



RONALDO FRANCISCO DE LIMA

**RESPOSTA MORFOLÓGICA DAS MUCOSAS
RUMINAL E OMASAL À VARIAÇÃO
ALIMENTAR**

LAVRAS - MG

2010

RONALDO FRANCISCO DE LIMA

**RESPOSTA MORFOLÓGICA DAS MUCOSAS RUMINAL E OMASAL
À VARIAÇÃO ALIMENTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior

Co-orientadores

Dra. Suely de Fátima Costa

Dr. Pedro Soares Bezerra Júnior

LAVRAS - MG

2010

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

Lima, Ronaldo Francisco de.

Resposta morfológica das mucosas ruminal e omasal à variação alimentar / Ronaldo Francisco de Lima. – Lavras : UFLA, 2010.
49 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.
Orientador: João Chrysóstomo de Resende Júnior.
Bibliografia.

1. Gado leiteiro. 2. Acidose. 3. Ácido graxo volátil. 4. Dieta de transição. 5. Índice mitótico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.2089133

RONALDO FRANCISCO DE LIMA

**RESPOSTA MORFOLÓGICA DAS MUCOSAS RUMINAL E OMASAL
À VARIAÇÃO ALIMENTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 04 de agosto de 2010.

Dra. Cristina Delarete Drummond UFLA

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo UFLA

Dra. Suely de Fátima Costa UFLA

Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior

Orientador

LAVRAS – MG

2010

À minha mãe Norma, ao meu pai Geraldo, ao meu irmão Rodrigo e à minha
namorada Renata,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e sabedoria.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos membros da banca de avaliação: Prof^a. Dra. Cristina, Prof^a. Dra. Suely, Prof. Dr. Márcio e ao Prof. Dr. José Rafael que aceitou o convite de membro suplente da banca.

Ao grande amigo Resende Júnior pelos sete anos de orientação, companheirismo e amizade (obrigado João).

Ao amigo João Luiz que sempre ajudou.

À amiga Leandra Melo pela grande ajuda.

À Professora Suely pela amizade e orientação, a qual eu tenho grande admiração e carinho, que foi indispensável na realização desse trabalho.

Ao grande amigo Berin por sempre estar pronto em ajudar na secretaria do programa.

Aos amigos Matheus Balduino, Tiago Teófilo, Milton Cardoso, Danilo Santoro, Lucas de Castro, Luiz Sergio, Thiago França e Josenel.

A todos que contribuíram para a realização do tão sonhado Mestrado.

“Comprender que há outros pontos de vista é o início da sabedoria”

Thomas Campbell

RESUMO

A capacidade de absorção de ácidos graxos voláteis (AGV) do rúmen é proporcional à extensão de sua superfície absorptiva a qual responde positivamente ao estímulo direto e indireto dos próprios AGV. Existem indícios de que a parede do omaso, que em vacas leiteiras é responsável por cerca de 40% da absorção de AGV, responde igualmente aos mesmos estímulos de proliferação que a parede do rúmen. Com o objetivo de testar esta hipótese foram comparados os aspectos morfológicos de fragmentos de rúmen e de omaso obtidos por biopsia. Quatro vacas não lactantes e não gestantes, sem raças definidas e idades diferentes, foram alimentadas seqüencialmente com duas dietas, uma composta somente por forragem e outra composta por forragem e concentrado. Nos primeiros 18 dias de experimento os animais foram alimentados com forragem, nos 18 dias seguintes receberam a dieta de forragem e concentrado. Seguiram-se então 72 horas de jejum. Biopsias do saco ventral do rúmen foram feitas ao final do período de alimentação com forragem, aos 4 e aos 18 dias do período de alimentação com concentrado e ao final do período de jejum. Seguiu-se um período de realimentação com concentrado e forragem com biopsias nos dias 4,12 e 18. A média de IMS e consumo de NDT ($P<0,001$) variou entre os períodos de alimentação e foi maior quando atingiu 18 dias de alimentação concentrada. O índice mitótico (IM) do rúmen e omaso e a concentração de AGV foi maior ($P=0,01$) no dia quatro de alimentação concentrada. Houve correlação positiva ($r^2=0,66$; $P<0,01$) entre o IM do rúmen e do omaso. A área do rúmen não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. A largura média das papilas variou entre os tratamentos e foi maior ($P<0,01$) no dia 18 de alimentação concentrada, mostrando que houve estímulo proliferativo da parede do rúmen. A semelhança nas espessuras das camadas não queratinizadas e a correlação positiva entre o índice mitótico da camada basal do epitélio do rúmen e do omaso, indicam que os estímulos de divisão celular desencadeados pelo teor de energia da dieta atuam simultaneamente nos dois compartimentos, mas o omaso parece responder mais rapidamente aos estímulos.

Palavras-chave: Acidose. Índice mitótico. Dieta de transição. Gado leiteiro. Ácido graxo volátil.

ABSTRACT

The ability to absorb volatile fatty acids (VFA) in the rumen is proportional to the extent of their absorptive surface which responds positively to the direct and indirect stimulation of VFA. There are indications that the wall of the omasum, which in dairy cows is responsible for about 40% of absorption of VFA, also responds to the same stimuli that the proliferation of the rumen wall. Aiming to test this hypothesis we compared the morphological features of fragments of rumen and omasum obtained by biopsy. Four non-lactating cows and not pregnant, not defined breeds and ages were sequentially fed two diets, one composed only of grass and other forage composed and focused. In the first 18 days of the experiment the animals were fed with forage received within 18 days following the diet of forage and concentrate. Then followed 72 hours of fasting. Biopsies of the ventral sac of the rumen were made at the end of the feeding of forage, at 4 and 18 days of the feeding period and concentrate at the end of fasting period. There followed a period of refeeding with concentrate and forage with biopsies on days 18 and 4.12. The average DMI and TDN intake ($P < 0.001$) varied between periods of feeding and was higher when it reached 18 days of concentrated feed. The mitotic index (MI) and omasum and rumen VFA concentration was higher ($P = 0.01$) in four days of concentrated feed. A positive correlation ($r^2 = 0.66$, $P < 0.01$) between IM rumen and omasum. The area of the rumen was not significantly different between treatments. The average width of papillae varied among treatments and was greater ($P < 0.01$) at 18 days of concentrated feed, which revealed proliferative stimulus of the rumen wall. The similarity in thickness of the layers are not keratinized and the positive correlation between the mitotic index of the basal layer of the epithelium of rumen, omasum, indicate that the stimulation of cell division triggered by the energy content of the diet act simultaneously in both compartments, but the omasum seems respond more quickly to stimuli.

Keywords: Acidosis. Mitotic index. Dietary transition. Dairy cattle. Volatile fatty acid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Instrumento utilizado para realização das biópsias de lâminas do omaso26
- Figura 2 Média diária de ingestão de MS (■) e de NDT (●) ao longo do período experimental de vacas não gestantes e não lactantes alimentadas com 18 dias de silagem de milho; 4 e 18 dias de alimentação com 50% silagem de milho e 50 % concentrado com base na matéria seca; 72 horas de jejum; e 4, 12 e 18 dias de realimentação com 50% de silagem e 50% de concentrado.(P < 0,001 para efeito de período de experimental).....34
- Figura 3 Concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) total (◆), no rúmen de vacas não gestantes e não lactantes, alimentadas com 18 dias de silagem de milho; 4 e 18 dias de alimentação com 50% silagem de milho e 50 % concentrado com base na matéria seca; 72 horas de jejum; e 4, 12 e 18 dias de realimentação com 50% de silagem e 50% de concentrado. (P < 0,001 para efeito de período experimental)37
- Figura 4 Área (●), comprimento (■) e área/comprimento (▲) das papilas do rúmen de vacas não gestantes e não lactantes, alimentadas com 18 dias de silagem de milho; 4 e 18 dias de alimentação com 50% silagem de milho e 50 % concentrado com base na matéria seca; 72 horas de jejum ; e 4, 12 e 18 dias de realimentação com 50% de silagem e 50% de concentrado. (P < 0.001 para efeito de período experimental para área/comprimento, P = 0,12 para comprimento e P = 0,22 para área)39

Figura 5 Correlação entre índice mitótico do rúmen e do omaso de vacas mestiças não gestantes e não lactantes. $IM\ do\ omaso = 0.8705X + 0,0281IM\ rúmen$; $r^2 = 0,66$; $P < 0,01$ 41

Figura 6 Índice mitótico do omaso (●) e do rúmen (■) de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com 18 dias de silagem de milho (18F); 4, 18 dias de alimentação com 50% silagem de milho e 50 % concentrado com base na matéria seca (4C e 18C respectivamente), 72 horas de jejum e 4, 12 e 18 dias de realimentação com 50% de silagem e 50% de concentrado (4R, 12R e 18R respectivamente). ($P = 0,01$ para interação entre órgãos e períodos).43

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 Composição das dietas utilizadas nos períodos experimentais para quatro vacas não lactantes e não gestantes com cânula ruminal para estudo do rúmen e omaso – Brasil – 2010..... | 32 |
| Tabela 2 Ingestão de matéria seca, concentração de ácidos graxos voláteis e morfologia ruminal de vacas não gestantes e não lactantes – Brasil - 2010..... | 33 |
| Tabela 3 Índice mitótico, espessura de queratina, do epitélio total e do epitélio sem queratina do rúmen e omaso de vacas mestiças não gestantes e não lactantes – Brasil – 2010..... | 42 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 2.1 | Anatomia e morfologia do proventrículo | 15 |
| 2.2 | Alterações morfológicas do ruminorretículo à variações nutricionais | 16 |
| 2.3 | Estudo da morfofisiologia do omaso | 20 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 3.1 | Animais, instalações e tratamentos | 23 |
| 3.2 | Determinação do consumo de matéria seca e análises bromatológicas | 24 |
| 3.3 | Amostras de fluido ruminal | 24 |
| 3.4 | Avaliações morfológicas | 25 |
| 3.4.1 | Macroscopia do rúmen | 26 |
| 3.4.2 | Microscopia | 27 |
| 3.5 | Análises estatísticas | 29 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 5 | CONCLUSÃO | 44 |
| | REFERÊNCIAS | 45 |

1 INTRODUÇÃO

A evolução dos ruminantes vem ocorrendo bem antes de sua domesticação. Eram selecionadores de concentrado, passaram a ser injetores de forragens grosseiras. Hoje, com o melhoramento genético dos animais de produção, os ruminantes, principalmente os bovinos de alta produção, passaram a ter que ingerir dietas com alta inclusão de concentrado para atender às suas demandas nutricionais. No entanto, esses ruminantes nem sempre passam por um processo de adaptação para ingerir dietas com alto teor de carboidratos não fibrosos que tem alta velocidade de degradação e conseqüente rápida produção de ácidos graxos voláteis (AGV) podendo propiciar um distúrbio denominado acidose ruminal.

A acidose ruminal acontece quando a taxa de produção de AGV excede a taxa de remoção desses mesmos ácidos, diminuindo o pH ruminal. A remoção de AGV também conhecida como *clearance* de AGV no ruminorretículo ocorre por duas formas, absorção pela parede e passagem para o omaso. A capacidade de absorção está diretamente relacionada à extensão da superfície absorptiva do órgão e ela pode ser manipulada pela dieta como demonstrado por vários autores no rúmen

Para manipular o tamanho da superfície de absorção do epitélio do rúmen, além de mensurações macroscópicas, como medição de área e tamanho de papilas ruminais tem-se usado o índice mitótico para medir a capacidade proliferativa do epitélio ruminal.

Em vacas leiteiras de 36% (VOELKER; ALLEN, 2003) a 45% de AGV (RESENDE JÚNIOR et al., 2006a) produzidos no rúmen chegam ao omaso e precisam ser absorvidos nesse compartimento. Então o omaso é de fundamental importância para o *clearance* de AGV. Apesar desta importância, há poucos estudos que relacionam a dieta ingerida à capacidade de absorção do omaso.

O objetivo desse trabalho foi comparar a resposta morfológica das mucosas do rúmen e do omaso à variação alimentar por meio da verificação do efeito da dieta sobre a superfície absorptiva do rúmen; sobre, os índices mitótico dos epitélios ruminal e omasal; e sobre as espessuras das camadas queratinizadas e não queratinizadas dos epitélios ruminal e omasal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anatomia e morfologia do proventrículo

O estômago de animais ruminantes é constituído por quatro compartimentos morfológicamente distintos, os três primeiros, rúmen, retículo e omaso correspondem à parte aglandular, também chamada de proventrículo e a parte glandular é constituída pelo abomaso (DELLMAN; BROWN, 1982). Por não haver barreira anatômica consistente entre o rúmen e o retículo (NICKEL; SCHUMMER; SEIFERLE, 1981), estes compartimentos são freqüentemente chamados ruminoretículo.

O rúmen é dividido internamente em sacos por pilares musculares. Os pilares mais consistentes dividem o órgão em sacos cranial, dorsal e ventral, enquanto pilares menos espessos dividem os sacos cegos caudodorsal e caudoventral. Esse compartimento é responsável por aproximadamente 84% da capacidade de armazenamento do estômago e sua mucosa é caracterizada por projeções denominadas papilas ruminais. O retículo é o menor dos quatro compartimentos e, internamente, possui projeções anastomosadas denominadas cristas, que delimitam áreas poligonais, as células do retículo (NICKEL; SCHUMMER; SEIFERLE, 1981).

O omaso é um compartimento de tamanho intermediário e apresenta aproximadamente 42 % do peso do rúmen vazio (DANIEL; RESENDE JÚNIOR; CRUZ, 2006). Sua parede apresenta inúmeras projeções de diferentes tamanhos denominadas lâminas, que são sobrepostas umas as outras como as folhas de um livro (NICKEL; SCHUMMER; SEIFERLE, 1981). Sua comunicação com o ruminoretículo se dá por um pequeno óstio denominado óstio retículo-omasal (DYCE; SACK; WENSING, 2002).

A parede da parte aglandular do estomago de ruminantes é constituída de três túnicas que são denominadas, a partir do lúmen do órgão em direção à cavidade abdominal, de mucosa, muscular e serosa. No omaso existe uma muscular da mucosa que delimita também uma quarta túnica, denominada submucosa (DELLMANN; BROWN, 1982).

O epitélio ruminal e omasal é do tipo estratificado pavimentoso queratinizado formado por quatro camadas de células distintas: basal, espinhosa, granulosa e córnea ou queratinizada (LAVKER; CHALUPA; DICKEY, 1969). Como acontece em qualquer epitélio desta natureza, a proliferação celular ocorre a partir da camada basal, onde as células entram em divisão mitótica, conforme a necessidade de suprimento celular do epitélio. Estas por sua vez sofrem diferenciação e migram para as demais camadas do epitélio até alcançar a camada córnea e descamar para dentro do lúmen ruminal (LAVKER; GEDEON-MATOLTSY, 1970).

2.2 Alterações morfológicas do ruminorretículo à variações nutricionais

A manipulação nutricional da morfologia e, conseqüentemente, da capacidade de absorção do ruminorretículo é possível e tem sido preconizada para o controle de acidose ruminal em vacas leiteiras (DIRKSEN; LIEBCH; MAYER, 1985). Brownlee (1956) demonstrou que o grau de desenvolvimento das papilas do rúmen foi provavelmente determinado pelo teor de energia da dieta ou pela velocidade com que a dieta era quebrada em frações absorvíveis. A infusão de ácidos graxos voláteis (AGV) por 12 semanas, na forma de solução de sais de sódio, estimulou o crescimento papilar em uma área limitada do rúmen de bezerros (FLATT; WARNER; LOOSLI, 1958). Bezerros que receberam butirato ou propionato de sódio intra-ruminal apresentaram extenso desenvolvimento papilar (SANDER et al., 1959). Tamate et al. (1962)

constataram evolução no desenvolvimento papilar entre o nascimento e as 12 semanas de idade, em bezerros holandeses alimentados com leite, feno e concentrado. Em contrapartida, animais alimentados apenas com leite tiveram diminuição no tamanho das papilas do rúmen no período. No mesmo experimento, observou-se também que a dose de AGV era importante para a estimulação do crescimento papilar.

Apesar das evidências que infusões de AGV estimulam o crescimento papilar, nenhuma comprovação histológica deste fato havia sido realizada. Em vista disto, Sakata e Tamate (1976), em experimento com carneiros adultos, observaram aumento no índice mitótico da camada basal das papilas do rúmen de carneiro que receberam infusão intra-ruminal de 500 mL de butirato de sódio a 10% comparado com animais que receberam infusão de 500 mL de solução salina. Tamate e Fell (1978) delinearão outro experimento com dois carneiros adultos com cânulas ruminais. Estes foram alimentados preliminarmente com feno *ad libitum*. A seguir receberam por 16 dias uma dieta de feno e concentrado de grão de cevada e farinha de peixe, fornecida também *ad libitum*. Logo após, a dieta foi mudada abruptamente para feno em quantidade restrita (0,5 kg por dia). Em intervalos frequentes, eram coletadas papilas ruminais através de biópsias. O índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen aumentou abruptamente já no primeiro dia após a mudança da dieta de feno para concentrado. Em contrapartida, caiu gradativamente ao longo dos dias após a mudança da dieta de concentrado para feno com ingestão restrita, atingindo no quinto dia, um nível mais baixo do que o observado no período em que os animais recebiam feno *ad libitum*. Um dia após a dieta de cevada para feno, as células da camada basal pareciam estar encolhidas e seus núcleos apresentavam contorno irregular, características que se acentuavam com o prolongamento do período de restrição alimentar. Durante o período de restrição de alimento, células isoladas morreram (apoptose celular) e encontraram-se fragmentações

por perda celular espontânea intensa, particularmente nas regiões das cunhas epiteliais. Células necróticas isoladas, fagocitose por células de Langehans e por células epiteliais basais apareceram um dia após a mudança da dieta de concentrado para feno em quantidade restrita e foram encontradas com maior freqüência nas últimas amostras de biópsia. Este experimento mostrou que a resposta celular a um menor nível alimentar é rápida no epitélio ruminal.

Goodlad (1981) também estabeleceu uma relação entre a proliferação celular do epitélio ruminal e o crescimento das papilas de carneiro sob três diferentes dietas, as quais foram formuladas para resultar em diferentes proporções de AGV no rúmen. Inicialmente os animais foram alimentados durante sete meses com uma dieta baseada em forragem. Esta dieta foi mudada retirando-se gradativamente a forragem e aumentando a quantidade de concentrado, atingindo no quarto dia após a mudança, um quilo de concentrado e zero de forragem. Após 62 dias, a dieta baseada em forragem foi reintroduzida. Observou-se um grande aumento no índice mitótico das células basais do epitélio do rúmen, que mudou de $0,58\% \pm 0,05\%$ na dieta de forragem para $1,20\% \pm 0,11\%$ no quarto dia do início da mudança da dieta para concentrado. Após este pico, houve um declínio para um novo nível de atividade mitótica levemente mais alto do que o observado na dieta de forragem. Houve hipertrofia das papilas quando os carneiros foram alimentados com dieta baseada em grãos, detectada tanto macroscopicamente quanto histologicamente. Foram detectados sinais de paraqueratose (diferenciação precoce de células para a camada córnea) e hiperqueratose (espessamento da camada córnea devido a pouca esfoliação), mas a mudança mais marcante observada foi o crescimento e ramificação das papilas. As mudanças do epitélio foram acompanhadas por extensão da lâmina própria. Estes achados indicam que o aumento no índice mitótico provavelmente está associado a aumento no tamanho e modificação papilar. Quando a dieta foi

mudada novamente para forragem houve uma queda acentuada no índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen ($0,35\% \pm 0,03$).

Resende Júnior et al. (2006b) ao avaliar a frequência de alimentação com concentrados, em um experimento com sete vacas não lactantes, observaram que a menor frequência de alimentação concentrada resultou em maior índice mitótico da camada basal do epitélio ruminal. No entanto, a maior divisão celular não se refletiu em aumento nas dimensões macroscópicas das papilas do rúmen. Não foi detectado efeito da frequência de alimentação concentrada sobre o tamanho papilar, potencialmente correlacionado com maior capacidade de absorção do epitélio ruminal (DIRKSEN; LIEBCH; MAYER, 1985; SUTTON; MCGLLIARD; JACOBSON, 1963). Apesar do índice mitótico do epitélio ruminal responder agudamente às mudanças no plano alimentar (GOODLAD, 1981; SAKATA; TAMATE, 1978), este pode não ser o único determinante do tamanho papilar em curto prazo. O maior fluxo sanguíneo, resultante de maior aporte nutricional e maior necessidade de absorção, pode resultar em crescimento papilar (TAMATE; KIKUCHI; SAKATA, 1974). Mudanças agudas na capacidade de absorção da parede do rúmen podem não estar relacionadas unicamente ao tamanho papilar (GÄBEL; MAREK; MARTENS, 1993).

Beharka et al. (1998) estudaram o efeito da forma física da dieta sobre o desenvolvimento morfológico do rúmen. Os autores relataram que, macroscopicamente, não houve diferenças marcantes na forma, distribuição e comprimento das papilas ruminais entre as dietas. Entretanto, o exame microscópico mostrou que papilas oriundas do saco cranial do rúmen apresentaram menos alterações de forma e comprimento como resposta à dieta do que aquelas oriundas de outras regiões do rúmen. Os autores especularam que este resultado ocorreu, provavelmente, porque na região do saco cranial as

partículas do alimento tendem a flutuar, promovendo um estímulo físico menor na mucosa ruminal.

Melo (2007) avaliou a morfologia da parede ruminal de nove vacas fistuladas submetidas a três condições experimentais. “Alta”, com vacas Holandesas produzindo 25,9 kg de leite e alimentadas com dieta completa rica em grãos. “Média” com vacas Girolando produzindo 12,3 kg e alimentadas com silagem de milho, pastagem tropical e concentrado comercial. “Secas”, com vacas Jersey não lactantes e alimentadas exclusivamente a pasto. As vacas Holandesas em melhor plano nutricional tiveram maiores áreas de superfície absorptiva e índice mitótico das células da camada basal do epitélio ruminal, e menores espessuras do epitélio e da camada queratinizada se comparadas com as vacas Girolando e Jersey. A maior superfície de absorção foi associada à menor espessura de epitélio, como resultado da redução da camada queratinizada. A maior ($P<0,01$) proliferação celular, mensurada pelo IM nas condições “Alta” (0,97 %) e “Média” (0,95%) em relação à condição “Seca” (0,72%), foi aparentemente acompanhada também de maior perda no número de células epiteliais. A maior superfície de absorção na condição “Alta” não foi acompanhada por diferença acentuada no IM relativamente à condição “Média”.

2.3 Estudo da morfofisiologia do omaso

Considerando que, em geral, a morfologia do rúmen, retículo e abomaso está bem definida, a do omaso ainda é um pouco obscura. Inicialmente foi colocado que a sua função primária era ajudar a reter e separar partículas, pois partículas grandes tendem a ficar presas entre as lamínas enquanto as pequenas partículas passam rapidamente (LANGER, 1988 citado por HACKMANN; SPAIN, 2010). Ehrlein (1980 citado por HACKMANN; SPAIN, 2010), relatou que partículas grandes podem ser ejetadas de volta para dentro do

retículo via óstio retículo-omasal. Havia hipótese de que o omaso também funcionava como uma bomba de sucção de líquidos e sólidos do ruminorretículo para o abomaso (STEVENS; SELLERS; SPURRELL, 1960).

O omaso é um potente compartimento absorvente. Ele absorve cerca de 12,5% de água, 25% sódio, 10% potássio ingeridos; 45 - 50% de AGV; 35% amônia, e 50% de dióxido de carbono produzidos no rúmen (ENGELHARDT; HAUFFE, 1975 citados por HACKMANN; SPAIN, 2010; RESENDE JÚNIOR et al., 2006a). Sete a nove por cento da digestão de fibra do TGI acontece no omaso (AHVENJARVI et al., 2000).

Costa et al. (2008) observaram maior peso do omaso em bezerros que receberam, durante 37 dias, infusão intra-ruminal de butirato (154g), propionato (118 g) e lactato (109 g) em relação aos bezerros do tratamento controle que receberam infusão apenas de salina (93g). O butirato foi mais eficiente em aumentar o peso do omaso, mas desencadeou maiores danos teciduais no epitélio. Isso demonstra indícios de que a morfologia do omaso pode ser determinada pela dieta ingerida.

Para mensurar a superfície de absorção do ruminorretículo e do omaso comparando-as com a magnitude de absorção, Daniel, Resende Júnior e Cruz (2006) avaliaram o estômago de oito bovinos removidos imediatamente após o abate. Os compartimentos do estômago foram separados, pesados e tiveram fragmentos coletados em diversas regiões anatômicas. Procedeu-se a mensuração da área total da superfície interna por meio de captura e análise de imagens digitalizadas. A superfície absorptiva do ruminorretículo ($7,7\text{m}^2$) foi maior do que a do omaso ($2,1\text{m}^2$). A relação superfície/digesta, entretanto, tendeu a ser maior no omaso ($0,22\text{m}^2/\text{Kg}$) do que no ruminorretículo ($0,12\text{m}^2/\text{Kg}$), representando uma área superficial 83,3% maior. A área de um fragmento do saco ventral do rúmen apresentou correlação positiva com a área

total da superfície do rúmen, indicando ser possível a estimativa da área total do órgão por meio de biópsia.

Daniel e Resende Júnior (2007) observaram, *in vitro*, maior taxa fracional de absorção no omaso ($9,1\% \cdot h^{-1} \cdot cm^2$) do que no rúmen ($0,4\% \cdot h^{-1} \cdot cm^2$) e uma taxa semelhante de metabolização de AGV na parede do rúmen e omaso, reforçando assim a importância desse compartimento na absorção de AGV

Daniel (2007) avaliou o índice mitótico do rúmen e do omaso de oito bovinos de peso e idade variados e de ambos os sexos provenientes de um abatedouro comercial. O autor observou que o índice mitótico da camada basal de células do omaso (0,52%) foi maior do que o do rúmen (0,28%). Existiu também correlação positiva entre o índice mitótico destes compartimentos. Isso pode indicar que os fatores estimuladores da proliferação da parede do omaso podem ser os mesmos do rúmen.

Resende Júnior et al. (2006a) comparando técnicas para a determinação do *clearance* ruminal de AGV em vacas Holandesas alimentadas com azevém e concentrado, constataram que o desaparecimento de AGV por passagem para o omaso correspondeu a aproximadamente 45% do *clearance* total. Tendo em vista o grande percentual de AGV que chega no omaso, acredita-se que esse órgão é tão importante como o rúmen na absorção desses ácidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais, instalações e tratamentos

O estudo foi realizado em quatro vacas de raças diversas, não lactantes, não gestantes e com cânulas implantadas cirurgicamente no saco dorsal do rúmen. Os animais foram abrigados e alimentados individualmente em *Tié Stall* com cama de areia. Durante todo experimento foram ofertados água e premix mineral *ad libitum*.

O experimento teve duração de 57 dias. Foram sete períodos experimentais subseqüentes, considerados como tratamentos para comparar o comportamento do rúmen e do omaso em diferentes dietas e diferentes tempos de ingestão. Os tratamentos foram: (1) 18 dias com 100% de forragem; (2) 4 dias com 50% forragem + 50% concentrado; (3) 18 dias de 50% forragem + 50% concentrado; (4) 72 horas de jejum; (5) 4 dias de realimentação com 50% de forragem + 50% de concentrado; (6) 12 dias de realimentação com 50% de forragem + 50% de concentrado; e (7) 18 dias de realimentação com 50% de forragem + 50% de concentrado. O delineamento foi em blocos casualizados em que cada vaca era considerado um bloco. Os tratamentos foram estabelecidos de acordo com experimentos anteriores com rúmen em que Goodlad (1981) observou maior índice mitótico com quatro dias após introdução de concentrado e Resende Júnior et al. (2006b) maior superfície absorptiva no dia 12 de introdução de concentrado na dieta. A alimentação foi fornecida como dieta completa uma vez ao dia, às 7:00 horas. A forragem utilizada foi silagem de milho e o concentrado foi adquirido comercialmente.

3.2 Determinação do consumo de matéria seca e análises bromatológicas

O consumo de alimentos foi determinado diariamente. Para tal, a quantidade de ração ofertada e as sobras foram pesadas e o consumo determinado por diferença. Diariamente, subamostras do oferecido e das sobras de cada vaca foram coletadas para compor uma amostra a cada seis dias de experimento. As amostras compostas foram desidratadas em estufa ventilada à 60°C por 72 horas e moídas em moinho com peneira de 1,0 mm.

Uma amostra de 3,0 g do material pré-seco foi levada à estufa de 105°C para determinação da matéria seca (SILVA; QUEROZ, 2002). As quantidades de matéria seca oferecida e rejeitada diariamente foram determinadas multiplicando-se as quantidades de matéria natural pelo teor de matéria seca das respectivas frações. O consumo de matéria seca foi obtido por diferença, em cada fase sendo estimado pela média de consumo nos últimos três dias da fase.

O teor de proteína bruta (PB) foi determinado por aparelho de digestão a vapor Microkjeldhall (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 1980), o conteúdo de cinzas foi determinado por incineração a 550 °C por 8 horas em mufla, a fibra em detergente neutro (FDN) foi determinada pelo método de Soest (1994) e o extrato etéreo (EE) foi determinado segundo o AOAC (1980).

3.3 Amostras de fluido ruminal

Seis horas após a alimentação no último dia de cada fase, amostras de fluido ruminal foram coletadas do saco ventral, utilizando-se um tubo de PVC rígido de ¾ com múltiplos orifícios no terço distal da parede, acoplado à um dispositivo de sucção. Aliquotas de 10 ml foram preservadas com 200 µl de ácido sulfúrico a 50% e imediatamente congeladas a -20°C para posterior

análises de AGV por meio de cromatografia gás-líquida (CP-3800 Gas Chromatograph Varian, Varian Chromatography Systems, Califórnia, EUA).

3.4 Avaliações morfológicas

No último dia de cada fase, aproximadamente dez horas após a alimentação, o ruminorretículo foi evacuado manualmente e foram realizadas biópsias de um fragmento da parede do saco ventral do rúmen (recesso do rúmen) e de uma lâmina do omaso. As biópsias de rúmen foram efetuadas com auxílio de tesoura cirúrgica após exteriorização da parede do órgão através da cânula. A biópsia da lâmina do omaso foi realizada com auxílio de um equipamento semelhante a um alicate, confeccionado para este fim (Figura 1). As lâminas do omaso foram alcançadas pelo óstio retículo-omasal após a introdução da mão do experimentador, portando o alicate, através da cânula ruminal.

O fragmento do rúmen foi subdividido em duas frações. Uma fração foi imediatamente preservada em solução tampão fosfato (PBS = 0,79 g de NaCl; 0,233g de Na₂HPO₄; 0,0524 g de NaH₂PO₄; H₂O qsp 100 ml) ajustado a 0,1 M e pH 7,4, sendo resfriado para posterior análise macroscópica. O outro fragmento de rúmen e o fragmento de omaso foram fixados em Líquido de Bouin por 22 horas. Após a fixação os tecidos foram preservados em álcool 70°GL até o processamento histológico.



Figura 1 Instrumento utilizado para realização das biópsias de lâminas do omaso

3.4.1 Macroscopia do rúmen

As variáveis morfológicas macroscópicas avaliadas foram: número de papilas por cm^2 de parede, área média das papilas, comprimento e largura média das papilas, área estimada total do rúmen.

As mensurações morfológicas dos fragmentos previamente preservados em PBS foram realizadas efetuando-se a contagem do número de papilas ruminais presentes em cada fragmento. Doze papilas foram seccionadas na base com auxílio de tesoura cirúrgica, colocadas em uma placa de Petri, juntamente com o fragmento sem papilas e suas imagens foram digitalizadas por um scanner (HP Deskjet F380 All-in-One). Ao lado da placa de Petri foi colocado uma escala de 1 cm para ser digitalizada juntamente com as papilas e o fragmento, permitindo posterior calibração do software de análise de imagens. As áreas das imagens digitalizadas foram estimadas através de um programa de análise de imagens UTHSCSA Image Tool (software livre), conforme Resende Júnior et al. (2006b), modificado por Daniel, Resende Júnior e Cruz (2006).

A estimativa da área do fragmento (AF) foi feita pela seguinte equação:

$AF = (\text{área de parede} - \text{área da base das papilas}) + (\text{número de papilas} * \text{área média das papilas}).$

A área da base de cada papila foi assumida como tendo um valor médio $0,002 \text{ cm}^2$ (DANIEL; RESENDE JÚNIOR; CRUZ, 2006). A área total do rúmen (ATR) foi calculada pelo modelo proposto por estes mesmos autores, pela seguinte equação:

$ATR: \text{área do rúmen} = 26604,7 * (\text{área do fragmento} / \text{área de parede do fragmento}) + 29718,0.$

Dividindo-se o número total de papilas do fragmento pela área de parede do fragmento foi obtido o número de papilas por cm^2 . O comprimento e a largura média de cada papila foram determinados pelo software UTHSCSA Image Tool.

3.4.2 Microscopia

As mensurações microscópicas avaliadas foram: comprimento, largura e área das papilas ruminais; espessura total do epitélio, espessura da camada de queratina e espessura da camada não queratinizadas do epitélios ruminal e omasal; e índice mitótico (IM) da camada basal.

Para a determinação do IM das células da camada basal dos epitélios do rúmen e do omaso foi utilizada a coloração de Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram imersas em xilol por 20 minutos para serem desparafinizadas e em seguida foram imersas em uma série decrescente de álcool (absoluto, 90° , 80° , 70° GL) para reidratação, deixando dois minutos em cada solução. Foram então imersas em um frasco contendo hematoxilina por dois minutos e, em seguida, colocados em banho de água de água corrente por 25 minutos. Então, as lâminas foram imersas em eosina por 30 segundos. Outra série de álcool em concentrações crescentes foi utilizada para desidratar o material, deixando as

lâminas dois minutos em cada álcool. As lâminas foram banhadas duas vezes em xilol, por dois minutos, e montadas utilizando-se uma camada de bálsamo do Canadá, superpondo-se uma lamínula de vidro em cada lâmina.

Com auxílio de microscópio óptico em aumento de 400 vezes, foram contados os núcleos de todas as células da camada basal do epitélio de revestimento em todas as áreas que este esteja bem delimitado e todas as células com núcleo apresentando figuras mitóticas. Esse procedimento foi executado por três avaliadores e o valor médio entre os avaliadores calculado. O IM foi calculado dividindo-se o número de células apresentando figuras mitóticas pelo número total de núcleos contados.

As espessuras do epitélio total e da camada de queratina foram determinadas em cortes corados com Tricrômico de Masson. Imagens de quatro campos por lâmina foram capturadas por câmara fotográfica acoplada em microscópio óptico com aumento de 400x. Uma imagem de lâmina com escala foi capturada para posterior calibração do software de processamento de imagem. Em seguida, as imagens foram processadas no software UTHSCSA Image Tool (o mesmo utilizado nas avaliações macroscópicas). Foi mencionada a área ocupada por queratina, epitélio total e pela diferença dos dois, área de epitélio sem queratina e o comprimento de epitélio de cada campo fotografado. A relação entre área de queratina ou área de epitélio total ou área de epitélio sem queratina pelo comprimento, obteve-se a largura média de cada item avaliado e assim feito uma média dos quatro campos fotografados. A espessura total do epitélio e da camada de queratina, a espessura das camadas não queratinizadas foi calculada por diferença.

3.5 Análises estatísticas

A espessura total, a espessura da camada de queratina e a espessura das camadas não queratinizadas dos epitélios ruminal e omasal; o índice mitótico da camada basal dos epitélios ruminal e omasal foram analisados como medidas repetidas pelo procedimento MIXED do pacote de análises estatísticas SAS, de acordo com o seguinte modelo:

$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \gamma_k + \beta\gamma_{jk} + \varepsilon_{ijk}$; onde μ : média geral; α_i : efeito aleatório de vaca ($i = 1$ à 4); β_j : efeito fixo de compartimento ($j =$ rúmen ou omaso); $\alpha\beta_{ij}$: efeito da interação entre vaca e compartimento (termo de erro usado para testar o efeito de compartimento); γ_k : efeito fixo de tratamento ($k = 1$ à 7); $\beta\gamma_{jk}$: efeito da interação ente compartimento e tratamento; ε_{ijk} : resíduo (termo de erro usado para testar o efeito de tratamento e a interação entre compartimento e tratamento). As estruturas de covariâncias testadas foram: simetria composta, auto regressiva de primeira ordem e não estruturada. Aquela com maior o valor para o critério de informação de Akaike foi utilizada.

O consumo de matéria seca; a concentração ruminal total e individual de AGV; a área, o comprimento e a largura das papilas ruminais determinadas macroscopicamente; o número de papilas/cm² da parede ruminal; e a área do rúmen foram analisados pelo procedimento MIXED do pacote de análises estatísticas SAS, de acordo com o seguinte modelo:

$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$; onde μ : média geral; α_i : efeito aleatório de vaca ($i = 1$ à 4); β_j : efeito fixo de tratamento ($j = 1$ à 7); ε_{ij} : resíduo, assumido independente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 . As médias dessas mesmas variáveis foram comparadas pelo teste de Tukey.

O índice mitótico do rúmen e omaso foram comparados por regressão linear pelo procedimento REG e a hipótese da inclinação da reta ser igual a 1 foi testada pelo informe TEST, ambos do programa estatístico do SAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As dietas experimentais (Tabela 1) apresentavam teores de carboidratos não fibrosos (CNF) compatíveis com simulações de dietas pré-parto, baseada em forragem e com dietas lactacionais de alta energia, baseada em concentrado e forragem. Teoricamente a transição da dieta de forragem para a dieta de forragem com concentrado reflete a mudança que ocorre quando a dieta de transição é introduzida no pré-parto de vacas leiteiras, visando adaptação do epitélio ruminal à maiores taxas fracionais de produção de AGV. O período de jejum simula eventual queda de ingestão de matéria seca (IMS) que ocorre no peri-parto e o período de realimentação simula a introdução de dieta lactacional de alta energia no pós-parto. Entretanto, a baixa IMS (Tabela 2; Figura 2) apresentada pelos animais principalmente no período de realimentação não é compatível com animais em início de lactação, uma vez que os animais utilizados no experimento apresentavam baixa demanda metabólica por estarem não gestantes e não lactantes. É sabido que o epitélio ruminal responde positivamente à introdução de dietas com maiores teores de energia (DIRKSEN et al., 1984; MELO, 2007; TEÓFILO et al., 2009), mas a resposta omasal à esta situação não é conhecida.

A ingestão de matéria seca (IMS) e de NDT foram maiores quando passados 18 dias de introdução da dieta mais energética ($P<0,05$), resultado já esperado por haver maior concentração de nutrientes por unidade de matéria seca ingerida na dieta com concentrados. O período de jejum parece ter sido deletério à retomada da IMS, pois aos 18 dias de realimentação a IMS ainda não havia atingido o mesmo nível dos 18 dias de introdução da dieta energética antes do jejum, refletindo o que acontece no pós-parto de vacas leiteiras que tiveram queda de IMS no peri-parto. Vazquez-Añon et al. (1994) observaram, em experimento com nove vacas secas gestantes, a diminuição na IMS dois dias

Tabela 1 Composição das dietas utilizadas nos períodos experimentais para quatro vacas não lactantes e não gestantes com cânula ruminal para estudo do rúmen e omaso – Brasil – 2010

| Composição | Dieta | |
|----------------------------|----------|----------------------|
| | Forragem | Forragem+concentrado |
| MS ¹ (%) | 39,3 | 47,1 |
| FDN ² (% da MS) | 47,0 | 36,8 |
| MM ³ (% da MS) | 3,8 | 4,0 |
| EE ⁴ (% da MS) | 3,9 | 2,7 |
| PB ⁵ (% da MS) | 9,2 | 11,1 |
| CNF ⁶ (% da MS) | 36,1 | 45,4 |
| NDT ⁷ (% da MS) | 48,3 | 59,2 |

¹ MS – matéria seca; ²FDN - Fibra em detergente neutro; ³MM - matéria mineral;

⁴EE – extrato etéreo; ⁵PB - proteína bruta; ⁶CNF – Carboidratos não fibrosos estimados pela equação:

$100 - (\%PB + \%FDN + \%EE + \%MM)$ ⁷NDT- nutrientes digestíveis totais, estimado de acordo com National Research Council - NRC (2001)

Tabela 2 Ingestão de matéria seca, concentração de ácidos graxos voláteis e morfologia ruminal de vacas não gestantes e não lactantes – Brasil - 2010

| | Período | | | | | | | Erro Padrão | P |
|---|---------|---------|--------|--------|---------|--------|---------|-------------|---------|
| | 18 F | 4C | 18C | JEJUM | 4R | 12R | 18R | | |
| IMS (Kg.dia ⁻¹) | 6,0b | 6,8ab | 8,4a | 0,0c | 5,1b | 6,6b | 7,1ab | 0,7 | < 0,001 |
| NDT (Kg.dia ⁻¹) | 2,78b | 3,48ab | 4,39a | 0,0c | 2,92ab | 3,70ab | 3,98a | 0,4 | < 0,001 |
| Concentração de AGV (mM) | 106,36 | 148,45 | 115,58 | 7,0 | 77,53 | 64,69 | 68,38 | 9,6 | <0,001 |
| Acetato (mM) | 76,80ab | 83,84a | 78,13a | 5,5e | 46,54cd | 44,17d | 48,71bc | 7,9 | <0,001 |
| Propionato (mM) | 18,6ab | 23,9a | 23,3a | 1,0c | 23,5a | 14,1b | 12,8b | 2,5 | <0,001 |
| Butirato (mM) | 12,31 | 40,74 | 14,20 | 0,53 | 7,48 | 40,74 | 6,83 | 10,1 | 0,180 |
| Relação acetato propionato | 4,28b | 3,50b | 3,37b | 5,70a | 2,01c | 3,40b | 3,84b | 0,4 | <0,001 |
| Área de rúmen (m ²) | 5,10 | 6,63 | 5,08 | 5,95 | 5,55 | 6,05 | 6,00 | 0,7 | 0,607 |
| Numero de papilas/cm ² | 48,20 | 74,90 | 53,05 | 50,58 | 54,93 | 62,05 | 60,60 | 16,0 | 0,888 |
| Área de papilas (cm ²) | 0,15 | 0,19 | 0,15 | 0,22 | 0,16 | 0,18 | 0,18 | 0,02 | 0,215 |
| Comprimento de papilas (cm ²) | 0,56 | 0,66 | 0,48 | 0,66 | 0,49 | 0,55 | 0,54 | 0,07 | 0,122 |
| Área/comprimento de papila (cm) | 0,27d | 0,51bcd | 1,40a | 0,72bc | 0,84b | 0,33d | 0,33cd | 0,14 | < 0,001 |

18 dias de silagem de milho (18F); 4º 18º dia de alimentação com 50% silagem de milho e 50 % concentrado com base na matéria seca (4C e 18C respectivamente), 72 horas de jejum e 4º, 12º e 18º dias de realimentação com 50% de silagem e 50% de concentrado (4R, 12R e 18R respectivamente).

^{a, b, c, d, e} Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ($\alpha=0,05\%$)

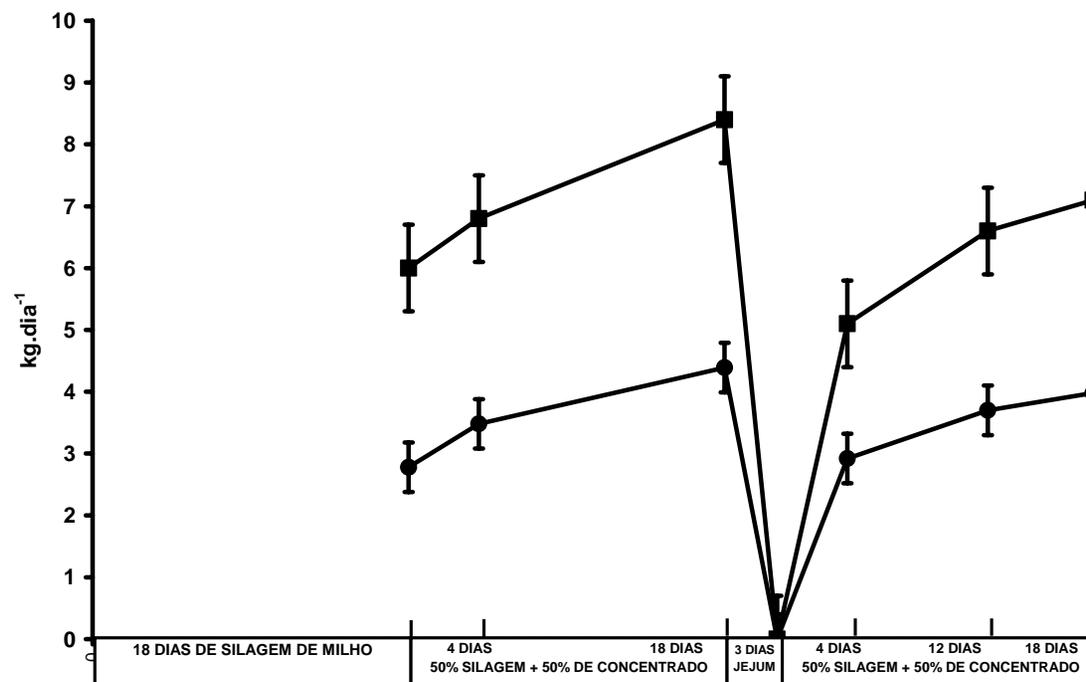


Figura 2 Média diária de ingestão de MS (■) e de NDT (●) ao longo do período experimental de vacas não gestantes e não lactantes alimentadas com 18 dias de silagem de milho; 4 e 18 dias de alimentação com 50% silagem de milho e 50% concentrado com base na matéria seca; 72 horas de jejum; e 4, 12 e 18 dias de realimentação com 50% de silagem e 50% de concentrado. ($P < 0,001$ para efeito de período de experimental)

antes do parto atingindo no dia do parto uma redução de 60% da IMS em relação a matéria seca ingerida três dias antes. A ingestão de IMS no pós-parto aumenta gradativamente atingindo um pico entre dez e 14 semanas de lactação (NRC, 1989).

A concentração de AGV foi maior no quarto dia de alimentação concentrada, provavelmente pela mudança da dieta, havendo maior aporte de carboidratos de alta fermentabilidade e por não ter um rúmen adaptado com superfície absorptiva compatível com a nova quantidade de AGV produzida (Figura 3). Passados 18 dias da introdução da dieta energética há de se esperar que o rúmen tenha se adaptado (MELO, 2007; RESENDE JÚNIOR et al., 2006b), portanto, apesar da dieta ser a mesma, a IMS e ingestão de NDT serem semelhantes, houve menor concentração de AGV no fluido ruminal, refletindo provavelmente uma maior taxa fracional de absorção. A ausência de substrato fermentável durante o jejum explica a queda na concentração de AGV no fluido. Com a realimentação houve menor concentração de AGV no fluido do que no período de introdução da dieta, apesar da ingestão de MS e de NDT terem sido semelhantes. Pode ser que 72 horas de jejum não tenham sido suficientes para que o rúmen perdesse sua capacidade absorptiva, portanto no período de realimentação ainda haveria uma superfície absorptiva compatível com a produção de AGV. Isso reforçaria a hipótese de que, apesar de haver queda na IMS no peri-parto, a dieta de transição introduzida antes do parto é eficiente para a adaptação do epitélio ruminal, propiciando melhor capacidade absorptiva no pós-parto. Teófilo et al. (2009), trabalhando com vacas leiteiras em período de transição, encontrou, no pós-parto, maior superfície absorptiva no rúmen de vacas que receberam dieta com alto teor de CNF, nas três semanas anteriores ao parto. Anderson, Sehasted e Invartsen (1999) e Reynolds et al. (2004) que desaconselham a dieta de transição por entender que o jejum do peri-parto

causaria uma volta do epitélio ruminal ao estágio anterior ao encontrado antes da dieta de transição parecem estar equivocados.

A concentração de propionato foi mais alta quando a dieta foi mudada de forragem para concentrado. Dietas baseadas em forragem apresentam altos teores de FDN (Tabela 1). Como são carboidratos lentamente degradáveis o pH do ambiente ruminal fica mais alto, favorecendo as bactérias celulolíticas cuja rota metabólica é mais voltada para a produção de acetato. Com a introdução da dieta com carboidratos rapidamente fermentáveis a própria elevação na concentração ruminal de AGV propicia diminuição do pH ruminal, o que favorece a proliferação de bactérias amilolíticas, cuja rota metabólica é mais voltada para propionato (GREGORIO et al., 1982). Essa dinâmica reflete na mudança da relação acetato/propionato (Tabela 2), que é diretamente proporcional ao pH ruminal e é um indicador do padrão de fermentação e do equilíbrio do ambiente ruminal. Apesar de não ter sido mensurado o pH ruminal, é conhecido que o maior determinante do pH é a concentração de AGV (PEREIRA; ARMENTANO, 2000). Portanto, o comportamento da concentração de AGV nesse experimento pode ser considerada inversamente proporcional ao comportamento do pH ruminal e da relação acetato:propionato.

Não foi detectada diferença entre os períodos experimentais na área total estimada do rúmen. A estimativa da área total leva em consideração os valores da área (Figura 4) e do número de papilas nos fragmentos obtidos por biopsia, onde também não foram detectadas diferenças estatísticas entre os períodos experimentais. Os valores de mensurações macroscópicas da extensão da superfície absorptivas não estão condizentes com a estimativa microscópica do

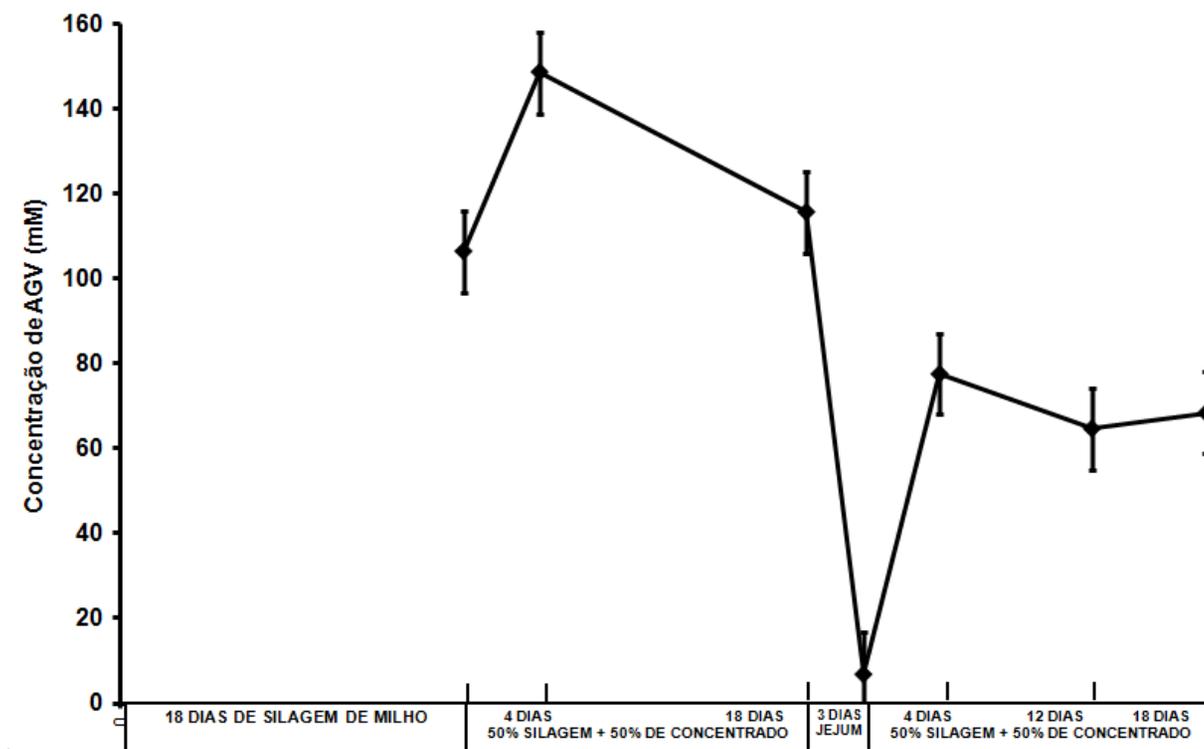


Figura 3 Concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) total (♦), no rúmen de vacas não gestantes e não lactantes, alimentadas com 18 dias de silagem de milho; 4 e 18 dias de alimentação com 50% silagem de milho e 50 % concentrado com base na matéria seca; 72 horas de jejum; e 4, 12 e 18 dias de realimentação com 50% de silagem e 50% de concentrado. ($P < 0,001$ para efeito de período experimental)

índice mitótico (Figura 5), que diferiu entre os períodos e refletiu a lógica de proliferação do epitélio em função do estímulo direto e indireto (SAKATA; TAMATE, 1976) de AGV sobre o desenvolvimento do epitélio. Resende Júnior et al. (2006b) também detectaram diferença no índice mitótico de papilas ruminais de vacas submetidas à duas frequências de alimentação concentrada. Entretanto, não detectaram diferença na área e comprimento das papilas. A única variável que os autores relataram diferença foi a relação área/comprimento, a qual reflete a largura das papilas. Semelhantemente, no presente experimento foi encontrada diferença entre os períodos experimentais na relação área/comprimento das papilas do rúmen. Como relatado por Resende Júnior et al. (2006b), falhas na técnica de mensuração macroscópica podem ter levado à não detecção de diferenças que refletissem fielmente o comportamento da extensão da superfície absorptiva do rúmen. Outros autores tem tido sucesso em mensurar eficientemente a extensão da superfície absorptiva pela técnica usada no presente experimento (MELO, 2007; TEÓFILO et al., 2009).

A média da largura das papilas do rúmen das vacas, medidas pela relação área/comprimento, aumentou à medida que se elevou o nível de energia da dieta. A largura média das papilas foi maior aos 18 dias de alimentação de forragem com concentrado, mostrando que houve estímulo para aumento da área de absorção dessas papilas, semelhantes ao relatado por Resende Júnior et al. (2006b) que encontraram maior largura de papilas no dia 12 após o aumento nos níveis de energia da dieta. Após o jejum, as papilas apresentaram diminuição em sua largura chegando a valores menores, mas não tão baixos como os encontrados quando os animais estavam sendo alimentados apenas com forragem. Na realimentação, houve recuperação da largura das papilas, mas diferentemente do ocorrido com o índice mitótico, o aumento não foi contínuo como era de se esperar, podendo refletir imprecisões nas mensurações conforme discutido anteriormente.

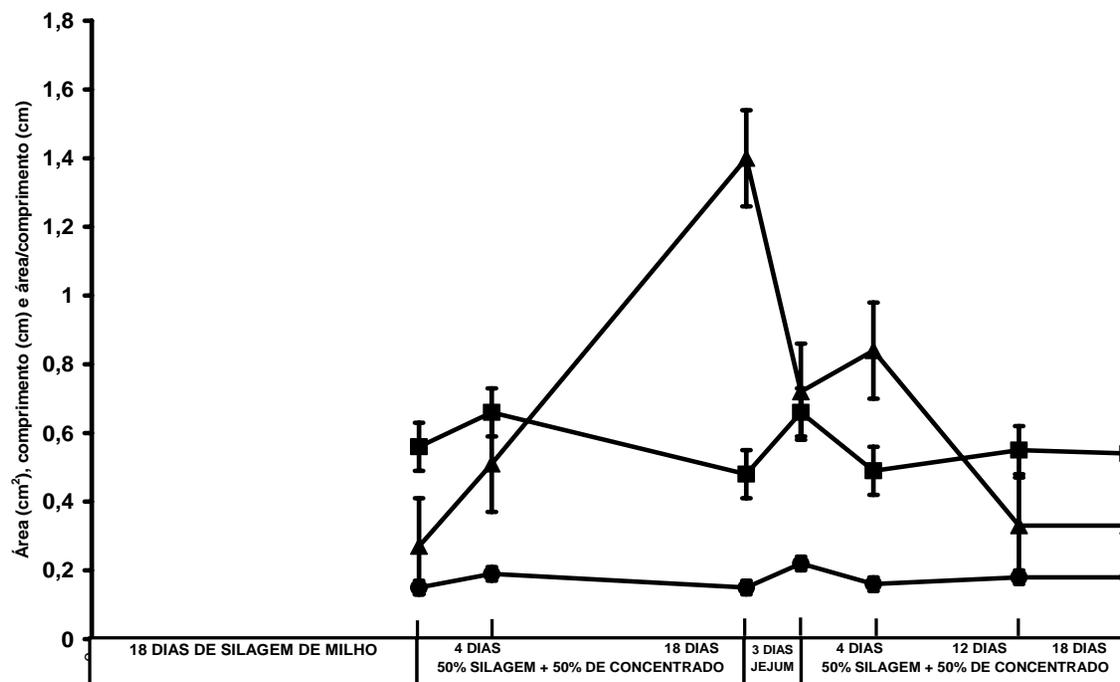


Figura 4 Área (●), comprimento (■) e área/comprimento (▲) das papilas do rúmen de vacas não gestantes e não lactantes, alimentadas com 18 dias de silagem de milho; 4 e 18 dias de alimentação com 50% silagem de milho e 50 % concentrado com base na matéria seca; 72 horas de jejum ; e 4, 12 e 18 dias de realimentação com 50% de silagem e 50% de concentrado. ($P < 0.001$ para efeito de período experimental para área/comprimento, $P = 0,12$ para comprimento e $P = 0,22$ para área)

A espessura da camada queratinizada do epitélio do rúmen foi maior do que a do epitélio do omaso (Tabela 3). Entretanto, não houve diferença na espessura de epitélio total e na espessura das camadas não queratinizadas, entre os dois compartimentos. É de se esperar que o epitélio do omaso apresente menor espessura de camada queratinizada uma vez que a relação superfície digesta nesse compartimento é muito superior do que a do rúmen (DANIEL; RESENDE JÚNIOR; CRUZ, 2006), possibilitando então maior abrasividade da digesta sobre a mucosa das lâminas do omaso e conseqüentemente maior descamação da queratina e menor espessura da camada de queratina. A conhecida desidratação do conteúdo do omaso em relação ao conteúdo ruminal (BECKER; MARSHALL; DIXARNOLD, 1963) também pode favorecer essa abrasividade, bem o estreito espaço dos recessos interlaminares e a movimentação das lâminas do omaso. A semelhança entre as camadas não queratinizadas do epitélio podem indicar que a resposta de proliferação celular pode ser desencadeada por estímulos comuns aos dois compartimentos.

O índice mitótico da camada basal do epitélio do rúmen foi maior que o da camada basal do epitélio do omaso (Tabela 3). Daniel (2007), estudando o estômago de animais de abatedouro encontrou maior média de IM para o omaso em comparação com o rúmen. Entretanto, esses autores nesse estudo não conheciam e não tinham controle da dieta e do período que cada animal consumia. Os animais poderiam estar ingerindo dietas com diferentes níveis de energia durante tempos diferentes. Isso poderia levar à inconsistências de valores uma vez que a média é obtida de animais com padrões alimentares diferentes.

O índice mitótico do omaso teve correlação positiva com o do rúmen (Figura 5). Isso fornece mais uma evidência de que os fatores estimuladores de proliferação celular do omaso são semelhantes aos do rúmen. Esse

comportamento também foi relatado de animais de abatedouro (DANIEL; RESENDE JÚNIOR, 2007).

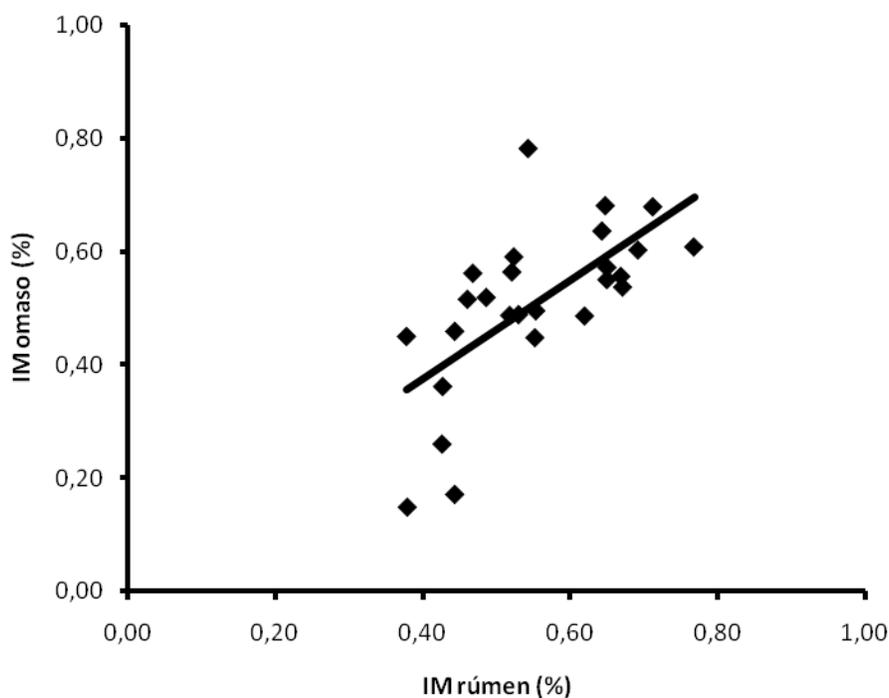


Figura 5 Correlação entre índice mitótico do rúmen e do omaso de vacas mestiças não gestantes e não lactantes. $IM\ do\ omaso = 0,8705X + 0,0281IM\ rúmen$; $r^2 = 0,66$; $P < 0,01$

O comportamento do índice mitótico, de ambos os compartimentos, ao longo do período experimental refletiu o esperado em relação ao aporte de energia da dieta (Figura 6). O maior índice mitótico ocorreu com quatro dias de introdução da dieta com maior nível de energia, tanto no rúmen como no omaso, antes e depois do jejum. Goodlad (1981) observou aumento nas células da

camada basal do epitélio do rúmen, que passou de 0,58% em dieta com apenas forragem para 1,20% no quarto dia de mudança de dieta de forragem para concentrado. Após esse pico no índice mitótico com quatro dias, observou-se uma diminuição no IM no dia 18 de alimentação de forragem mais concentrado acordando com Goodlad (1981) que deixou os animais na dieta de concentrado por mais 62 dias e observou que o IM retornou ao padrão semelhante ao encontrado quando os animais estavam sendo alimentados apenas com forragem.

A interação significativa entre compartimento e dieta pode indicar que a resposta ao estímulo proliferativo é diferente entre os dois compartimentos. Apesar de seguirem na mesma direção, parece que o omaso responde mais agudamente ao estímulo positivo e negativo de proliferação celular. Sendo assim, a resposta proliferativa é mais rápida no omaso quando se introduz a dieta de alta energia, mas também a queda na divisão celular é mais aguda quando estimulada pelo jejum. Não foram encontrados outros dados na literatura comparando a resposta omasal com a resposta ruminal ao estímulo proliferativo da energia da dieta e ao estímulo involutivo do jejum.

Tabela 3 Índice mitótico, espessura de queratina, do epitélio total e do epitélio sem queratina do rúmen e omaso de vacas mestiças não gestantes e não lactantes – Brasil – 2010

| | Órgão | | EPM ¹ | P |
|-----------------------------|--------|--------|------------------|--------|
| | Rúmen | Omaso | | |
| Índice mitótico (%) | 0,55 | 0,51 | 0,01 | 0,02 |
| Queratina (µm) | 76,43 | 56,23 | 4,33 | < 0,01 |
| Epitélio Total (µm) | 352,94 | 342,71 | 17,43 | 0,674 |
| Epitélio sem queratina (µm) | 276,51 | 286,48 | 16,81 | 0,671 |

¹Erro padrão da média

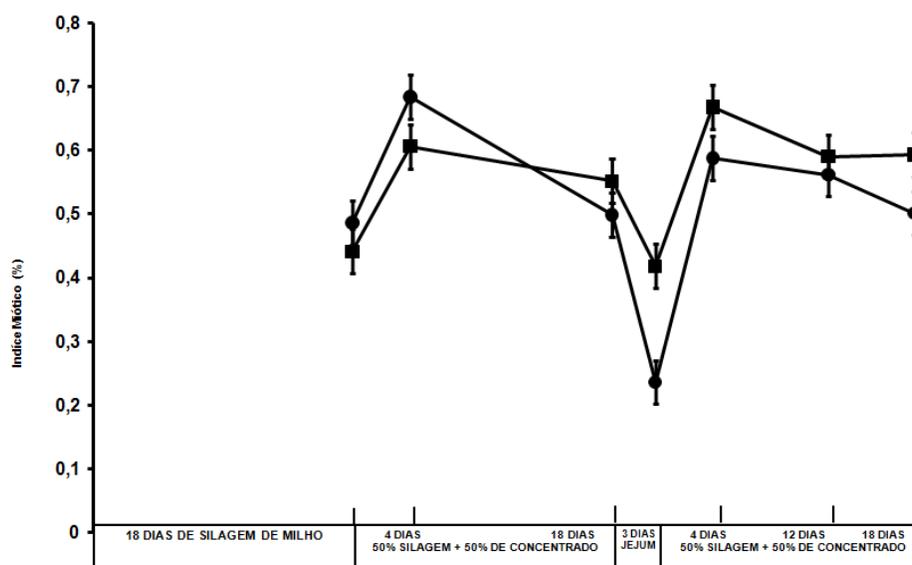


Figura 6 Índice mitótico do omaso (●) e do rúmen (■) de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com 18 dias de silagem de milho (18F); 4, 18 dias de alimentação com 50% silagem de milho e 50 % concentrado com base na matéria seca (4C e 18C respectivamente), 72 horas de jejum e 4, 12 e 18 dias de realimentação com 50% de silagem e 50% de concentrado (4R, 12R e 18R respectivamente). ($P = 0,01$ para interação entre órgãos e períodos)

5 CONCLUSÃO

A semelhança nas espessuras das camadas não queratinizadas e a correlação positiva entre o índice mitótico da camada basal do epitélio do rúmen e do omaso, indicam que os estímulos de divisão celular desencadeados pelo teor de energia da dieta atuam simultaneamente nos dois compartimentos.

O omaso, entretanto, parece responder mais rapidamente ao estímulo proliferativo da energia da dieta e ao estímulo involutivo do jejum, quando comparado com o rúmen.

REFERÊNCIAS

- AHVENJARVI, S. et al. Determination of reticulo-rumen and whole-stomach digestion in lactating cows by omasal canal or duodenal sampling. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 83, n. 1, p. 67-77, Mar. 2000.
- ANDERSON, J. B.; SEHASTED, J.; INVARTSEN, K. L. Effect of dry cow feeding strategy on rumen pH, concentration of volatile fatty acids and rumen epithelium development. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 49, n. 1, p. 149-155, Aug. 1999.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. Washington, 1980. 1015 p.
- BECKER, R. B.; MARSHALL, S. P.; DIXARNOLD, P. T. Anatomy, development and functions of the bovine omasum. **Journal of Dairy Science**, Champing, v. 46, n. 8, p. 835-839, Aug. 1963.
- BEHARKA, A. A. et al. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, Savory, v. 81, n. 7, p. 1946-1955, July 1998.
- BROWNLEE, A. The development of rumen papillae in cattle fed on different diets. **British Veterinary Journal**, London, v. 112, n. 4, p. 369-375, July/Aug. 1956.
- COSTA, S. F. et al. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerros: aspectos histológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 1-9, fev. 2008.
- DANIEL, J. L. P. **Avaliação morfológica da absorção e metabolização de ácidos graxos voláteis pelo proventrículo de bovinos**. 2007. 147 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C. Morphophysiologic evaluation of absorption and metabolism of volatile fatty acids by bovine forestomach. **Journal of Dairy Science**, Davis, v. 90, n. 1, p. 342-343, 2007. Supplement.

DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C.; CRUZ, F. J. Participação do rumenoretículo e omaso na superfície absorptiva total do proventrículo de bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary 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.

DIRKSEN, G. U. et al. Morphologie der pansenschleimhaut und fettsaureresorption beim rind: bedeutende faktoren fur gesundheit und leistung. **Zentralblatt fur Veterinar Medizin**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 414-430, July 1984.

DIRKSEN, G. U.; LIEBCH, H. G.; MAYER, E. Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. **The Bovine Practitioner**, Montreal, v. 20, n. 1, p. 116-120, Nov. 1985.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Textbook of veterinary anatomy**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2002. 682 p.

FLATT, W. P.; WARNER, R. G.; LOOSLI, J. K. Influence of purified materials on the development of the ruminant stomach. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 41, n. 1, p. 1593-1595, Nov. 1958.

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

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

GREGORIO, R. M. et al. Carbohydrate fermentation in the large intestine of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 54, n. 4, p. 855-862, Apr. 1982.

HACKMANN, T. J.; SPAIN, J. N. Invited review: ruminat ecology and evolution: perspectives useful to ruminat livestock research and production. **Journal of Dairy Science**, Missouri, v. 93, n. 1, p. 1320-1334, June 2010.

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

LAVKER, R.; GEDEON-MATOLTSY, A. Formation of horny cells: the fate of cell organelles and differentiation products in ruminal epithelium. **Journal Cell Biology**, New York, v. 44, n. 1, p. 501-512, Mar. 1970.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrientes requerimentos of dairy cattle**. Washington: National Academy of Science, 1989. 158 p.

_____. _____. Washington: National Academy of Science, 2001. 408 p.

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

PEREIRA, M. N.; ARMENTANO, 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.

RESENDE JÚNIOR, J. C. et al. Comparacion of techniques to determine the clearance of ruminalvolatile fatty acids. **Journal Dairy Science**, Savoy, v. 89, n. 1, p. 3096-3100, Aug. 2006a.

_____. 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. 1, p. 526-536, July/Aug. 2006b.

REYNOLDS, C. K. et al. Visceral tissue mass and rumen volume in dairy cows during the transition from lete gestation to early lactation. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 1, p. 961-971, Apr. 2004.

SAKATA, T. et al. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 44, n. 1, p. 325-331, June 1980.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Effect of intraruminal injection of n-sodium butyrate on the mitotic indices in sheep ruminal epithelium. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Sendai-Shi, v. 27, n. 1, p. 133-135, Dec. 1976.

_____. Presence of circadian rhythm in the mitotic index of the ruminal epithelium in sheep. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 1-3, Jan. 1978.

SANDER, E. G. et al. The stimulatory effect of sodium butyrate and propionate on the development of rumen mucosa in the young calf. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, n. 1, p. 1600-1605, Sept. 1959.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológica**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. 172 p.

SOEST, P. J. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University, 1994. 488 p.

STEVENS, C. E.; SELLERS, A. F.; SPURRELL, F. A. Function of the bovine omasum in ingesta transfer. **American Journal of Physiology**, Washington, v. 198, n. 1, p. 449-455, Jan. 1960.

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

TAMATE, H. et al. The effect of various diets on the anatomical development of the stomach in the calf. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 45, n. 1, p. 408-420, Mar. 1962.

TAMATE, H.; FELL, B. F. Cell deletion as a factor in the regulation of rumen epithelial populations. **Veterinary Science Communications**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 359-364, Dec. 1978.

TAMATE, H.; KIKUCHI, T.; SAKATA, T. Ultrastructural changes in the ruminal epithelium after fasting and subsequent refeeding in the sheep. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, Sendai-Shi, v. 25, n. 1, p. 142-155, Dec. 1974.

TEÓFILO, T. S. et al. Efeitos da dieta de transição com diferentes padrões energéticos na superfície absorviva ruminal de vacas leiteiras periparturientes. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 1, p. 842-846, out. 2009. Suplemento.

VAZQUEZ-AÑON, M. et al. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 1, p. 1521-1528, June 1994.

VOELKER, J. A.; ALLEN, M. S. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: effects on ruminal fermentation, pH, and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 5, n. 1, p. 589-597, Nov. 2003.