. Em dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis este valor pode atingir 200 mM, porém em dietas à base de forragens fica abaixo de 100 mM (Bergman, 1990). O pico de concentração ocorre geralmente entre 10 e 14 horas após a primeira alimentação do dia em vacas leiteiras alimentadas com dieta completa de alto conteúdo energético e fornecida uma (Pereira & Armentano, 2000) ou duas vezes ao dia (Salvador et al., no prelo). Os ácidos acético, propiônico e butírico são os principais AGV (Gray et al., 1952), e a proporção molar deles no fluido ruminal varia de aproximadamente 75 : 15 : 10 a 40 : 40 : 20 dependendo da dieta (Bergman, 1990). Outros AGV menos predominantes são os ácidos fórmico, isobutírico, valérico, capróico, heptanóico (Gray et al., 1952), isovalérico, 2-metilbutírico e

hexanóico (Bergman, 1990). Além de afetar o perfil e a concentração de AGV, a composição da dieta também pode afetar o pH ruminal (Weigand et al., 1975).

Os AGV são absorvidos pela parede do rúmen na forma ionizada, ou dissociada, e na forma protonada, ou não dissociada (Gäbel et al., 2002; Kramer et al., 1996). Como o pK dos AGV é $\leq 4,8$ (Fukushima, 1995) e o pH ruminal geralmente está entre 5,5 e 7,0, de 83 a 99% dos AGV estão na forma iônica, de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch. Com baixos valores de pH os AGV são mais rapidamente absorvidos, sendo a diferença na velocidade de absorção proporcionalmente maior naqueles com cadeias maiores (Dijkstra et al., 1993).

Uma fonte de prótons H^+ para o lúmen ruminal ocorre pelo mecanismo de troca iônica envolvendo sódio (Na^+) (FIGURA 1). O Na^+ da digesta ruminal é absorvido pela célula epitelial e o H^+ é liberado para o rúmen (Gäbel et al., 2002). Através da bomba $Na^+ - potássio (K^+)$, com gasto energético proporcionado pela ATPase, ocorre a saída de Na^+ para o conjuntivo e a entrada de K^+ para dentro da célula epitelial. O K^+ que entrou sai passivamente da célula para o conjuntivo (Sehested et al., 1999b). Os H^+ liberados para o rúmen através da troca iônica com o Na^+ vão protonar os AGV ionizados (Gäbel et al., 2002; Sehested et al., 1999b). Estes H^+ são oriundos da dissociação do ácido carbônico (H_2CO_3). A produção de H_2CO_3 é catalisada pela anidrase carbônica intracelular, a partir de gás carbônico (CO_2) e água (H_2O) (Gäbel et al., 2002). O CO_2 da célula epitelial vem do sangue, do conteúdo ruminal (Carter & Grovum, 1990a) e do metabolismo de AGV intracelular (Gäbel et al., 2002).

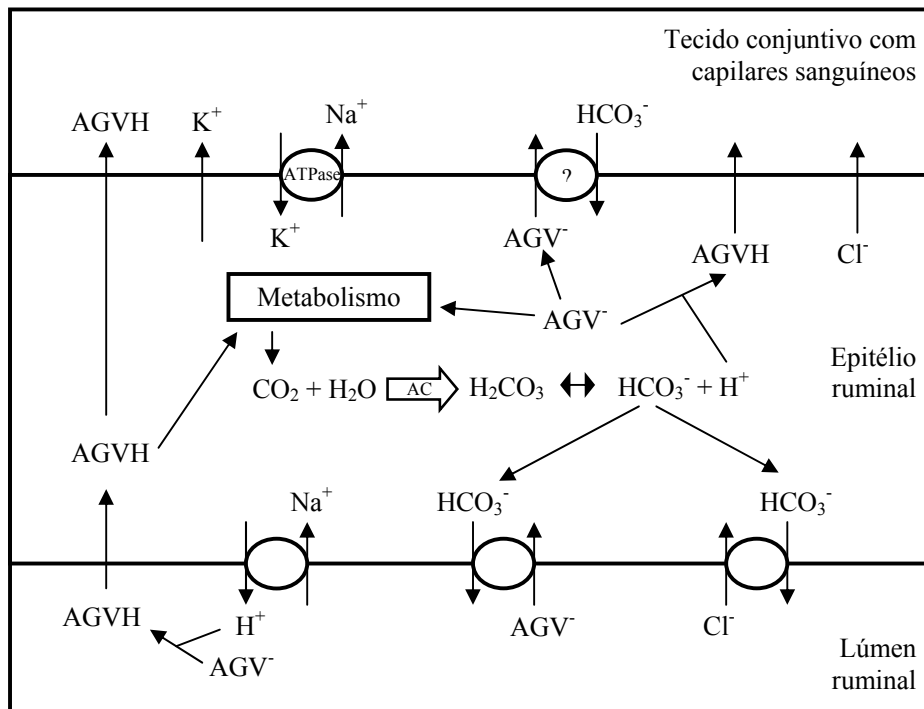


FIGURA 1 – Esquema da absorção ruminal de AGV na forma protonada (AGVH) por difusão e na forma dissociada (AGV⁻) através de troca iônica (O) com bicarbonato (HCO₃⁻), AC = anidrase carbônica

Os AGV do lúmen ruminal atravessam a membrana da célula epitelial na forma protonada por difusão e na forma ionizada por um mecanismo de troca iônica envolvendo bicarbonato (HCO₃⁻) (Gäbel et al., 2002; Kramer et al., 1996; Sehested et al., 1999b) (FIGURA 1). O HCO₃⁻ é derivado a partir da dissociação do H₂CO₃. O HCO₃⁻ é liberado para o lúmen ruminal e o AGV na forma ionizada é absorvido (Gäbel et al., 2002; Kramer et al., 1996). Esta troca de AGV iônico por HCO₃⁻ explica o desaparecimento de AGV e o aparecimento de HCO₃⁻ no lúmen ruminal. Outro mecanismo para liberação de HCO₃⁻ para o lúmen ruminal é por meio da troca iônica com cloro (Cl⁻) (FIGURA 1). O Cl⁻ é absorvido pela célula epitelial e passa passivamente para o conjuntivo (Sehested et al., 1999b).

Na célula epitelial os AGV são metabolizados, formando β -hidroxibutirato, aceto-acetato, lactato e CO_2 , ou atravessam-na em direção ao tecido conjuntivo vascularizado (FIGURA 1). A passagem de AGV ionizados da célula epitelial para o conjuntivo é pouco conhecida (Gäbel et al., 2002; Sehested et al., 1999b). Parece que ela ocorre através de troca iônica envolvendo HCO_3^- oriundo do sangue (Sehested et al., 1999b).

Segundo Gäbel et al. (2002), a transferência trans-epitelial de AGV na forma protonada, do fluido ruminal para o sangue, contribui diretamente para manter mais elevado o pH intra-ruminal, já que prótons são absorvidos junto com os AGV. Distintamente, a absorção de AGV na forma iônica poderia induzir uma queda no pH do fluido ruminal, pois prótons ficam no rúmen e os AGV não protonados, que são bases fracas, são absorvidos. No entanto, juntamente com a absorção de AGV na forma iônica ocorre liberação de bicarbonato para o lúmen ruminal, evitando uma possível queda no pH (Gäbel et al., 2002; Kramer et al., 1996).

Normalmente, o acúmulo de AGV no rúmen não é suficiente para induzir queda drástica no pH do fluido (Owens et al., 1998). Entretanto, quando a taxa de produção de AGV excede a taxa de remoção, devido a rápida produção, absorção inibida, redução na diluição ou queda na taxa de passagem de fluidos do rúmen, pode ocorrer acúmulo de todos os AGV e, conseqüentemente, queda no pH a valores abaixo de cinco, caracterizando um quadro de acidose ruminal. Alta acidez ruminal e hipertonicidade do conteúdo ruminal ocorrem na acidose, e podem promover alterações ultra-estruturais no epitélio ruminal e descamação epitelial associada com ruminite (Costa, 2003; Gálfi et al., 1986).

A infusão de AGV em rúmen evacuado e lavado de ovinos induziu aumento na concentração de acetato, propionato e butirato no sangue, mostrando que ocorre absorção de AGV pelo ruminorretículo (Barcroft et al., 1944). Destes

que são absorvidos no ruminorretículo, grande parte é metabolizada pelo epitélio ruminal durante a absorção e o transporte até o sangue. A ordem decrescente de metabolização dos AGV é acetato, propionato e butirato (Barcroft et al., 1944; Sehested et al., 1999a; Sutton et al., 1963). Cerca de 90% do butirato é metabolizado pelo epitélio ruminal (Bergman, 1990; Sehested et al., 1999a). O epitélio ruminal é considerado como um órgão metabólico entre a digesta ruminal e a circulação sanguínea (Dirksen et al., 1985).

Dijkstra et al. (1993) avaliaram a absorção de AGV em rúmen evacuado e lavado com infusão única de solução marcadora. Uma desvantagem desta técnica é o aumento rápido do pH ruminal devido à absorção de AGV e por não haver digesta para fermentação. Foram utilizadas duas vacas lactantes com cânulas ruminais para testar 24 soluções, sendo três níveis de concentração individual de AGV (100, 50, 20 mM; 20, 100, 50 mM e 50, 20, 100 mM de acetato, propionato e butirato, respectivamente, totalizando 170 mM por solução), quatro níveis de pH (4,5; 5,4; 6,3 e 7,2) e dois volumes de infusão (10 e 30 litros). O marcador de fase fluida utilizado foi o CoEDTA. Após a evacuação do rúmen, este foi lavado com água e, em seguida, com a solução experimental à temperatura corporal, e a ele adicionada a solução a ser testada. As amostras de fluido ruminal foram coletadas a cada dez minutos, durante uma hora a partir da infusão da solução. A osmolaridade média inicial foi 392 mOsmol, reduzindo para 288 mOsmol após uma hora de coleta. Após o período de coleta, o fluido ruminal foi evacuado para mensuração do volume.

O volume final de fluido, que é resultado do volume inicial, do influxo de água e da saída por passagem, foi afetado pelo volume inicial e pelo pH; maior pH inicial e maior volume inicial resultaram em maior volume final (Dijkstra et al., 1993). A taxa fracional de passagem não foi afetada pelo pH ou pelo volume. Em pH alto a maioria dos AGV está na forma iônica, de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch. Sabe-se que a absorção por difusão

ocorre na forma protonada (Kramer et al., 1996); então, em pH alto ocorreu menor absorção de AGV, mantendo a osmolaridade mais alta, já que os AGV são os principais determinantes da osmolaridade (Dobson et al., 1976), e por isto houve maior influxo de água para dentro do rúmen, aumentando o volume final. De acordo com Carter & Grovum (1990a), houve influxo de água significativo quando a osmolaridade ruminal foi superior a 370 mOsmol. O pH final e a taxa fracional de absorção de todos os AGV e, provavelmente, a secreção de HCO_3^- para dentro do rúmen, foram menores na solução com volume inicial de 30 litros que na de 10 litros, evidenciando novamente que no volume alto houve maior acúmulo de AGV, também refletido por maiores valores de osmolaridade final e, conseqüentemente, maior influxo de água para o ruminorretículo.

A taxa fracional de absorção de propionato e butirato foi significativamente alta com baixos valores de pH inicial, mas a taxa fracional de absorção de acetato não foi afetada pelo pH inicial (Dijkstra et al., 1993). Como os valores de osmolaridade reduziram durante o tempo de infusão, o fluxo de água também reduziu durante este período. A absorção de AGV ocorre por difusão e a taxa depende do gradiente de concentração e da extensa metabolização destes ácidos pelas células epiteliais, principalmente propionato e butirato. A taxa de absorção menor para o volume de infusão maior pode ser resultado de menor contato da digesta ruminal, portanto dos AGV, com a mucosa ruminal, reduzindo a taxa de difusão. Altos valores de osmolaridade ruminal, conseqüentes principalmente de AGV em excesso, podem inibir a motilidade ruminal (Bergman, 1990; Carter & Grovum, 1990b) e, assim, reduzir a absorção, pois menos AGV entram em contato com a mucosa, e a passagem de AGV para o omaso. Houve efeito significativo da concentração de acetato na solução sobre a taxa fracional de absorção; quando 50 mM foram adicionados à solução a absorção foi maior que para 20 mM. As taxas fracionais de absorção de propionato tenderam a aumentar com a redução na concentração deste ácido

na solução, já as taxas fracionais do butirato não foram afetadas pela concentração. Dentre os AGV majoritários, a absorção de butirato parece ser a menos saturável.

Bennink et al. (1978) observaram que aumento na concentração ruminal de AGV provocou queda no pH ruminal. Kramer et al. (1996) investigaram a absorção de AGV pelo epitélio ruminal de carneiros *in vitro*, por meio da câmara de Ussing. A redução do pH da solução de incubação do epitélio, de 7,5 para 6,5, aumentou a concentração de AGV protonados e o fluxo de propionato da mucosa para a serosa. Segundo Weigand et al. (1971), em novilhas, os ácidos acético, propiônico e butírico foram mais absorvidos em pH 4,8 que 7,2. A taxa fracional de absorção no pH 4,8 foi butirato maior que propionato, que foi maior que acetato. Quando a concentração de AGV aumentou de 75 para 150 mM o fluxo de absorção praticamente dobrou, mas a taxa fracional de absorção não foi afetada, similar ao observado por López et al. (2003). López et al. (2003) e Perrier et al. (1994) também observaram taxa fracional de absorção de butirato maior que propionato, e este maior que acetato em ovinos. Sehested et al. (1999a) observaram menor fluxo de acetato e propionato que de butirato e aumento significativo no transporte de todos os AGV com redução do pH, em fragmento de epitélio ruminal isolado de bovinos por meio da técnica da câmara de Ussing. Resende Júnior et al. (2006b) observaram, em vacas leiteiras, que a taxa fracional de absorção de propionato foi semelhante à do acetato e maior que a do butirato.

Aumento da quantidade de carboidrato rapidamente fermentável, com redução simultânea da ingestão de forragem, resulta em queda da secreção salivar e, portanto, menor influxo de tampão para o rúmen. Com maior produção de AGV, há queda do pH. Então, como resposta a mais AGV, o epitélio ruminal prolifera e aumenta a absorção, prevenindo o acúmulo de ácidos e aumentando o

pH. Maior quantidade de AGV absorvida significa mais energia para suprir as exigências nutricionais do animal (Dirksen et al., 1985).

2.2.1 Absorção de AGV e morfologia ruminorreticular

Zitnan et al. (1993) avaliaram a concentração de AGV e o desenvolvimento do epitélio ruminal em cordeiros desde o nascimento até a décima semana de vida. A concentração de AGV aumentou significativamente com a idade, passou de 28,5 mM na primeira semana de vida para 117,4 mM na décima semana. O tamanho e as características da superfície das papilas ruminais variaram drasticamente durante as dez semanas. Na primeira e na quarta semanas a superfície das papilas estava lisa e as células epiteliais delgadas e pavimentosas. Na sexta e na décima semanas as papilas apresentavam-se tipicamente rugosas.

Sakata & Tamate (1979) realizaram biópsia de papilas ruminais de quatro carneiros adultos que receberam infusão intra-ruminal de acetato, propionato e butirato através da fistula ruminal. Para avaliar a capacidade mitogênica dos ácidos, foi realizada a mensuração do índice mitótico (IM) das células epiteliais das papilas ruminais. Antes da infusão dos ácidos o IM foi menor que 0,53%. Após dois a quatro dias de infusão de propionato o IM atingiu o pico máximo, que foi 1,57% na média dos quatro animais (1,64; 1,38; 1,73 e 1,54%), e depois do quarto dia de infusão diminuiu. O IM com o acetato também aumentou e depois reduziu, atingindo os valores máximos no terceiro e quarto dias de infusão, e foi em média 2,06% (2,04; 2,49; 1,70 e 2,03%) nos quatro carneiros. Os autores concluíram que tanto acetato quanto propionato aceleraram a proliferação celular do epitélio ruminal, e o butirato foi o ácido que menos estimulou o IM.

Lesões histopatológicas no rúmen são conseqüências do efeito direto dos AGV sobre o epitélio (Hamada, 1975). O efeito do butirato é inibidor de proliferação celular *in vitro* (Gálfí et al., 1981) e *in vivo* quando permanece continuamente em contato com o epitélio ruminal (Gálfí et al., 1986). Segundo Gálfí et al. (1983), em cultura de células epiteliais do rúmen, o butirato estimulou queratinização, descamação de células queratinizadas e distúrbios ultra-estruturais típicos do processo de queratinização.

A adição de mistura de sais de propionato e butirato ao concentrado de bezerros recém-nascidos provocou hiperqueratose (espessamento da camada córnea) do epitélio ruminal e perda da camada de queratina em algumas regiões do rúmen (Gilliland et al., 1962). Em 1965, Hinders & Owen e Bull et al. observaram paraqueratose (presença de núcleos na camada córnea) e hiperqueratose com descamação da queratina em bezerros alimentados com forragem peletizada em comparação com a ingestão de alfafa fresca. Costa (2003) também observou desprendimento da camada córnea após infusão de butirato no rúmen de bezerros.

Costa (2003) avaliou o efeito de butirato, propionato e lactato sobre a morfologia da mucosa ruminal e da epiderme de bezerros recém-nascidos. Os animais foram alimentados exclusivamente com leite e receberam infusões diárias de butirato, propionato, lactato ou salina (controle) intra-ruminalmente entre 52 e 89 dias de vida. Todos os AGV aumentaram a proliferação das células da camada basal do epitélio ruminal. Embora os AGV tenham aumentado a área de células metabolicamente ativas no rúmen, somente o propionato tendeu a aumentar o tamanho das papilas no saco cranial.

O rúmen se adapta ao aumento na ingestão de dieta através da hiperplasia das células epiteliais. Os AGV estimularam o IM do epitélio ruminal em carneiros, mas *in vitro* inibiram a proliferação celular, provavelmente devido à ausência de insulina, que parece ser o mediador da proliferação *in vivo* (Sakata

et al., 1980). No experimento de Costa (2003) 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 após infusão intra-ruminal de butirato não resultou em resposta diferenciada a este ácido.

Goodlad (1981) avaliou a taxa de divisão celular do epitélio ruminal de quatro carneiros adultos. Os animais foram alimentados por um período de sete meses com dieta à base de forragem, que depois foi substituída por dieta exclusivamente concentrada. Esta substituição foi realizada gradativamente reduzindo a quantidade de forragem e aumentando a de concentrado até que, no quarto dia, havia zero de forragem. Após 62 dias de dieta concentrada, novamente foi reintroduzida dieta rica em forragem. Houve grande aumento do IM no quarto dia a partir do início da substituição da dieta à base de forragem por concentrado; em seguida ocorreu queda da atividade mitótica, a qual ainda se manteve maior que a observada com dieta rica em forragem, de forma similar à observada por Sakata & Tamate (1979). O autor explica que este declínio da proliferação celular ocorreu, provavelmente, para se adequar à nova demanda de absorção, e que esta massa tecidual pode ser rapidamente reduzida por perda ou apoptose celular. As papilas ruminais sofreram hipertrofia com a substituição de forragem por concentrado, que pôde ser observada macroscópica e microscopicamente. Observaram-se algumas evidências de paraqueratose e hiperqueratose, mas a alteração mais marcante foi o aumento da superfície de absorção causada pelo crescimento e ramificação das papilas. Após a substituição de forragem por concentrado houve redução do pH do fluido ruminal medido três horas após a alimentação, e ocorreu também redução no teor de acetato e aumento no de propionato. Quando a dieta foi novamente substituída por forragem, ocorreu queda acentuada no IM e acréscimo dos valores de pH e da relação entre acetato e propionato.

O efeito da quantidade de energia da dieta sobre a morfologia ruminal e a absorção de AGV foi avaliado em duas vacas (Dirksen et al., 1985). A absorção foi mensurada após infusão de solução de AGV no rúmen evacuado e lavado, e com desvio do fluxo salivar do esôfago e obstrução do óstio retículo-omasal. A concentração de AGV e a mucosa ruminal foram progressivamente menores quando os animais receberam dieta pobre em energia. A substituição desta por outra rica em energia promoveu aumento da concentração de AGV, intenso crescimento das papilas ruminiais, em largura e comprimento, e proliferação do epitélio ruminal, que atingiu a área máxima em quatro semanas após a substituição. A absorção de AGV também foi maior no período de alta ingestão energética. A proliferação e a redução da mucosa ruminal representam processos adaptativos do organismo à alta ou baixa concentração de AGV no fluido ruminal, induzidos dieteticamente. Maior desenvolvimento da mucosa ruminal com dieta rica em energia aumenta simultaneamente a quantidade de AGV absorvida pelo órgão.

O efeito da dieta no metabolismo da mucosa ruminal foi avaliado em bezerros entre quatro dias e 16 semanas de idade (Sutton et al., 1963). Três animais foram alimentados apenas com leite e outros três receberam leite, forragem e grãos. Na décima sexta semana os animais foram sacrificados e fragmentos da mucosa ruminal do saco dorsal foram incubados em solução de Krebs-Ringer-bicarbonato com pH 7,2. A solução continha ácidos acético, ou propiônico, ou butírico, a mistura dos três ou glicose. A absorção dos substratos nas soluções foi maior nos bezerros alimentados com leite, forragem e grãos. A porcentagem de conversão de acetato e butirato em corpos cetônicos também foi maior nestes animais. A mucosa de todos os bezerros alimentados com leite, forragem e grãos apresentou extenso desenvolvimento papilar. Ao contrário, nos animais que receberam somente leite, a mucosa estava delgada e as papilas muito pequenas, e a metabolização dos AGV pela mucosa foi bem menor,

principalmente de propionato e butirato. Nos animais alimentados com leite, forragem e grãos, a ordem de metabolismo dos AGV foi butirato maior que propionato, o qual, por sua vez, foi maior que acetato. A absorção de glicose foi muito pequena e não houve diferença entre os tratamentos. O mecanismo para o desenvolvimento da parede ruminal é o aumento da atividade metabólica da mucosa. O autor explica que a absorção de AGV é um processo passivo, que aumenta o fluxo sanguíneo no rúmen, e é o melhor mecanismo para explicar a relação entre a atividade metabólica e a absorção.

Rémond et al. (1993) estudaram carneiros canulados no rúmen e com catéteres nas veias ruminais e na artéria mesentérica, alimentados com grama Orchard picada (*Dactylis glomerata*). Eles observaram que o fluxo sanguíneo ruminal aumentou imediatamente após o início da alimentação e permaneceu alto durante o período de uma hora da alimentação. Depois do término da refeição houve queda do pH ruminal e aumento da osmolaridade, da concentração e da absorção de AGV ruminal. O fluxo sanguíneo aumentado no rúmen durante a refeição pode ter favorecido a maior absorção de AGV.

Dez novilhos foram agrupados em dois tratamentos, um grupo foi alimentado com forragem e o outro com concentrado (Weigand et al., 1975). O pH do fluido ruminal foi em média 6,8 para o primeiro grupo e 5,4 para o segundo. Após três meses submetidos aos tratamentos, papilas ruminais dos novilhos foram coletadas no saco cranial e incubadas em solução Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,2, contendo AGV. Os animais alimentados com forragem apresentaram papilas restritas às áreas centrais dos sacos ruminais, com pigmentação, tamanho e forma uniformes. Já nos que receberam dieta exclusiva de concentrado, as papilas estavam bem maiores e com pigmentação, tamanho e forma bem variados, e às vezes agrupadas. Esperava-se que a absorção de AGV fosse maior nos animais alimentados com concentrado, já que apresentaram papilas maiores e, de acordo com Goodlad (1981), conseqüentemente maior

superfície absorptiva, mas a absorção de AGV foi maior nos novilhos alimentados somente com forragem. Os autores explicam que a grande disponibilidade de substrato endógeno, como corpos cetônicos, por exemplo, nas papilas coletadas de animais alimentados com concentrado, pode ter reduzido a necessidade de metabolizar substrato exógeno, por isso absorveram menos AGV. Esta menor absorção também pode ter decorrido de alterações estruturais. Dietas ricas em concentrados (Goodlad, 1981) e infusão de AGV (Gilliland et al., 1962) podem provocar hiperqueratose nas papilas ruminais. O espessamento da camada córnea resultou em uma barreira física reduzindo o transporte de AGV para as camadas mais profundas (Hinders & Owen, 1965), as quais apresentam alta capacidade de absorção e metabolização de AGV, principalmente a espinhosa (Dellman & Brown, 1982). A hiperqueratose também reduz a porção metabolicamente ativa do tecido por unidade de peso da papila, diminuindo o metabolismo dos ácidos (Baldwin & Jesse, 1992).

Gäbel et al. (1993) avaliaram a absorção de AGV, sódio, cloro, magnésio e água do ruminorretículo temporariamente isolado e lavado de seis carneiros. Os animais foram submetidos à dieta de forragem e concentrado uma vez ao dia ou a jejum alimentar por dois dias. Após o período de avaliação da absorção, foram coletadas papilas ruminais para analisar a área da superfície em microscopia de luz. Os animais que permaneceram em jejum apresentaram menor concentração de AGV total, $27,1 \pm 4,1$ e $76,2 \pm 3,2$ mM (média \pm desvio padrão), e aumento do pH ruminal, $7,44 \pm 0,11$ e $6,41 \pm 0,07$, quando comparados aos que foram alimentados. O jejum também reduziu a absorção de todos os substratos testados e de água, mas não alterou significativamente a área de superfície das papilas. No saco ventral do rúmen a área papilar foi $7,40 \pm 1,0$ nos carneiros alimentados e $7,58 \pm 1,3$ mm² nos submetidos a jejum. O decréscimo na absorção pode ser devido à indução de queda na massa celular epitelial absorptiva em resposta ao jejum, apesar de a área de superfície das

papilas ter sido semelhante. Maior proliferação das células da camada basal do epitélio ruminal não refletiu em aumento das dimensões macroscópicas, como tamanho e área papilar (Costa, 2003; Resende Júnior et al., 2006a). Durante a alimentação houve aumento do fluxo sanguíneo ruminal (Rémond et al., 1993); então, além da menor massa celular, redução da atividade metabólica e do fluxo sanguíneo na parede do ruminorretículo durante o jejum pode ter reduzido a absorção de AGV. O ruminorretículo atua como reserva de eletrólitos e substratos ricos em energia, então a redução na capacidade absorptiva pode levar a deficiência de magnésio, por exemplo, já que este é bastante absorvido no órgão. Porém, segundo Gäbel et al. (1993), a redução na absorção pode ser benéfica para o animal com baixa ingestão de energia, atuando como uma reserva funcional do estômago para mantê-lo por mais tempo e também por consumir menos energia na manutenção do metabolismo epitelial.

Sete vacas não gestantes e não lactantes fistuladas no saco dorsal do rúmen foram submetidas a sete dias de padronização com dieta à base de feno e água *ad libitum* (Resende Júnior et al., 2006a). Após este período, foram alimentadas por 19 dias com concentrado, em quantidade equivalente a 0,5% do peso vivo, e feno *ad libitum*. O suprimento diário de concentrado foi fornecido uma ou quatro vezes ao dia. Subseqüentemente, os animais permaneceram em jejum alimentar por dois dias, só recebendo água *ad libitum*. As coletas de dados foram realizadas no último dia da padronização, nos dias quatro, 12 e 19 da alimentação, e 24, 48 e 72 horas do início do jejum alimentar. Amostras de sangue e fluido ruminal foram coletadas nos tempos 0, 90, 180 e 360 minutos após a primeira refeição do dia, e nos mesmos horários durante o período de jejum. Papilas ruminais foram biopsiadas do saco cranial no tempo 360 minutos das coletas de sangue e fluido, e no horário do tempo zero do período de jejum. Foram realizadas mensurações macroscópicas das papilas para obtenção da área, comprimento e relação entre a área e o comprimento. Microscopicamente foi

contabilizado o IM na camada basal do epitélio. A menor freqüência de alimentação concentrada resultou em maior IM, que foi 0,97% para animais alimentados uma vez e 0,75% para alimentados quatro vezes ao dia, similar ao observado por Tamate et al. (1974). Porém, não foi detectado efeito da freqüência alimentar sobre o tamanho papilar. A proliferação celular parece não ser o único fator determinante do crescimento papilar; maior fluxo sanguíneo decorrente de maior aporte nutricional e, conseqüentemente, maior absorção também podem promover crescimento papilar (Tamate et al., 1974). O jejum teve efeito agudo e negativo sobre o IM e o tamanho das papilas. O IM apresentou o valor máximo no quarto dia de aplicação dos tratamentos, mas não foi associado ao maior tamanho papilar. Como o tamanho do epitélio é resultado da proliferação e da morte celular, a mudança de dieta exclusiva de forragem para dieta com concentrado e forragem não foi capaz de se refletir rapidamente em maior tamanho papilar. Nos dias 12 e 19 o IM reduziu para valores semelhantes aos observados no último dia da padronização. A introdução de concentrado na dieta provavelmente causou maior produção de AGV, requerendo maior capacidade absorptiva pelo epitélio ruminal. Provavelmente, no início, as células apresentaram alto IM para atingir massa epitelial suficiente para absorver mais AGV, e depois de alcançado este equilíbrio entre a produção e a capacidade de absorção, a divisão celular voltou a valores iniciais necessários para a renovação celular normal do epitélio.

Perrier et al. (1994) avaliaram a absorção de AGV em quatro carneiros alimentados em dois níveis de ingestão. No primeiro período experimental os animais foram alimentados para suprir toda a exigência de energia para manutenção. No segundo período a alimentação foi reduzida para metade da manutenção. A duração de cada período foi de quatro semanas. Três litros de solução com ácidos acético, propiônico e butírico e marcador de fase fluida CoEDTA, com pH 6,3, foram infundidos no rúmen temporariamente isolado e

lavado. A absorção de água não foi significativamente diferente entre os períodos. O volume de fluido ruminal foi maior no primeiro período. Como no segundo período o fluxo de AGV através da parede foi menor que no primeiro, provavelmente por menor área absorptiva resultante de menor aporte nutricional, era esperado maior influxo de água no segundo período (Peters et al., 1990) devido ao aumento da osmolaridade por maior acúmulo de AGV (Bennink et al., 1978). O fluxo de AGV do rúmen foi reduzido quando os animais receberam metade da manutenção, de 35,6 para 24,2 mmol h⁻¹ para acetato, de 20,1 para 13,0 para propionato e de 6,0 para 4,0 para butirato. A ordem da taxa fracional de absorção foi butirato > propionato > acetato. Segundo os autores, fatores como a atividade metabólica por célula epitelial, o número de células e o fluxo sanguíneo da mucosa podem afetar a absorção de AGV. Rémond et al. (1993) observaram maior fluxo sanguíneo ruminal durante a alimentação, então o fluxo sanguíneo pode ter sido menor no período dois, afetando a proliferação celular epitelial e a capacidade de absorção.

2.3 Osmolaridade, efluxo e influxo de água no ruminorretículo

O acúmulo de água no rúmen é resultado do balanço entre o influxo exógeno na forma de água e alimento ingerido, e o endógeno na forma de saliva e do sangue para o lúmen pela parede ruminal (López et al., 1994; Peters et al., 1990); e o efluxo através da parede ruminal (López et al., 1994) e via passagem com a digesta para o omaso (López et al., 1994; Peters et al., 1990). Carter & Grovum (1990a) sugeriram que os mecanismos que regulam o movimento de água no rúmen ocorrem para reduzir as alterações do gradiente osmótico entre o rúmen e os fluidos corporais. Segundo Dobson et al. (1976), o gradiente osmótico entre o conteúdo ruminal e o plasma parece ser o fator determinante do

movimento trans-epitelial de água, definindo a extensão e a direção da difusão da água e o fluxo de sangue na mucosa ruminal.

Os AGV, minerais, glicose (Dobson et al., 1976; Owens et al., 1998), lactato (Owens et al., 1998), CO₂ (Dobson et al., 1976) e partículas alimentares são os principais solutos do fluido ruminal. No sangue, as proteínas plasmáticas contribuem substancialmente para manter a osmolaridade entre 285 e 300 mOsmol (Owens et al., 1998). Alimentos e produtos fermentativos da digestão microbiana no rúmen aumentam a osmolaridade do fluido ruminal, sendo que a taxa e a extensão das variações dependem da natureza e da quantidade de dieta consumida (Bennink et al., 1978). Outros fatores, como atividade de microorganismos ruminais e ingestão de água, podem afetar a tonicidade do fluido (Carter & Grovum, 1990a). A osmolaridade do fluido ruminal (Bennink et al., 1978; Carter & Grovum, 1990a; Rémond et al., 1993; Ternouth, 1967) e do plasma (Ternouth, 1967) aumenta após a alimentação. O aumento da osmolaridade plasmática ocorre devido à absorção de partículas osmoticamente ativas, como AGV e eletrólitos a partir do ruminorretículo, e à secreção das glândulas salivares (Carter & Grovum, 1990a). Este aumento também pode ser devido ao acréscimo da pressão coloidosmótica (pressão osmótica do plasma sanguíneo, representada principalmente pelas proteínas plasmáticas), em consequência da saída de água do sangue para o rúmen, o que acarreta uma concentração progressiva das proteínas plasmáticas (Junqueira & Carneiro, 2004).

Normalmente a osmolaridade no rúmen é mais baixa que a do plasma, a água normalmente flui do rúmen para o sangue. Se a osmolaridade ruminal excede a plasmática, ocorre influxo de água para o rúmen (López et al., 2003). A absorção de AGV contribui para a manutenção da osmolaridade ruminal em níveis fisiológicos (López et al., 1994), e pode ser afetada pela concentração de AGV e pelo pH (Dijkstra et al., 1993). Alta concentração de AGV poderia inibir

a absorção por acúmulo intracelular destes ácidos ou se a disponibilidade de íons requeridos nos sistemas de transporte se tornasse limitada (Kramer et al., 1996; Sehested et al., 1999b). Em baixa concentração de AGV ocorreria queda na velocidade de absorção por redução no gradiente de concentração entre o lúmen ruminal e o sangue (Dobson et al., 1976). O pH afetaria a absorção primariamente por definir a prevalência entre as formas protonada e ionizada dos ácidos. Carter & Grovum (1990a) observaram influxo significativo de água quando a osmolaridade ruminal foi superior a 370 mOsmol.

Ternouth (1968) observou redução do fluido intersticial durante a alimentação, que retornou ao normal cerca de três horas depois da refeição. O autor argumentou que o menor fluido intersticial durante a refeição pode ter decorrido da alta secreção salivar e da transferência de fluidos plasmáticos pela parede, para o rúmen, devido ao gradiente osmótico aumentado logo após a alimentação. A osmolaridade do fluido ruminal geralmente aumenta durante as refeições (Carter & Grovum, 1990a; Ternouth, 1967); logo, o influxo de água para o rúmen durante a alimentação aumenta as taxas de diluição da digesta e de passagem de fluidos para o duodeno (Carter & Grovum, 1990a). A diluição do fluido ruminal mostra que a água é capaz de se movimentar através da parede seguindo tendências ditadas pela diferença osmótica entre os compartimentos (Ternouth, 1967). O influxo de água após a alimentação pode aumentar o volume ruminal; estimou-se que cerca de 20% do fluido ruminal, uma hora após a refeição, pode se originar de influxo pela parede (Ternouth, 1967). Peters et al. (1990) também notaram aumento da taxa fracional de diluição ruminal após a alimentação.

Peters et al. (1990) avaliaram o efeito de dietas com alto teor de forragem ou de concentrados sobre o influxo endógeno de água para o rúmen. Foram utilizados oito novilhos com fistulas ruminais alimentados uma vez ao dia e mantidos em jejum hídrico durante a coleta de dados. O marcador de fase

fluida (CrEDTA) foi misturado à digesta dentro do rúmen manualmente por dez minutos. As amostras de fluido ruminal foram coletadas a cada 15 minutos, por sete horas após infusão do marcador, para analisar os teores de Cr por espectrofotometria de absorção atômica e de AGV por cromatografia gás-líquida e a osmolaridade por queda no ponto de congelamento. Amostras de saliva também foram coletadas do ducto da parótida para determinação da osmolaridade.

A osmolaridade ruminal variou ao longo do tempo de amostragem, mas não diferiu entre as dietas, sendo a média dos animais nos tempos (em minutos antes (zero) e após (180, 300 e 420) a alimentação) 0: 252 e 256; 180: 318 e 310; 300: 312 e 304; 420: 291 e 290 mOsmol, respectivamente para as dietas rica em forragem e rica em concentrado (Peters et al., 1990). Os valores médios de osmolaridade ruminal após a alimentação aumentaram comparativamente aos observados antes da alimentação. A osmolaridade da saliva também aumentou após a alimentação e não foi afetada pela dieta. O aumento da osmolaridade ruminal após a alimentação resultou em aumento da osmolaridade plasmática (López et al., 1994), refletindo o fluxo de água do sangue para o rúmen na tentativa de aliviar a alta osmolaridade ruminal. O acréscimo da osmolaridade da saliva após a alimentação é explicado pelo insuficiente tempo para reabsorção de eletrólitos devido ao intenso fluxo, e também pelo aumento da osmolaridade plasmática (Carter & Grovum, 1990a). O volume de fluido ruminal não foi diferente ao longo do tempo de coleta. O maior valor para a taxa fracional de diluição ocorreu logo após a alimentação, sendo de duas a quatro vezes maior que antes da alimentação.

A concentração de AGV total no rúmen foi similar nas duas dietas e aumentou de 63 mM antes da alimentação para aproximadamente 140 mM em três horas após a alimentação (Peters et al., 1990). A correlação entre a concentração de AGV total e a osmolaridade ruminal não foi significativa,

contrariando Bennink et al. (1978), que observaram que os AGV aumentaram a osmolaridade ruminal. Foi observada uma correlação linear e positiva entre a taxa de diluição e a osmolaridade do fluido ruminal. Como os animais foram mantidos em jejum hídrico durante o período de coleta, possivelmente o influxo de líquido para o rúmen ocorreu majoritariamente por influxo a partir da parede do órgão.

A infusão de AGV no rúmen de carneiros e bezerros não afetou o fluxo de saliva (Yarns et al., 1965). Carter & Grovum (1990a) observaram que a osmolaridade ruminal não afeta a secreção salivar. Segundo Dobson et al. (1976), aumento da osmolaridade ruminal é acompanhado por aumento da osmolaridade plasmática, provocando maior fluxo sanguíneo na mucosa de bovinos, que influencia o fluxo de água para dentro do rúmen. Quando infundiram 20 mM de butirato ou quantidade equivalente de cloreto de sódio no saco ventral do rúmen de vacas, ao autores observaram que o butirato aumentou o gradiente osmótico. O provável mecanismo pelo qual AGV aumentam o fluxo sanguíneo na mucosa ruminal é por efeito vasodilatador direto. Peters et al. (1990) concluíram que a contribuição da saliva não é estimulada por agentes químicos, como AGV ou osmolaridade, por exemplo, mas eles podem regular a transferência de água para dentro do rúmen via influxo através da parede.

López et al. (1994) avaliaram o efeito de alterações da osmolaridade ruminal sobre a taxa de passagem de fluido, o pH e a absorção de água e AGV do rúmen lavado e evacuado de carneiros. No experimento um foram utilizados quatro machos fistulados recebendo infusão intra-ruminal de soluções variando na concentração de NaCl. Os valores de osmolaridade ruminal avaliados foram 300, 340, 380 e 420 mOsmol, mantidos por 9,5 horas através de infusão contínua. No experimento dois os autores avaliaram, em quatro ovelhas, os tratamentos 260, 350, 420 e 490 mOsmol. No tratamento 260 mOsmol não houve infusão de NaCl. Durante o período experimental os animais foram

mantidos em jejum hídrico e receberam infusão intra-ruminal de AGV (acetato, propionato e butirato) e minerais para atender suas necessidades energéticas de manutenção. As amostras foram coletadas nos tempos 0; 2; 3,5; 5; 6,5; 8 e 9,5 horas após a infusão do NaCl. No experimento um não houve efeito significativo da osmolaridade sobre o volume ruminal, mas, numericamente, aumento da osmolaridade provocou aumento do volume ruminal. No experimento dois houve correlação linear positiva entre a osmolaridade e o volume ruminal, deixando claro que a entrada de água para o rúmen é uma tentativa de aliviar a alta osmolaridade do conteúdo, e tendência a correlação linear negativa entre o volume ruminal e o tempo de coleta. Em ambos os experimentos, a partir das 3,5 horas de infusão da solução de NaCl o volume ruminal foi maior que o inicial. Comparando o volume ruminal final com o inicial, os autores observaram que houve tendência de aumento da osmolaridade associado com aumento de 10 a 20% no volume ruminal.

Nos dois experimentos de López et al. (1994), a osmolaridade influenciou significativamente o movimento de água a partir do epitélio ruminal, determinando sua extensão e direção. Com baixos valores de osmolaridade ocorreu efluxo de líquido ruminal, mas quando a osmolaridade foi ≥ 340 mOsmol ocorreu influxo de água para dentro do rúmen, que foi assumida como sendo oriunda da saliva ou do plasma. A osmolaridade do plasma foi mensurada no início (290 mOsmol) e no final do experimento um. Houve correlação linear significativa e positiva entre tratamento e osmolaridade final do plasma, sendo 297, 302, 329 e 357 mOsmol para os tratamentos 300, 340, 380 e 420 mOsmol, respectivamente. A concentração plasmática de sólidos refletiu a desidratação dos animais quando submetidos à alta osmolaridade ruminal. Acréscimo da osmolaridade foi associado com maior passagem de fluido ruminal para o omaso, expressada em fluxo ou como taxa fracional.

Em ambos os experimentos houve queda de pH com o aumento da osmolaridade e dentro do tratamento houve queda do pH à medida que aumentou o tempo de coleta (López et al., 1994). No experimento dois a concentração de AGV total no rúmen tendeu a ser maior com aumento da osmolaridade, e não houve efeito do tempo de coleta sobre a concentração de AGV total. Houve correlação linear negativa e significativa da osmolaridade sobre o fluxo de AGV total através da parede, sendo que a maior absorção ocorreu com osmolaridade de 350 mOsmol. Aumento da osmolaridade reduziu numericamente a taxa relativa de absorção de acetato e aumentou a de propionato e butirato. Isto pode ser explicado pelo fato de a maior osmolaridade ter gerado acúmulo de AGV no rúmen, o que tendeu a reduzir o pH, aumentando proporcionalmente a absorção dos ácidos graxos de cadeia mais longa (Dijkstra et al., 1993). A absorção diminuiu linearmente com o tempo, exceto para o tratamento 260 mOsmol, que permaneceu estável ao longo do tempo.

López et al. (2003) utilizaram três ovelhas com cânula ruminal para testar três soluções de AGV (135, 394 e 511 mmol h⁻¹) em infusão contínua no rúmen evacuado e lavado. Todos os animais receberam uma infusão basal de AGV total (271 mmol h⁻¹) por duas horas. Em seguida foram infundidos, cada um, com uma solução de AGV (135, 394 e 511 mmol h⁻¹) e as amostras foram coletadas por 7,5 horas intervaladas a cada 1,5 horas. Infusões de alta concentração de AGV, 394 e 511 mmol h⁻¹, reduziram o pH ruminal e aumentaram a osmolaridade ao longo do tempo de coleta devido ao aumento da concentração total de AGV. Com a infusão de 135 mmol h⁻¹ o pH permaneceu estável e a osmolaridade e a concentração total de AGV tenderam a reduzir. Todas as variáveis analisadas nos três tratamentos alcançaram a estabilidade após 4,5 horas de infusão. Não houve efeito significativo da infusão de AGV no volume ruminal, na taxa de passagem absoluta ou fracional e na absorção de água pelo rúmen. Também não houve diferença significativa na taxa de

passagem ou na absorção de água associadas com alteração na osmolaridade ruminal.

Diferentemente, López et al. (1994) observaram que a osmolaridade ruminal teve correlação positiva com a taxa de passagem absoluta ou fracional para o omaso em animais infundidos com NaCl. López et al. (2003) explicaram que quando o conteúdo ruminal está hipertônico devido à adição de minerais, há aumento do influxo de água através do epitélio para dentro do rúmen, provocando maior passagem para o omaso. Quando a osmolaridade é aumentada por acúmulo de AGV, o movimento de água a partir do epitélio é mais moderado, pois a força osmótica diminui pela absorção de água associada com a absorção de AGV. Houve efeito significativo da quantidade de AGV infundido na absorção de AGV total e de cada ácido individualmente. A taxa de absorção de AGV total (cerca de 36%) tendeu a ser maior com aumento da infusão de AGV. Numericamente a taxa relativa de absorção de butirato foi maior que propionato, que foi maior que acetato. Com o aumento na concentração de AGV da solução infundida, houve acúmulo de AGV no rúmen e queda no pH, aumentando a quantidade AGV na forma protonada e favorecendo a absorção de ácidos graxos de cadeia mais longa (Dijkstra et al., 1993). A difusão através da membrana lipídica é favorecida pela lipossolubilidade dos ácidos, resultando em maior taxa de absorção de AGV quanto maior for a cadeia de carbono. Aumento da capacidade absorptiva devido a alta concentração de AGV no fluido ruminal poderia ter resposta a médio prazo, mas imediatamente depois da concentração de AGV no rúmen ser aumentada, o gradiente de concentração entre o lúmen ruminal e o sangue é maior, resultando em maior fluxo de AGV para o sangue (López et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento e unidades experimentais

Foram utilizadas nove vacas com cânula ruminal. Dentre estas, três eram vacas da raça Holandesa em lactação, abrigadas em confinamento e consumindo Dieta Completa com alto teor de concentrados; três eram vacas da raça Girolando em lactação, consumindo silagem de milho, pastagem tropical e baixo nível de suplementação concentrada; e três eram vacas da raça Jersey não-lactantes e mantidas exclusivamente a pasto. Os grupos de três vacas foram definidos como condições Alto, Médio e Secas, respectivamente. A produção diária de leite, imediatamente antes do início do período de coleta de dados, foi 25,9 kg na condição Alto (12,4; 31,2 e 34,2 kg/d) e 12,3 kg na condição Médio (11,2; 12,0 e 13,6 kg/d). O objetivo foi obter alta disparidade na morfologia ruminal entre os grupos de animais.

Dentro de cada grupo de três animais, uma seqüência de três tratamentos foi aplicada a cada vaca, em delineamento do tipo Quadrado Latino 3x3, com períodos de sete dias. Os períodos experimentais, em cada grupo, não foram simultâneos. As mensurações da digesta ruminal foram realizadas no dia sete de cada período experimental de cada grupo e a morfometria da parede do rúmen foi realizada apenas no primeiro dia do primeiro período experimental.

3.2 Tratamentos

Três condições ruminais foram simuladas após a evacuação manual da digesta. Duas foram simuladas com alto valor de pH, sendo uma com alto volume (Volume alto, pH alto; VAPA) e outra com baixo volume ruminal (Volume baixo, pH alto; VBPA). No terceiro tratamento, foi simulado baixo pH

e baixo volume ruminal (Volume baixo, pH baixo; VBPB). O alto volume ruminal foi obtido pelo retorno integral ao rúmen da digesta evacuada pela cânula e os baixos volumes foram obtidos pelo retorno de apenas 25 kg.

As evacuações ruminais foram realizadas antes da alimentação da manhã, com o objetivo de obter alto valor de pH da digesta. Os baixos valores de pH foram obtidos pela mistura de uma solução de H₂SO₄ a 50% ao conteúdo ruminal evacuado, em quantidade suficiente para reduzir o pH da digesta para valores ao redor de cinco. A quantidade de solução ácida utilizada para 25 kg de digesta foi 170,0 ± 18,0 ml (média ± desvio padrão, para as nove observações neste tratamento).

3.3 Taxa de absorção de valerato pela parede do rúmen

A capacidade de absorção de AGV pela parede do rúmen foi mensurada pela técnica de Valerato - Marcador de Fase Líquida (CrEDTA) (Resende Júnior et al., 2006b). O conteúdo ruminal foi evacuado manualmente e transferido para uma caixa isotérmica, para mensuração do peso e do volume. A cada dez porções de digesta evacuada, uma amostra foi obtida para formação de uma amostra composta que foi congelada para posterior determinação do teor de matéria seca por destilação em tolueno (MStol) (Dewar & McDonald, 1961). Na técnica de tolueno foram utilizadas amostras de 30 g de digesta e cerca de 200 ml de tolueno, suficientes para manter a amostra submersa. O teor de umidade da amostra foi calculado pela perda de água por destilação dividida pelo peso inicial da amostra *in natura*. O volume^{0,66}/volume foi utilizado como medida da relação entre a superfície da digesta ruminal e o seu volume.

Uma solução marcadora foi formulada com 13,0 g de CrEDTA (Binnerts et al., 1968), 114,3 ml de ácido valérico (Ácido Valérico, Farmalabor Comercial LTDA, São Paulo, SP) e água destilada (q.s.p. para 1.000 ml). O pH

da solução foi ajustado para 7,0 com NaOH a 50%. Para cada kg de digesta foram adicionados e homogeneizados, manualmente, 35 ml de solução marcadora, imediatamente antes do seu retorno ao rúmen. O óstio retículo-omasal foi mantido mecanicamente fechado, com uma espuma de densidade 45, medindo 20 cm de comprimento, 15 cm de largura e 10 cm de espessura, ao longo do período de amostragem da digesta para coleta de dados.

Amostras de cerca de 100 ml de fluido ruminal foram coletadas no saco ventral do rúmen, utilizando-se um tubo de PVC 3/4" com elemento filtrante de 30 cm na extremidade de coleta, acoplado a um dispositivo para sucção. Os tempos de amostragem foram 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 minutos, após a reintrodução da digesta no rúmen. Após as quatro horas de amostragem do fluido ruminal, o rúmen foi novamente evacuado, o peso e o volume foram mensurados, e uma segunda amostra composta foi formada para determinação da MStol.

O pH de cada amostra foi mensurado imediatamente (pH metro Digimed DM20, Datamed Instrumentos Científicos e Médicos LTDA, Belo Horizonte, MG). Uma alíquota de 10 ml de cada amostra foi imediatamente congelada a -18°C para posterior determinação da concentração de Cr. À outra alíquota de 10 ml foi acrescido 0,5 ml de ácido sulfúrico a 20%, e a amostra foi congelada para posterior determinação da concentração de AGV.

Após serem descongeladas, as amostras para análise de AGV foram centrifugadas em temperatura de 4°C (Centrífuga Refrigerada Modelo 3K30, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Alemanha) a 8855 g por 15 minutos. A 400 μL do sobrenadante foram adicionados 100 μL de padrão interno, ácido capróico (800 ppm) (N Caproic Acid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha). As amostras foram analisadas por cromatografia gás-líquida (CP-3800 Gas Chromatograph Varian, Varian Chromatography Systems, Califórnia, EUA), com coluna capilar de fase composta por

polietilenoglicol modificado com ácido nitroterefitálico, com 0,25 mm de diâmetro interno, 0,2 µm de espessura de filme e 25 m de comprimento (CP-Wax 58 (FFAP) CB, Varian Analytical Instruments, Califórnia, EUA). Após a centrifugação o fluido ruminal ainda apresentava resíduos suspensos capazes de obstruir a coluna cromatográfica. Para minimizar este problema, foi colocada lã de vidro silanizado no interior do liner tipo split/splitless com adelgaçamento único e 3,4 mm de diâmetro (GC Inlet Liner Varian, Varian Analytical Instruments, Califórnia, EUA). A lã foi colocada entre a ponta da agulha para injeção da amostra e a entrada da coluna, num espaço de ±1 cm, funcionando como um filtro. A temperatura do forno e a taxa de aquecimento foram de 65°C nos primeiros 30 segundos, nos próximos três minutos subiram 20°C por minuto, chegando a 125°C, e em seguida a temperatura foi elevada a 170°C, subindo 50°C por minuto. O tempo total de análise foi 4,9 minutos. As análises de Cr foram realizadas por espectrofotometria de absorção atômica (SpectrAA-100 Varian, Varian Austrália PTy LTD, Vitória, Austrália) nas amostras descongeladas, centrifugadas como anteriormente descrito, e sob diluição 1:15 com água destilada.

A taxa fracional de absorção de AGV pela parede do rúmen foi estimada por um modelo cinético de primeira ordem, descrevendo a queda exponencial na concentração ruminal de Valerato dividida pela concentração ruminal de Cr ao longo do tempo (k Val/Cr): $C_t = Ae^{-kt}$, em que: C_t = Concentração de Val/Cr no tempo t , A = Concentração de Val/Cr no tempo zero e k = taxa fracional de queda na concentração de Val/Cr. A taxa fracional descrevendo a variação na concentração ruminal de Cr ao longo do tempo (k Cr) foi determinada similarmente, visando estimar a taxa de diluição da digesta por influxo de líquido para o rúmen. Os valores cinéticos foram determinados para cada vaca em cada período experimental.

3.4 Morfologia das papilas do rúmen

À evacuação ruminal foram realizadas biópsias de um fragmento da mucosa de cerca de 4 cm². As biópsias foram realizadas na região cranial do saco ventral do rúmen. Uma fração dos fragmentos foi imediatamente colocada em frascos contendo solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, e foi resfriada por cinco dias para posterior análise macroscópica. A outra fração foi fixada em Líquido de Bouin, por 24 horas (Lillie & Fullmer, 1968), com a seguinte composição: 75 ml de solução aquosa saturada de ácido pícrico (6,5 g de ácido pícrico diluído em 500 ml de água destilada), 25 ml de formaldeído a 40% e 5 ml de ácido acético glacial. Após o período de fixação as amostras foram mantidas em álcool a 70°GL até o processamento histológico.

As variáveis morfológicas macroscópicas avaliadas foram número de papilas por cm² de parede e área das papilas e da superfície total de absorção por cm² de parede. O número de papilas em todo o fragmento foi mensurado por dois avaliadores e o valor médio foi determinado para cada animal. A área da superfície absorptiva foi mensurada em imagens digitalizadas das papilas e da superfície parietal dos fragmentos de biópsia (Programa de análise de imagens UTHSCSA Image Tool, software livre) (Resende Júnior et al., 2006a). Em cada fragmento de biópsia foi mensurada a área da face parietal e a área de doze papilas seccionadas aleatoriamente na base. Foi assumido que a área média da superfície parietal correspondente à base de cada papila foi 0,002 cm² (Daniel et al., 2006). A superfície total de absorção foi calculada pela soma da área de epitélio papilar com a área de superfície parietal subtraída da área de base papilar.

As variáveis morfológicas avaliadas microscopicamente foram espessura do epitélio e da camada de queratina e IM das células da camada basal do

epitélio ruminal. A espessura das camadas não queratinizadas foi calculada pela diferença entre a espessura do epitélio e a camada queratinizada.

Os fragmentos fixados em Bouin foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70°, 80°, 90°GL e absoluto, ficando o fragmento imerso por 30 minutos em cada solução. Em seguida, as amostras foram imersas em xilol PA ($C_6H_4(CH_3)_2$) por 30 minutos para diafanização, repetindo-se esta operação uma vez. Logo após, o material foi infiltrado e incluído em três banhos de parafina histológica por 30 minutos cada, à temperatura de 60°C. Os blocos de parafina foram cortados, com um micrótomo manual rotativo (Olympus CUT 4055 Rotary Microtome, Microtec Laborgeräte GmbH, Alemanha), em secções de 5 µm de espessura. Dois cortes de cada fragmento biopsado foram fixados em lâminas histológicas.

Para a determinação do IM foi utilizada a coloração Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram imersas em xilol por 20 minutos para serem desparafinadas. Em seguida foram imersas em uma série decrescente de etanol (absoluto, 90°, 80° e 70°GL) para rehidratação, deixando-se dois minutos em cada solução. Foram então imersas em um frasco contendo hematoxilina, por dois minutos, em seguida colocadas em uma cuba em banho de água por 25 minutos, e finalmente imersas em eosina por 30 segundos. Outra série de etanol com concentrações crescentes (70°, 80°, 90°GL e dois banhos em absoluto) foi utilizada para desidratar novamente o material, deixando-se as lâminas por dois minutos em cada álcool. As lâminas foram então banhadas duas vezes em xilol, por dois minutos, e montadas utilizando-se uma camada de bálsamo do Canadá e superpondo-se uma lamínula de vidro em cada lâmina.

Com o auxílio de microscópio óptico (Jenamed-Carl Zeiss Jena, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP), em aumento de 400 vezes, foram contados os núcleos de todas as células da camada basal do epitélio de revestimento, em todas as regiões em que esta estava bem delimitada, e todas as células com

núcleo apresentando figuras mitóticas. Esse procedimento foi executado por um avaliador nos dois cortes de cada vaca, e o valor médio entre os cortes foi calculado. O IM foi calculado dividindo-se o número de células apresentando figuras mitóticas pelo número total de núcleos contados. Foram contados 21.848 \pm 4.574 núcleos (média das nove vacas \pm desvio padrão) por vaca.

Para análise morfométrica da espessura do epitélio e da camada de queratina, os cortes foram corados com Tricrômico de Masson (Luna, 1968). As lâminas foram desparafinadas e hidratadas rotineiramente. Os cortes foram então imersos em hematoxilina por dois minutos, lavados em água corrente por 20 minutos, em seguida imersos em solução de Tricrômico de Masson por oito minutos e lavados rapidamente em água corrente para posterior desidratação e montagem. As mensurações foram realizadas com uma lente ocular micrométrica, em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Foram realizadas vinte medidas por animal, em pontos aleatórios tanto da mucosa do epitélio de revestimento papilar quanto do não papilar. O valor de cada animal foi a média das vinte porções da mucosa.

3.5 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do pacote estatístico SAS (1985), de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + V_{j(i)} + P_{k(i)} + T_l + e_{ijkl}$$

Em que:

μ = média geral

G_i = efeito de grupo de animais (i = Alto, Médio, Secas)

$V_{j(i)}$ = efeito de vaca dentro de grupo de animais (j = 1 a 9)

$P_{k(i)}$ = efeito de período dentro de grupo de animais ($k = 1$ a 9)

T_l = efeito de tratamento ($l = \text{VAPA, VBPA, VBPB}$)

e_{ijkl} = erro residual, assumido identicamente e independentemente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2

Os graus de liberdade para o efeito de tratamento foram divididos em dois contrastes ortogonais com um grau de liberdade: efeito de volume ruminal (VAPA *versus* VBPA) e efeito de pH ruminal (VBPA *versus* VBPB). A disparidade em peso vivo e morfologia ruminal entre os grupos de animais, Alto, Médio e Secas, foi avaliada por um modelo contendo apenas o efeito do grupo, já que tanto o peso vivo como a morfologia ruminal só foram avaliados no primeiro dia do primeiro período de coleta de dados. O coeficiente de correlação entre a morfometria e o k Val/Cr foi estimado entre vacas. Para realização das correlações, o valor de k Val/Cr de cada animal foi a média das mensurações realizadas para cada um dos três tratamentos.

Os dados de pH e AGV ao longo do período de quatro horas de infusão foram analisados como medidas repetidas no tempo pelo procedimento MIXED do SAS (Littell et al., 1996). Para esta análise foram acrescentados, ao modelo acima descrito, os efeitos de tempo de amostragem (0 a 4 horas, totalizando 13 tempos por infusão) e a interação entre tempo e tratamento. O quadrado médio para a interação entre vaca, grupo de animais, período e tratamento foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de tratamento, enquanto o efeito de tempo e sua interação com tratamento foram testados no erro residual. Três estruturas de covariância foram avaliadas: simetria composta, auto-regressiva de primeira ordem e não-estruturada. Aquela com o maior valor para o critério de informação de Akaike foi utilizada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo de obter disparidade em morfologia ruminal entre as condições foi alcançado (TABELA 1). As vacas Holandesas na condição Alto apresentaram maior desenvolvimento do epitélio ruminal que os animais Girolando na condição Médio e os Jersey na condição Secas. Maior superfície de absorção foi associada a menor espessura do epitélio, resultado de redução na espessura da camada queratinizada e numérica nas camadas não queratinizadas. Apesar de a ocorrência de hiperqueratose ser associada ao fornecimento de dietas excessivamente acidogênicas (Gilliland et al., 1962), neste experimento a suplementação concentrada não induziu distúrbio na queratinização do epitélio. A maior proliferação celular, mensurada pelo maior IM nas condições Alto e Médio (TABELA 1), foi aparentemente acompanhada de perda também maior no número de células epiteliais (Tamate & Fell, 1977). Assumindo que a área de epitélio metabolicamente ativo por unidade de parede poderia ser representada pela superfície de absorção por cm^2 de parede multiplicada pela espessura das camadas não queratinizadas, esta foi cerca de 4,5 e 3,8 vezes maior nas condições Alto e Médio comparativamente à condição Secas, respectivamente.

TABELA 1 - Peso vivo e morfometria da parede ruminal de três vacas Jersey não lactantes (Secas), de três vacas Girolando em lactação (Médio) e de três vacas Holandesas em lactação (Alto)

	Secas	Médio	Alto	EPM ¹	P ²
Peso vivo (kg)	465	590	653	29,1	0,01
Índice mitótico (% das células basais)	0,719	0,950	0,967	0,0452	0,01
Superfície de absorção/cm ² de parede (cm ²)	4,04	17,81	23,31	1,667	<0,01
Número de papilas/cm ² de parede	29,0	45,7	52,1	10,28	0,33
Área por papila (cm ²)	0,094	0,371	0,441	0,0387	<0,01
Área papilar (% da superfície de absorção)	63,5	94,8	96,1	7,45	0,03
Espessura do epitélio (µm)	97,4	78,2	72,2	6,89	0,09
Espessura da camada queratinizada (µm)	16,8	9,5	9,1	1,47	0,02
Espessura das camadas não queratinizadas (µm)	80,6	68,8	63,2	6,31	0,22

¹ EPM = Erro padrão da média

² P = Valores de P para o efeito de grupo de animais

A maior superfície de absorção na condição Alto não foi acompanhada por diferença acentuada no IM relativamente à condição Médio (TABELA 1). Parece que houve adaptação do epitélio ao maior aporte de AGV (Weigand et al., 1975), e diferença acentuada no IM só foi obtida quando concentrados foram completamente excluídos da dieta. Goodlad (1981) observou aumento no IM quando uma dieta à base exclusivamente de forragem foi substituída por outra contendo concentrados, mas a atividade mitótica não se manteve no valor máximo por tempo prolongado. Sakata & Tamate (1979) também observaram, em carneiros, que a infusão intra-ruminal de acetato e propionato induziu um pico no IM por volta do quarto dia de infusão e queda subsequente na atividade mitótica do epitélio. Resende Júnior et al. (2006a) observaram que alimentação concentrada fornecida uma vez ao dia resultou em maior IM que o fornecimento quatro vezes ao dia, ocorrendo o valor máximo no quarto dia de aplicação dos tratamentos e queda no IM no dias doze e dezoito.

O volume de digesta mensurado nas 27 evacuações realizadas ao longo do experimento foi $66,7 \pm 18,0$ litros (média \pm desvio padrão). A massa de

digesta foi $58,9 \pm 13,5$ kg de MN e a massa como porcentagem do peso corporal foi $10,5 \pm 2,4$. O volume de digesta evacuada e retornada nos tratamentos simulando baixo volume ruminal foi abaixo do fisiológico (TABELA 2), similarmente ao executado no experimento de Dijkstra et al. (1993), em que foram inseridos 10 ou 30 litros de solução mineral tamponada contendo AGV em rúmen evacuado e lavado de vacas leiteiras. Apesar de este trabalho *in vivo* ter utilizado vacas canuladas no rúmen com o objetivo de obter estimativas de absorção representativas de ruminantes funcionais, o efeito da relação entre a superfície da digesta e o seu volume não teve o intuito de gerar valores com aplicabilidade direta a vacas leiteiras em condições de produção. Estas foram representadas neste trabalho apenas pelo tratamento VAPA, com a ressalva do alto valor de pH (TABELA 3).

TABELA 2 - Massa e teor de matéria seca (MStol) e de matéria natural (MN) na digesta ruminal de vacas nas quais foram induzidos por 4 horas alto volume ruminal e pH alto (VAPA), baixo volume ruminal e pH alto (VBPA) ou baixo volume ruminal e pH baixo (VBPB)

	VAPA	VBPA	VBPB	EPM ¹	Trat	<i>P</i> ²	
						VAPA vs VBPA	VBPA vs VBPB
Digesta evacuada e retornada							
MN (kg)	58,9	25,0	25,0	2,04	<0,01	<0,01	1,00
MStol (% da MN)	15,7	15,1	15,2	0,44	0,66	0,41	0,90
MStol (kg)	9,0	3,8	3,8	0,27	<0,01	<0,01	0,98
Umidade ³ (kg)	49,8	21,2	21,2	1,85	<0,01	<0,01	0,99
Volume (l)	66,0	26,6	26,6	2,34	<0,01	<0,01	1,00
Volume ^{0,66} (l)	15,8	8,7	8,7	0,38	<0,01	<0,01	1,00
Volume ^{0,66} / Volume	0,242	0,328	0,328	0,0032	<0,01	<0,01	0,99
Digesta após 4 horas da infusão							
MN (kg)	70,6	36,4	31,3	3,37	<0,01	<0,01	0,32
MStol (% da MN)	12,4	11,8	12,7	0,56	0,54	0,50	0,29
MStol (kg)	8,6	4,2	3,9	0,36	<0,01	<0,01	0,57
Umidade (kg)	61,9	32,1	27,4	3,13	<0,01	<0,01	0,31
Volume (l)	74,6	37,4	31,2	3,33	<0,01	<0,01	0,21
Volume ^{0,66} (l)	17,2	10,9	9,6	0,57	<0,01	<0,01	0,15
Volume ^{0,66} / Volume	0,232	0,294	0,313	0,0069	<0,01	<0,01	0,07
Ganho de umidade ⁴ (kg)	12,0	10,9	6,2	2,04	0,17	0,72	0,14
Ganho de umidade ⁵ (%)	25,8	51,6	29,4	8,70	0,14	0,08	0,10

¹ EPM = Erro padrão da média

² *P* = Valores de *P* para o efeito de tratamento (Trat) e para os contrastes VAPA vs VBPA e VBPA vs VBPB

³ Umidade = MN – MStol

⁴ Ganho de umidade = Umidade após 4 horas da infusão – Umidade retornada

⁵ Ganho de umidade = (Ganho de umidade em kg / Umidade retornada em kg) x 100

TABELA 3 - Concentração ruminal (mM/ppm) de Acetato (Acet/Cr), Propionato (Prop/Cr) e Butirato (But/Cr) divididos pela concentração ruminal de Cromo e pH ruminal ao longo de 4 horas em vacas nas quais foram induzidos alto volume ruminal e pH alto (VAPA), baixo volume ruminal e pH alto (VBPA) ou baixo volume ruminal e pH baixo (VBPB)

	<i>P</i> ²								
	VAPA	VBPA	VBPB	EPM ¹	Trat	Temp	Int	VAPA vs VBPA	VBPA vs VBPB
Acet/Cr	1,67	1,58	1,19	0,073	<0,01	0,34	<0,01	0,44	<0,01
Prop/Cr	0,50	0,53	0,31	0,032	<0,01	0,23	<0,01	0,62	<0,01
But/Cr	0,24	0,21	0,13	0,010	<0,01	0,02	0,01	0,08	<0,01
pH 0 ³	6,52	6,64	4,88	0,15	<0,01			0,62	<0,01
pH 240	6,82	7,10	6,56	0,16	0,09			0,24	0,03
DIF pH	0,29	0,47	1,68	0,13	<0,01			0,40	<0,01
pH	6,78	7,08	5,90	0,14	<0,01	<0,01	<0,01	0,29	<0,01

¹ EPM = Erro padrão da média

² *P* = Valores de *P* para o efeito de tratamento (Trat), tempo de amostragem (Temp), interação entre Trat e Temp (Int) e para os contrastes VAPA vs VBPA e VBPA vs VBPB

³ pH 0 = pH no tempo zero da infusão. pH 240 = pH no tempo 240 da infusão
DIF pH = pH 240 – pH 0. pH = pH médio

Um desafio nos estudos *in vivo* avaliando o efeito do pH sobre a absorção de AGV é a manutenção do mesmo dentro de valores desejados ao longo do período de amostragem da solução marcadora. Dijkstra et al. (1993) observaram aumento de pH, ao longo de uma hora de amostragem, variando de 1,03 a 2,63 unidades de pH, quando soluções com pH inicial variando de 7,2 a 4,5 foram introduzidas no rúmen evacuado e lavado de bovinos. Apesar da impossibilidade de manter o pH no tratamento VBPB ao redor do valor inicial de cinco (FIGURA 2), o pH médio neste tratamento foi cerca de uma unidade inferior ao pH nos tratamentos VAPA e VBPA, os últimos com valores semelhantes de pH médio (TABELA 3). Estes dados evidenciam que a mudança no pH por unidade de tempo foi inferior quando se utilizou a técnica de homogeneização dos marcadores na digesta intacta (Allen et al., 2000),

comparativamente à técnica utilizando a mistura dos mesmos em solução mineral tamponada introduzida em rúmen evacuado (Dijkstra et al., 1993). Valores de pH muito acima do fisiologicamente observado em vacas leiteiras de alta produção também não foram observados na técnica com digesta intacta (FIGURA 2), contrastando com os valores ao redor de oito observados na técnica de rúmen evacuado (Dijkstra et al., 1993).

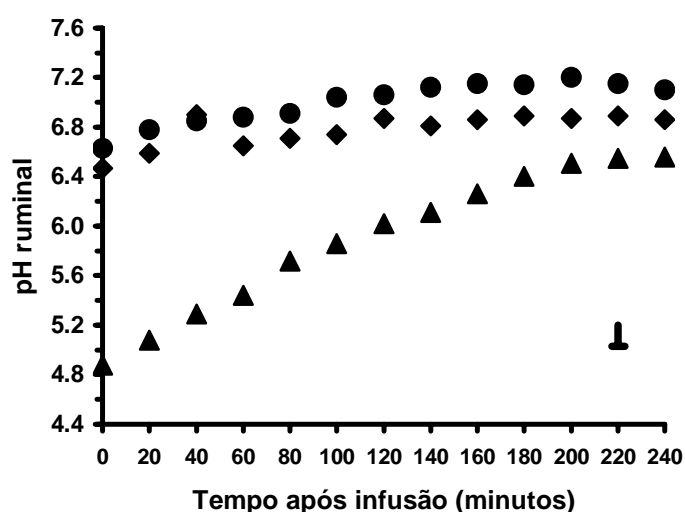


FIGURA 2 - pH da digesta ruminal ao longo de 4 horas em vacas nas quais foram induzidos alto volume ruminal e pH alto (◆ VAPA), baixo volume ruminal e pH alto (● VBPA) ou baixo volume ruminal e pH baixo (▲ VBPB)

A elevação do pH ruminal ao longo do tempo reflete a remoção rápida de AGV na forma protonada por difusão ditada pelo gradiente de concentração entre o conteúdo ruminal e os vasos sanguíneos da mucosa (Gäbel et al., 2002), e a liberação simultânea de bicarbonato para dentro do rúmen durante a troca iônica com a forma dissociada (Gäbel et al., 2002; Kramer et al., 1996; Sehested et al., 1999b). Atuação sobre o volume da digesta, em alto pH, não induziu variação significativa na acidez ruminal, apesar de esta ter sido numericamente

menor no baixo volume (TABELA 3). Resende Júnior et al. (2006b) observaram que variação de 65 a 120 litros no volume da digesta foi capaz de se correlacionar negativamente com velocidade de absorção de AGV e pH ruminal de vacas Holandesas. Em absorção de AGV teoricamente mais lenta, por menor proporção da forma protonada dos ácidos em alto valor de pH, atuação sobre a relação entre a superfície de absorção e o volume de digesta não foi um importante determinante do pH do fluido ruminal.

A redução do pH inicial no tratamento VBPB aumentou a amplitude de variação entre o pH inicial e o pH final da digesta (TABELA 3). A concentração ruminal de acetato, propionato e butirato, ajustada para a diluição da digesta pelo influxo endógeno de água para o rúmen, caiu linearmente no tratamento VBPB, e foi praticamente constante nos tratamentos com alto pH (TABELA 3, FIGURA 3). O aumento na proporção de AGV protonados, resultado do baixo pH, aparentemente induziu um fluxo de AGV por absorção pela parede maior que a taxa de produção de AGV ao longo do período de infusão. Em baixo pH, o alto efluxo de AGV para o epitélio pode ser um fator importante na etiologia da acidose ruminal em bovinos (Barker et al., 1995), aumentando a possibilidade de inibição química da motilidade ruminal, especialmente por butirato (Crichlow & Chaplin, 1985). Em contrapartida, alto *clearance* de AGV poderia reduzir o efeito indesejável do baixo pH sobre o crescimento microbiano (Hoover, 1986). Alta capacidade de metabolização de AGV (Bergman, 1990) e drenagem pelo sangue (Dobson et al., 1976) são importantes para a normalidade fisiológica em vacas leiteiras consumindo dietas de alta fermentabilidade.

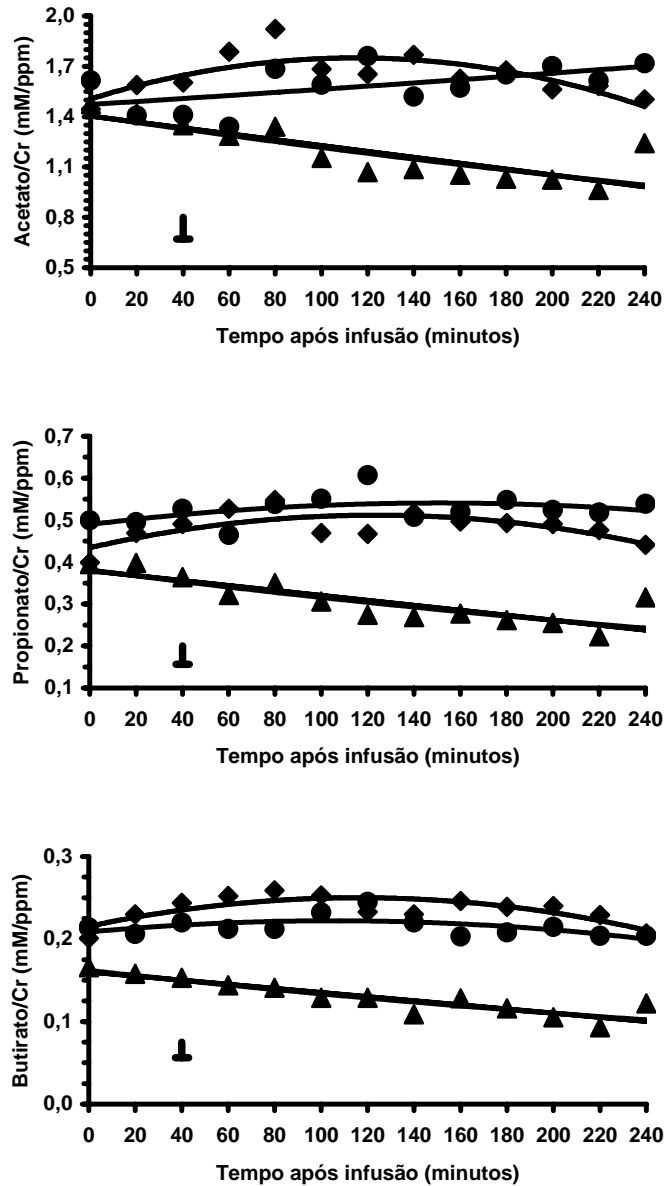


FIGURA 3 - Concentração ruminal de Acetato, Propionato e Butirato divididos pela concentração de Cromo (mM/ppm) ao longo de 4 horas em vacas nas quais foram induzidos alto volume ruminal e pH alto (♦ VAPA), baixo volume ruminal e pH alto (● VBPA) ou baixo volume ruminal e pH baixo (▲ VBPB)

Em concordância com o observado para o pH e para a concentração de AGV na digesta (TABELA 3), a k Val/Cr foi mais alta no tratamento VBPB, enquanto a redução do volume ruminal em alto pH induziu aumento apenas numérico nesta variável (TABELA 4). Dentre as variáveis morfométricas, a mais correlacionada à k Val/Cr foi a superfície de absorção por cm^2 de parede (FIGURA 4, TABELA 5). A correlação entre a k Val/Cr e o pH ruminal foi positiva (FIGURA 5). Similarmente, Dirksen et al. (1985) observaram que maior desenvolvimento da mucosa ruminal com dieta rica em energia aumentou o efluxo de AGV do rúmen e o pH intra-ruminal. Apesar de terem sido correlacionadas à k Val/Cr, as mensurações microscópicas do epitélio tiveram menor coeficiente de correlação com a velocidade de absorção de AGV do que as mensurações macroscópicas (TABELA 5). Este fato sugere que a superfície de absorção parece ser um fator mais determinante do *clearance* de AGV por absorção do que características histológicas do epitélio. Grande área de superfície de epitélio pouco espesso parece ser desejável.

TABELA 4 - Taxas fracionais de queda na concentração de Valerato/Cromo (k Val/Cr) e de Cromo (k Cr) na digesta ruminal de vacas nas quais foram induzidos por 4 horas alto volume ruminal e pH alto (VAPA), baixo volume ruminal e pH alto (VBPA) ou baixo volume ruminal e pH baixo (VBPB)

	VAPA	VBPA	VBPB	EPM ¹	Trat	<i>P</i> ²	
						VAPA vs VBPA	VBPA vs VBPB
k Cr ($\% \text{ h}^{-1}$)	6,3	12,1	8,1	1,09	0,02	<0,01	0,03
k Val/Cr ($\% \text{ h}^{-1}$)	19,6	23,9	35,0	2,01	<0,01	0,21	<0,01

¹EPM = Erro padrão da média

²*P* = Valores de *P* para o efeito de tratamento (Trat) e para os contrastes VAPA vs VBPA e VBPA vs VBPB

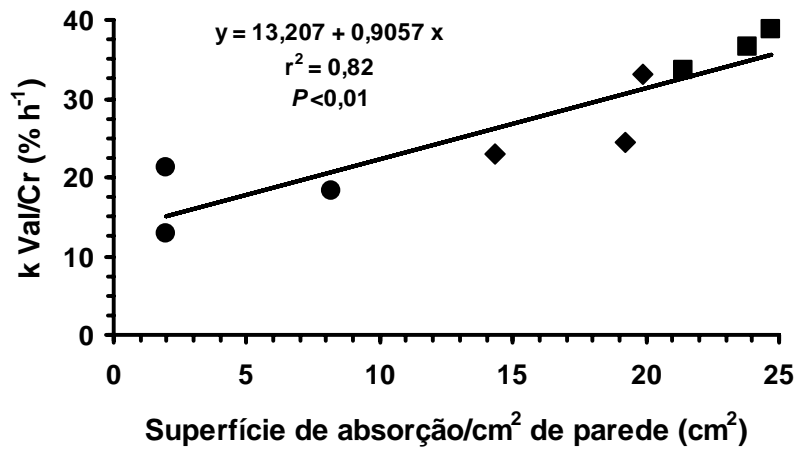


FIGURA 4 - Correlação entre a taxa fracional de absorção de valerato (k Val/Cr) e a superfície de absorção por cm² de parede ruminal em três vacas Jersey não lactantes (● Secas), três vacas Girolando em lactação (◆ Médio) e três vacas Holandesas em lactação (■ Alto). O valor de cada animal é a média de três observações obtidas em três períodos experimentais

TABELA 5 - Correlação e *P* para a inclinação da reta entre a morfometria da parede do rúmen e a taxa fracional de absorção de valerato (k Val/Cr)

	2	3	4	5	6	7	8	k Val/Cr (% h ⁻¹)
1 - Índice mitótico (% das células basais)	0,77 <i>P</i> =0,01	0,77 <i>P</i> =0,01	0,36 <i>P</i> =0,34	0,62 <i>P</i> =0,07	-0,51 <i>P</i> =0,16	-0,77 <i>P</i> =0,01	-0,37 <i>P</i> =0,33	0,61 <i>P</i> =0,08
2 - Área por papila (cm ²)		0,95 <i>P</i> <0,01	0,50 <i>P</i> =0,17	0,80 <i>P</i> <0,01	-0,72 <i>P</i> =0,03	-0,87 <i>P</i> <0,01	-0,59 <i>P</i> =0,09	0,83 <i>P</i> <0,01
3 - Superfície de absorção/cm ² de parede (cm ²)			0,69 <i>P</i> =0,04	0,88 <i>P</i> <0,01	-0,74 <i>P</i> =0,02	-0,89 <i>P</i> <0,01	-0,62 <i>P</i> =0,07	0,90 <i>P</i> <0,01
4 - Número de papilas/cm ² de parede				0,89 <i>P</i> <0,01	-0,49 <i>P</i> =0,18	-0,70 <i>P</i> =0,04	-0,37 <i>P</i> =0,33	0,55 <i>P</i> =0,12
5 - Área papilar (% da superfície de absorção)					-0,65 <i>P</i> =0,05	-0,91 <i>P</i> <0,01	-0,50 <i>P</i> =0,17	0,68 <i>P</i> =0,04
6 - Espessura do epitélio (µm)						0,80 <i>P</i> =0,01	0,98 <i>P</i> <0,01	-0,57 <i>P</i> =0,11
7 - Espessura da camada queratinizada (µm)							0,65 <i>P</i> =0,06	-0,61 <i>P</i> =0,08
8 - Espessura das camadas não queratinizadas (µm)								-0,50 <i>P</i> =0,17

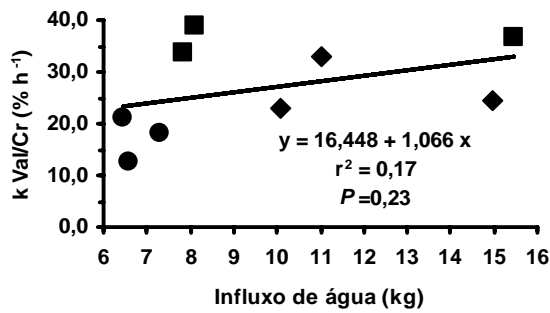
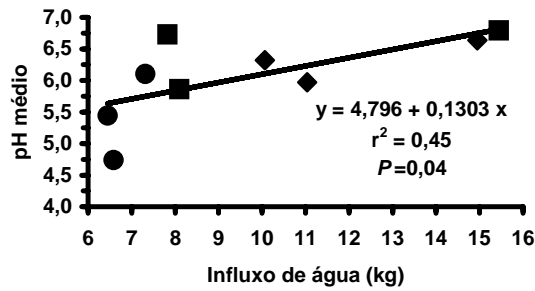
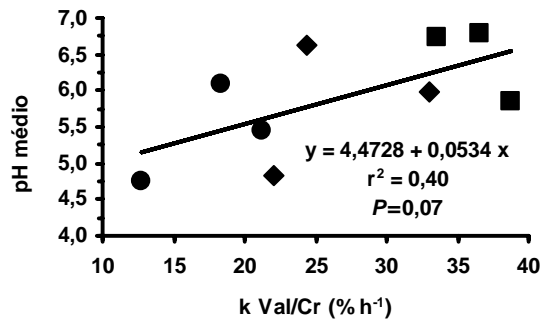


FIGURA 5 – Correlações entre a taxa fracional de absorção de valerato (k Val/Cr) e o pH médio, entre o influxo de água (kg) e o pH médio, e entre o influxo de água (kg) e k Val/Cr em três vacas Jersey não lactantes (● Secas), três vacas Girolando em lactação (◆ Médio) e três vacas Holandesas em lactação (■ Alto). O valor de cada animal é a média de três observações obtidas em três períodos experimentais

A correlação entre a superfície de absorção e a k Val/Cr foi maior nos tratamentos com alto pH ruminal do que no tratamento VBPB (FIGURA 6). Estes dados sugerem que nas situações em que a velocidade de absorção de AGV é inibida por alto pH, características da parede ruminal podem ser mais determinantes da absorção, comparativamente a condições acidogênicas capazes de acelerar a velocidade de absorção, por indução de maior proporção de AGV na forma protonada. Como vacas de alta produção apresentam baixo pH ruminal, o impacto da morfologia papilar sobre a capacidade absorptiva pode não ser tão marcado nestes animais. Entretanto, em vacas peri-parto, com baixo consumo de alimentos e alto pH, o impacto da morfologia papilar sobre a capacidade de absorção pode adquirir maior importância, justificando manejos alimentares no período pré-parto capazes de amplificar a capacidade absorptiva da parede do rúmen no pós-parto imediato.

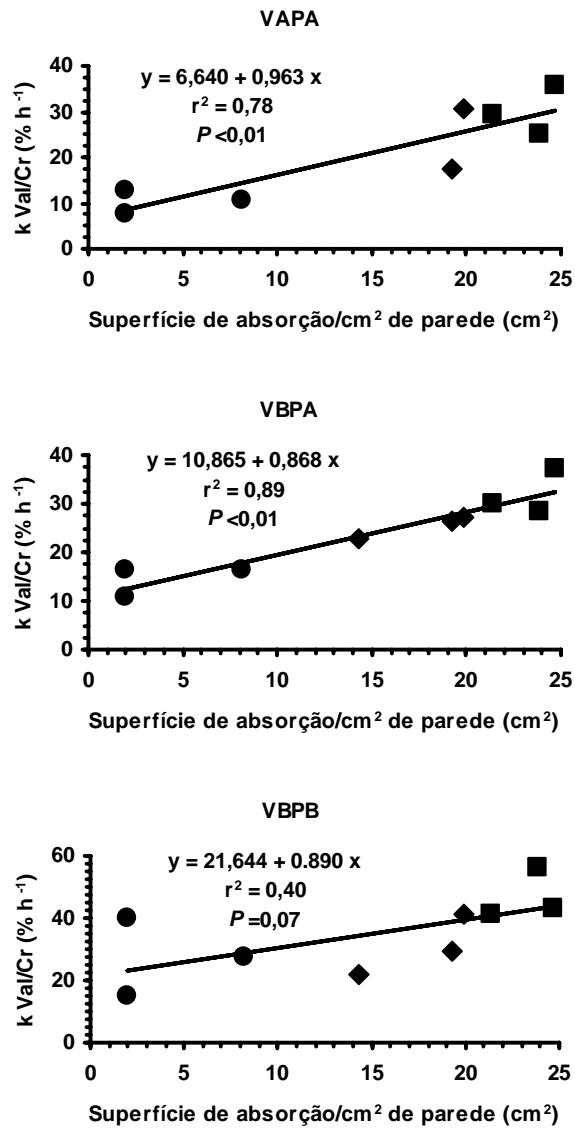


FIGURA 6 - Correlação entre a taxa fracional de absorção de valerato (k Val/Cr) e a superfície de absorção por cm² de parede ruminal em três vacas Jersey não lactantes (● Secas), três vacas Gírolando em lactação (◆ Médio) e três vacas Holandesas em lactação (■ Alto), mensuradas em alto volume ruminal e pH alto (VAPA), baixo volume ruminal e pH alto (VBPA) ou baixo volume ruminal e pH baixo (VBPB)

Em condições fisiológicas normais, a digesta ruminal é hipotônica relativamente ao sangue, ocorrendo efluxo de água do rúmen para o sangue pela parede do órgão (Carter & Grovum, 1990a). Entretanto, semelhantemente ao observado por Dijkstra et al. (1993), ocorreu influxo de água durante o período de permanência da digesta com marcadores no rúmen. A taxa fracional de diluição do Cr foi positiva (TABELA 4) e houve ganho de umidade entre o início e o final do período de coleta de dados (TABELA 2). A relação entre a superfície da digesta e o seu volume caiu levemente ao longo do período de coleta de dados, entretanto o objetivo de se obter um tratamento com alta relação (VAPA) e dois com baixa relação (VBPA e VBPB) não foi comprometido (TABELA 2). Desde que o influxo de água para o rúmen pode reduzir a absorção de AGV, por atuação negativa sobre o efluxo sanguíneo do órgão (López et al., 1994), as estimativas de $k_{Val/Cr}$ obtidas podem ser consideradas valores mínimos para o dado ambiente ruminal.

O influxo de água para o rúmen evidencia que a digesta estava hipertônica relativamente ao sangue da mucosa (López et al., 1994; Peters et al., 1990). O tempo decorrido entre a evacuação ruminal e o retorno da digesta evacuada pode ter reduzido a concentração de solutos no epitélio relativamente à concentração no lúmen do órgão, especialmente AGV. A k_{Cr} no tratamento VBPB foi mais lenta do que no tratamento VBPA (TABELA 4), sugerindo que a maior $k_{Val/Cr}$ no primeiro induziu um menor gradiente osmótico entre o rúmen e o sangue. Parece ser coerente concluir que o menor pH induzido experimentalmente aumentou a velocidade de absorção de AGV, induzindo queda na concentração ruminal e aumento na proporção de AGV na forma protonada, osmoticamente menos ativa que a forma iônica dos ácidos, levando a queda na hipertonicidade do fluido relativamente ao sangue, o que reduziu o influxo de líquido para o rúmen.

O ganho de umidade em quatro horas foi semelhante nos dois tratamentos com alto pH e tendeu a ser mais baixo no tratamento VBPB (TABELA 2). Entretanto, no tratamento VBPA ocorreu o maior ganho de umidade como porcentagem do volume de digesta retornado (TABELA 2), resultando na maior k_{Cr} neste tratamento (TABELA 4). O influxo de água como porcentagem da superfície de digesta retornada ($\text{Volume}^{0,66}$) foi 76% no tratamento VAPA, 125% no VBPA e 71% no VBPB. A massa de influxo de água por unidade de tempo foi aparentemente uma constante definida pelo pH da solução, independentemente da superfície de contato entre a digesta e a parede ruminal. Estes achados não são completamente semelhantes aos de Dijkstra et al. (1993), segundo os quais 30 litros de solução tamponada de AGV induziram maior influxo de água para o rúmen do que 10 litros da mesma solução. Naquele trabalho, 30 litros de solução também induziram menor taxa fracional de absorção de acetato, propionato e butirato, menor pH final da solução marcadora após uma hora de permanência desta no rúmen e maior osmolaridade da solução ao final do período de coleta de dados.

Apesar de a relação entre a $k_{Val/Cr}$ e o influxo de água ter sido negativa entre tratamentos, ou seja, quanto maior a taxa fracional de absorção, induzida por baixo pH, menor o influxo de água para o rúmen (TABELAS 2 e 4), a mesma relação não foi observada entre vacas (FIGURA 5). Quando a média das três mensurações de cada animal foi avaliada, tanto a correlação entre o influxo de água e a $k_{Val/Cr}$ quanto a correlação entre o influxo e o pH foram positivas (FIGURA 5). Vacas mais capazes de manter alto pH ruminal tiveram valor mais alto de $k_{Val/Cr}$ e maior influxo de líquidos para o rúmen. Nos animais com alto influxo de água para o rúmen, a manutenção da hipertonicidade da digesta relativamente ao sangue pode ter envolvido uma maior metabolização de AGV pelo epitélio ou maior efluxo de AGV intacto com

a drenagem sanguínea, já que estes animais também tiveram k Val/Cr mais alto (FIGURA 5).

Correlação positiva foi observada entre a morfologia ruminal e o influxo de água para o rúmen (FIGURA 7). Maior superfície de absorção pode estar relacionada a maior fluxo sanguíneo para o órgão (Barnes et al., 1983) e determina a relação entre a superfície de digesta e a superfície de mucosa. Maior massa de mucosa parece ser desejável tanto para remover e metabolizar AGV quanto para permitir maior diluição da digesta por líquido fluindo do sangue para o rúmen. O maior influxo de água para o rúmen poderia aumentar a taxa fracional de passagem de líquidos (López et al., 1994), capaz de aumentar a remoção de AGV para o omaso por passagem com a digesta (Resende Júnior et al., 2006b), contribuindo para a manutenção do pH ruminal em vacas de alta produção (Voelker & Allen, 2003).

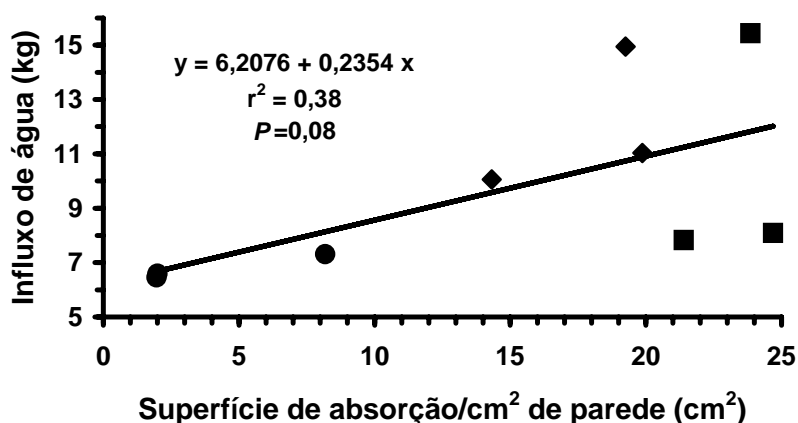


FIGURA 7 - Correlação entre o influxo de água para o rúmen e a superfície de absorção por cm² de parede ruminal em três vacas Jersey não lactantes (● Secas), três vacas Girolando em lactação (◆ Médio) e três vacas Holandesas em lactação (■ Alto). O valor de cada animal é a média de três observações obtidas em três períodos experimentais

5 - CONCLUSÕES

As estimativas de k Val/Cr foram coerentes com os tratamentos impostos, mostrando que a técnica de homogeneização em dose única de valerato e marcador de fase fluida a conteúdo ruminal intacto foi sensível a variações na morfofisiologia do rúmen. Baixo pH ruminal acelerou a absorção de AGV pela parede do rúmen, enquanto redução da relação entre a superfície da digesta e o seu volume, em alto pH, teve efeito pouco pronunciado. A superfície de absorção por cm^2 de parede ruminal foi a variável morfométrica mais correlacionada à velocidade de absorção de AGV. Grande área de absorção e mucosa com epitélio pouco espesso parecem ser desejáveis. Estimativas da velocidade de absorção de AGV obtidas por esta técnica podem estar sendo subestimadas pelo influxo endógeno de água do sangue para o rúmen. Metodologias capazes de induzir uma boa homogeneização dos marcadores à digesta, sem a necessidade de evacuação ruminal, e o conseqüente distúrbio no equilíbrio osmótico entre a digesta e o sangue, merecem ser avaliadas. Vacas capazes de manter um ambiente ruminal menos ácido tiveram mucosa ruminal mais desenvolvida, foram mais eficientes em absorver AGV e tiveram maior influxo endógeno de água para a cavidade digestiva.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M. S.; ARMENTANO, L. E.; PEREIRA, M. N.; YING, Y.; XU, J. Meted to measure fractional rate of volatile fatty acid absorption from the rumen. In: CONFERENCE ON RUMEN FUNCTION, 25., 2000, Chicago. **Proceedings...** Chicago, 2000. p. 26.
- BALDWIN, R. L.; JESSE, B. W. Development changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep ruminal cells. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 122, n. 5, p. 1149-1153, May 1992.
- BARCROFT, J.; McANALLY, R. A.; PHILLIPSON, A. T. Absorption of volatile acids from the alimentary tract of the sheep and other animals. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 20, n. 3/4, p. 120-129, 1944.
- 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.
- 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.
- BENNINK, M. R.; TYLER, T. R.; WARD, G. M.; JOHNSON, D. E. Ionic milieu of bovine and ovine rumen as affected by diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 61, n. 3, p. 315-323, Mar. 1978.
- BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 567-590, Apr. 1990.
- BINNERTS, W. T.; VAN'T KLOOSTER, A. T.; FRENS, A. M. Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. **The Veterinary Record**, London, v. 82, n. 16, p. 470, 1968.
- BULL, L. S.; BLUSH, L. J.; FRIEND, J. D.; HARRIS, B. JR.; JONES, E. W. Incidence of ruminal parakeratosis in calves fed different rations and its relation to volatile fatty acid absorption. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 48, n. 11, p. 1459-1466, Nov. 1965.

CARTER, R. R.; GROVUM, W. L. A review of the physiological significance of hypertonic body fluids on feed intake and ruminal function: salivation, motility and microbes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2811-2832, Sept. 1990a.

CARTER, R. R.; GROVUM, W. L. Factors affecting the voluntary intake of food by sheep. 5. The inhibitory effect of hypertonicity in the rumen. **British Journal of Nutrition**, New York, v. 64, n. 1, p. 285-299, July 1990b.

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

CRICHLOW, E. C.; CHAPLIN, R. K. Ruminal 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.

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

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

DEWAR, W. A.; McDONALD, P. Determination of dry matter in silage by distillation with toluene. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 12, n. 11, p. 790-795, Nov. 1961.

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

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

DOBSON, A.; SELLERS, A. F.; GATEWOOD, V. H. Absorption and exchange of water across rumen epithelium. **American Journal of Physiology**, v. 231, n. 5, p. 1588-1594, Nov. 1976.

FUKUSHIMA, M. Chemistry of short-chain fatty acids. In: CUMMINGS, J. H.; ROMBEAU, J. L.; SAKATA T. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. Cap. 2, p. 15-34.

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

GÄBEL, G.; MAREK, M.; MARTENS, H. Influence of food deprivation on SCFA and electrolyte transport across sheep reticulorumen. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 40, n. 5, p. 399-344, June 1993.

GÁLFI, P.; NEOGRÁDY, S.; KUTAS, F. Dissimilar ruminal epithelial response to short-term and continuous intraruminal infusion of sodium n-butyrate. **Zentralblatt Für Veterinar Medizin**, Berlin, v. 33, n. 1, p. 47- 52, 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, Dec. 1983.

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

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. **Quartely Journal of Experimental Physiology**, New York, v. 66, n. 4, p. 487-499, Oct. 1981.

GRAY, F. V.; PILGRIM, A. F.; RODDA, H. J.; WELLER, R. A. The nature and origin of the volatile fatty acids in the rumen of the sheep. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 29, n. 1, p. 57-68, 1952.

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.

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. 1069-1073, Aug. 1965.

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 10, p. 2755-2766, Oct. 1986.

HUNTINGTON, G. B.; REYNOLDS, P. J.; TYRRELL, H. F. Net absorption and ruminal concentrations of metabolites in nonpregnant dry Holstein cows before and after intraruminal acetic acid infusion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n. 9, p. 1901-1908, Sept. 1983.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488 p.

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

KRISTENSEN, N. B. Rumen microbial sequestration of [2-(13)C] acetate in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 9, p. 2491-2498, Sept. 2001.

LILLIE, R. D.; FULLMER, H. M. **Histopathological technique and practical Histochemistry**. 4. ed. New York: McGraw Hill, 1968.

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

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

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

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

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

NOZIÈRE, P.; MARTIN, C.; RÉMOND, D.; KRISTENSEN, N. B.; BERNARD, R.; DOREAU, M. Effect of composition of ruminally-infused short-chain fatty acids on net fluxes of nutrients across portal-drained viscera in underfed ewes. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 83, n. 5, p. 521-531, May 2000.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. Acidosis in cattle: A review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 275-286, Jan. 1998.

PEREIRA, M. N.; ARMENTANTO, L. E. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. II . Digestion and rumen function. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 12, p. 2876-2887, Dec. 2000.

PEREIRA, M. N. **Responses of lactating cows to dietary fiber from alfafa or cereal byproducts.** 1997. 186 p. Thesis (Doctor in Animal Nutrition) - University of Wiscosin, Madison.

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.; PAULISSEN, J. B.; ROBINSON, J. A. The effects of diet on water flux and volatile fatty acid concentrations in the rumen of growing beef steers fed once daily. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 6, p. 1711-1718, June 1990.

RÉMOND, D.; CHAISE, J. P.; DELVAL, E.; PONCET, C. Net fluxes of metabolites across the ruminal wall of sheep fed twice a day with orchardgrass hay. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 9, p. 2529-2538, Sept. 1993.

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

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

ROWE, J. B.; LOUGHNAN, M. L.; NOLAN, J. V.; LENG, R. A. Secondary fermentation in the rumen of a sheep given a diet based on molasses. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 41, n. 2, p. 393-397, Mar. 1979.

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

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

SALVADOR, S. C.; PEREIRA, M. N.; SANTOS, J. F.; MELO, L. Q.; CHAVES, M. L. Suplementação com milho e minerais orgânicos de dietas com alto teor de polpa cítrica para vacas em lactação I : Consumo e digestão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, 2007. No prelo.

SAS Institute. **SAS® user'guide: statistics**. 5. ed. Cary, 1985. 1290p.

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

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

SUTTON, J. D.; MCGILLIARD, A. D.; MARLENE RICHARD; JACOBSON, N. L. Functional development of rumen mucosa. II. Metabolic activity. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 46, n. 5, p. 530-537, May 1963.

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.; SAKATA, T. Ultrastructural changes in the ruminal epithelium after fasting and subsequent refeeding in the sheep. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Tohoku, v. 25, p. 142-155, 1974.

TERNOUTH, J. H. Post-prandial ionic and water exchange in the rumen. **Research Veterinary Science**, London, v. 8, n. 3, p. 283-293, July 1967.

TERNOUTH, J. H. Changes in the thiosulphate space and some constituents of the blood of sheep after feeding. **Research Veterinary Science**, London, v. 9, n. 4, p. 345-349, July 1968.

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

WEIGAND, E.; YOUNG, J. W.; MCGILLIARD, A. D. Extent of butyrate metabolism by bovine ruminoreticulum epithelium and the relationship to absorption rate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 55, n. 5, p. 589-597, May 1971.

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. 9, p. 1294-1300, Sept. 1975.

YARNS, D. A.; PUTNAM, P. A.; LEFFEL, E. C. Rumen constituents affecting salivary secretion. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 24, n. 3, p. 805-809, 1965.

ZITNAN, R.; BOMBA, A.; SOMMER, A.; KOLODZIEYSKI, L. Development of rumen metabolism and ruminal epithelium in lambs. **Archiv fur Tierernahrung**, Berlin, v. 44, n. 3, p. 227-233, 1993.