

**MORFOFISIOLOGIA RUMINAL DE VACAS
LEITEIRAS ALIMENTADAS NO PRÉ-PARTO
COM DIETAS DE DIFERENTES TEORES
ENERGÉTICOS**

TIAGO DA SILVA TEÓFILO

2010

TIAGO DA SILVA TEÓFILO

**MORFOFISIOLOGIA RUMINAL DE VACAS LEITEIRAS
ALIMENTADAS NO PRÉ-PARTO COM DIETAS DE DIFERENTES
TEORES ENERGÉTICOS**

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

Prof. Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

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

Teófilo, Tiago da Silva.

Morfofisiologia ruminal de vacas leiteiras alimentadas no pré-parto com dietas de diferentes teores energéticos / Tiago da Silva
Teófilo. – Lavras : UFLA, 2010.

50 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: João Chrysóstomo de Resende Junior.

Bibliografia.

1. Dieta de transição. 2. Periparto. 3. Nutrição animal. 4.
Acidose ruminal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.2089232

TIAGO DA SILVA TEÓFILO

**MORFOFISIOLOGIA RUMINAL DE VACAS LEITEIRAS
ALIMENTADAS NO PRÉ-PARTO COM DIETAS DE DIFERENTES
TEORES ENERGÉTICOS**

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 23 de março de 2010

Prof^ª. DSc. Suely de Fátima Costa UFLA

Prof^ª. DSc. Nadja Gomes Alves UFLA

Prof^a. DSc. Cristina Delarete Drummond UFLA

Prof. DSc. João Chrysostomo de Resende Júnior
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, José Teófilo
Sobrinho e Etelvina das Dores da
Silva Teófilo,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter me dado o dom da vida e por estar ao meu lado em toda minha caminhada.

Aos meus pais, José Teófilo e Etelvina, por tudo que fizeram por mim até hoje, serei eternamente grato.

Aos meus irmãos, Taliane, Tennison, Tayza e Tony, com os quais pude dividir, crescer e aprender. A minha sobrinha, Ana Júlia, pelos momentos de alegria.

A todos os meus familiares, primos, tios, avós, por todo apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realização do curso.

A CAPES, pela concessão da bolsa e a FAPEMIG, pelo aporte financeiro para condução deste experimento.

Ao professor Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior, por ter aceitado me orientar e pela confiança em mim depositada.

Às professoras, Dra. Suely de Fátima Costa, Dra. Nadja Gomes Alves e Dra. Cristina Delarete Drummond, pelos ensinamentos ao longo do curso, pela amizade e por terem aceitado fazer parte da minha banca examinadora, contribuindo com valiosas sugestões.

Aos funcionários da UFLA, em especial Creuza Rezende (DCA) e Marcelo Andrade (DQI), por todo apoio fornecido.

Aos ex-estagiários e hoje grandes amigos, Matheus Balduino, Thiago França, Tiago Del Valle, Gustavo Lenzi, Pedro Paulo, Pedro Henriques, Luis Sérgio, Lucas Parreira, pelo apoio, convívio e valiosa amizade. Ao Anselmo Moreira, por ter conduzido a etapa inicial do experimento.

Aos amigos que fiz em Lavras, Amália Chaves, Fábio Bruhn, Ronaldo Lima, Leonardo Pereira, Mariana Maseo, Ozana Zacaroni, Leandra Melo, Danilo Santoro, Daniele Lima, por toda ajuda fornecida, pelo companheirismo e pela grande amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, e para a concretização desse sonho que por descuido não tenham sido citados, mas que, contribuíram de diferentes formas, devo externar o meu sincero...

MUITO OBRIGADO!

“A quem o sofrimento pessoal é poupado, deve sentir-se chamado a diminuir o sofrimento dos outros”

(Albert Schweitzer (1875-1965), Nobel da paz em 1952).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Aspectos morfofisiológicos do estômago de ruminantes.....	03
2.2 Fermentação ruminal e absorção de AGV.....	04
2.3 Proliferação celular no ruminorretículo.....	07
2.4 Período periparturiente de vacas leiteiras.....	09
2.5 Acidose ruminal.....	12
2.6 Dieta de transição.....	13
2.7 Microbiologia ruminal.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Animais e dietas.....	19
3.2 Mensurações da produção e composição láctea.....	21
3.3 Mensurações da taxa de passagem, volume da digesta e pH do ruminorretículo.....	21
3.4 Mensurações morfológicas.....	22
3.5 Mensurações microbiológicas.....	23
3.6 Análises estatísticas.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AGNE	Ácido Graxo Não-Esterificado
AGV	Ácido Graxo Volátil
ARSA	Acidose Ruminal Subaguda
CNF	Carboidrato Não-Fibroso
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação
FDN	Fibra Detergente Neutro
IM	Índice Mitótico
IMS	Ingestão de Matéria Seca
K _p	Taxa Fracional de Passagem
MS	Matéria Seca
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
TG	Triglicérides
RFLP	Polimorfismo dos Comprimentos dos Fragmentos de Restrição
TGI	Trato Gastrointestinal

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Ingestão de matéria seca (IMS) de em vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (◆) ou baixo (▼) teor de carboidratos não-fibrosos no pré-parto ($P < 0,01$, para efeito de tratamento e dia de coleta; $P = 0,76$ para interação entre tratamento e dia de coleta).....	26
FIGURA 2	Superfície absorviva do ruminorretículo de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (◆) ou baixo (▼) teor de carboidratos não fibrosos no pré-parto ($P < 0,01$, para efeito de tratamento; $P = 0,08$ para efeito de dia e $P = 0,88$ interação entre dia e tratamento).....	29
FIGURA 3	Área das papilas do recesso ruminal de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (◆) ou baixo (▼) teor de carboidratos não fibrosos no pré-parto ($P = 0,90$, para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de dia e $P = 0,59$ para interação entre tratamento e dia de coleta).....	30
FIGURA 4	Número de papilas por cm^2 em vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (◆) ou baixo (▼) teor de carboidratos não fibrosos no pré-parto ($P = 0,19$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de dia da coleta e $P = 0,35$ para interação entre tratamento e dia).....	31
FIGURA 5	Índice mitótico do rúmen de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (◆) ou baixo (▼) teor de carboidratos não fibrosos no pré-parto ($P = 0,23$, para efeito de tratamento; $P = 0,16$ para dia de coleta e $P = 0,24$ interação entre tratamento e dia).....	33
FIGURA 6	pH do fluido ruminal de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (◆) ou baixo (▼) teor de carboidratos não-fibrosos no pré-parto ($P = 0,53$ para efeito de tratamento, $P < 0,01$ para dia de coleta e $P = 0,19$ interação entre tratamento e dia de coleta).....	34
FIGURA 7	Taxa fracional de passagem (K_p) do fluido ruminal, estimadas pela técnica de Cr-EDTA de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (◆) ou baixo (▼) teor de carboidratos não-fibrosos no pré-parto ($P = 0,33$ para efeito de tratamento; $P = 0,20$ para dia de coleta e $P = 0,24$ para interação entre tratamento e dia de coleta).....	35
FIGURA 8	Peso da digesta (kg) de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (◆) ou baixo (▼) teor de carboidratos	

	não-fibrosos no pré-parto ($P=0,02$, para efeito de tratamento; $P<0,01$ para dia de coleta e $P=0,63$ para interação entre tratamento e dia).....	37
FIGURA 9	Perfil do DGGE das bactérias presentes no fluido ruminal de vacas holandesas periparturientes, submetidas às dietas com alto (A) ou baixo (B) teor de CNF no pré-parto. Dias em relação ao parto -42, -28, -14, -7, 2, 14, 28, 42 e 56.....	38
FIGURA 10	Relação entre os padrões de bandas de DGGE, detectadas em amostras de fluido ruminal de vacas leiteiras periparturientes, submetidas a dietas com alto (A) ou baixo (B) teor de CNF no pré-parto. Dias ao parto -42, -28, -14, -7, 2, 14, 28, 42 e 56. A distância métrica corresponde à distância Euclidiana do método de variância mínima.....	39

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Exigências de energia líquida de lactação (ELI, MJ/d) para vacas leiteiras e novilhas dois dias antes versus dois dias após o parto.....	11
TABELA 2 Composição das dietas experimentais: padronização, “baixo carboidratos não-fibrosos” (BCNF), “alto carboidratos não-fibrosos” (ACNF) e lactação, oferecidas 28 dias antes do parto previsto até o dia do parto.....	19
TABELA 3 Ingestão de matéria seca (IMS) pós-parto, produção leiteira, produção leiteira corrigida para 3,5% de gordura, produção de gordura e teores de proteína, gordura e nitrogênio total (NT) de vacas submetidas a tratamentos com baixo ou alto teor de carboidratos não fibrosos (CNF) no pré-parto.....	27
TABELA 4 Peso vivo (PV), digesta, relação digesta/PV (DPV), matéria seca da digesta (MS) de vacas leiteiras periparturientes submetidas alimentadas com alto (Alto CNF) ou baixo (Baixo CNF) teor de carboidratos não-fibrosos no pré-parto.....	36

RESUMO

TEÓFILO, Tiago da Silva. **Morfofisiologia ruminal de vacas leiteiras alimentadas no pré-parto com dietas de diferentes teores energéticos**. 2010. 50 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Vacas leiteiras, após o parto, recebem dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis no ruminorretículo, levando à produção de AGV em alta velocidade o que pode levar a um quadro de acidose ruminal (AR). O objetivo desse trabalho foi verificar se a dieta de transição, fornecida nas últimas semanas de gestação, contribui efetivamente para o controle da AR em vacas leiteiras no pós parto. Para isso, seis vacas da raça holandesa, alocadas em um delineamento em blocos casualizados, de acordo com a data prevista de parto. Seis semanas antes do parto esperado, foram submetidas a uma dieta de padronização e quatro semanas antes do parto foram submetidas às dietas com baixo ou alto teor de carboidratos não fibrosos (CNF) na dieta. Após o parto, todas as vacas receberam dieta de lactação. As vacas que receberam dieta de alto CNF apresentaram maior ingestão de matéria seca e maior produção leiteira. Dieta com alto teor de CNF propiciou maior extensão da superfície absorptiva do rúmen do que a dieta com baixo teor de CNF, sugerindo que a dieta de transição tem efeito na capacidade ruminal de absorção de AGV, a qual tem alta correlação com a superfície absorptiva do rúmen, sendo importante no controle da AR. A extensão da superfície absorptiva antes do parto foi menor do que após o parto, provavelmente refletindo o efeito da dieta lactacional altamente energética. O fornecimento de dieta com elevado teor de CNF no pré-parto pode ser uma boa alternativa no controle da acidose ruminal pós-parto em vacas leiteiras de alta produção, por promover um maior desenvolvimento da superfície absorptiva do rúmen podendo dessa forma evitar o acúmulo de AGV neste compartimento. A maior ingestão de matéria seca e a maior produção leiteira associada à dieta com alto teor de CNF no pré-parto parecem ter sido reflexo de melhores condições fisiológicas do rúmen desses animais.

¹Comitê Orientador: Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior – UFLA (Orientador), Dra. Suely de Fátima Costa – UFLA, Dr. Mário César Guerreiro – UFLA.

ABSTRACT

TEÓFILO, Tiago da Silva. **Rumen morphophysiology of dairy cows fed diets of different energy levels before partum.** 2010. 50 p. Dissertation (Master in Veterinary Science) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Dairy cows after calving, receiving diets rich in reticulorumen rapidly fermentable carbohydrates, leading to VFA production at high speed. This high VFA production could lead to ruminal acidosis (RA). The aim of this study was to determine whether transition diet, given in the last weeks of pregnancy, contributes effectively to the control of post partum RA in dairy cows. Six Holstein cows divided in a randomized block design, according to the expected date of birth. Six weeks before the expected calving were fed a standardization diet. Four weeks before calving were subjected to diets with low or high content of non-fiber carbohydrates (NFC).. After calving, all cows were fed a highly energetic lactation diet. Cows fed the diet high NFC had higher dry matter intake and increased milk production. Diet high in NFC caused greater extension of the rumen absorptive surface than the diet low in NFC. This suggesting that transition diet has positive effect on the VFA ruminal absorption, which is important in RA controlling. The extent of the absorptive surface before parturition was lower than after delivery, probably reflecting the effect of high energy lactation diet. Providing a diet with high content of NFC in the pre-partum may be a good alternative in controlling postpartum RA in dairy cows of high milk production. Promoting the further development of the absorptive surface of the rumen can thus avoid the accumulation of AGV in this compartment. The higher dry matter intake and increased milk production associated with diets high in NFC in the pre-birth seem to have been a reflection of better physiological condition of the rumen of these animals.

¹Guidance Committee: Dr. João Chrysostomo de Resende Júnior – UFLA (Advisor), Dra. Suely de Fátima Costa – UFLA, Dr. Mário César Guerreiro – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O período periparturiente de vacas leiteiras compreende três semanas antes e três semanas após o parto e é frequentemente denominado período de transição. Nessa fase ocorre uma série de adaptações homeorréticas, a fim de preparar a vaca para uma nova condição fisiológica e podem ocorrer diversos distúrbios metabólicos que dificultam a expressão do potencial produtivo durante a lactação, provocando danos diretos ao animal, bem como perdas econômicas.

Desde a década de 20 existe a recomendação de aumentar o fornecimento de carboidratos de rápida fermentação no rúmen para vacas leiteiras de alta produção no período que antecede o parto, como forma de prepará-las para a lactação. Após o parto, há aumento acentuado na densidade energética da dieta oferecida, visando conciliar o consumo de energia à alta demanda metabólica da lactação.

A acidose ruminal inaparente ou subaguda é um dos distúrbios comuns que ocorrem no início da lactação, devido ao desequilíbrio entre a produção e a remoção dos ácidos graxos voláteis (AGV) do ambiente ruminal, levando ao acúmulo destes ácidos. Os AGV produzidos no rúmen, oriundos do metabolismo microbiano, provém a maior parte das exigências energéticas dos ruminantes. A remoção (*clearance*) dos AGV do ruminorretículo ocorre por absorção pela parede do órgão e por passagem para o omaso e compartimentos distais juntamente com a fase fluida ruminal. O aumento na superfície absorptiva do ruminorretículo pode ser induzido pela manipulação dieta do período de transição, permitindo maior absorção de AGV e conseqüente queda em sua concentração no fluido, podendo evitar acidose ruminal após o parto e aumentar o desempenho do animal.

Este trabalho foi conduzido objetivando avaliar o efeito da dieta de transição, com alto teor de grãos, fornecida nas últimas semanas de gestação sobre a morfofisiologia ruminal e desempenho produtivo no início da lactação em vacas leiteiras de alta produção.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos morfológicos do estômago de ruminantes

O estômago dos ruminantes é constituído por quatro compartimentos morfológicamente distintos: rúmen, retículo, omaso e abomaso. Os três primeiros compartimentos correspondem à porção aglandular e o último a porção glandular, onde é produzida a secreção gástrica. O rúmen é o maior dos compartimentos do estômago dos ruminantes e ocupa a maior parte da cavidade abdominal, especialmente o antímero esquerdo (Nickel et al., 1981).

O rúmen e o retículo normalmente são considerados como uma única câmara, denominada ruminoretículo ou câmara de fermentação proximal, devido à inexistência de barreira física consistente, com isso, a digesta está constantemente circulando entre esses dois compartimentos, devido à motilidade visceral (Nickel et al., 1981).

A superfície interna do rúmen de um animal adulto é caracterizada macroscopicamente pela presença de inúmeras projeções da mucosa, as papilas ruminais, as quais aumentam a superfície interna do órgão (Banks, 1992). As papilas se projetam para o lume do órgão, podendo apresentar formas e tamanhos variados nas diferentes partes do rúmen (Schnorr & Vollmerhaus, 1967; Henrikson, 1970), sendo maiores e mais densas nas regiões ventrais dos sacos ruminais. A parede do rúmen é formada pelas túnicas serosa, muscular e mucosa, dispostas nessa ordem em direção ao lúmen do órgão (Steven & Marshall, 1970; Dellmann & Eurell, 1998).

O epitélio de revestimento do rúmen é do tipo estratificado pavimentoso queratinizado, de espessura variável, formado por quatro camadas de células distintas: basal, espinhosa, granulosa e córnea ou queratinizada (Banks, 1992; Dellmann & Eurell, 1998). O epitélio é a parte metabolicamente ativa da mucosa e exerce as funções fisiológicas de absorção, metabolismo de AGV e proteção

(Sakata & Tamate, 1979; Gálfi et al., 1991). A camada protetora é a queratinizada e apresenta baixa capacidade metabólica devido à presença de grande quantidade de queratina no citoplasma e poucas organelas celulares (Baldwin & Jesse, 1991).

O epitélio ruminal é naturalmente paraqueratótico (Lavker et al., 1969; Lavker & Matoltsy, 1970). No entanto, maior prevalência de paraqueratose ruminal é associada a dietas com alto teor de alimentos concentrados (Tamate & Kikuchi, 1978), provavelmente resultante da indução de alta taxa de proliferação e migração celular sem tempo suficiente para completa diferenciação (Goodlad, 1981). A camada muscular é constituída por músculo liso formando as camadas circular interna e longitudinal externa. A serosa é composta por epitélio simples pavimentoso, denominado mesotélio, voltado para a cavidade abdominal, e por uma faixa de tecido conjuntivo, localizada internamente à primeira, e que contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e tecido adiposo (Banks, 1992; Dellman & Eurell, 1998).

2.2 Fermentação ruminal e absorção de AGV

A digestão de carboidratos, como a celulose e a hemicelulose, não pode ser feita por enzimas oriundas de mamíferos (Soest, 1991), exigindo um processo que envolve a colonização do trato gastrointestinal por microorganismos simbióticos (Stevens & Hume, 1998). Os ácidos graxos voláteis (AGV) ou ácidos graxos de cadeia curta, principalmente acetato, propionato e butirato, mas também em menor quantidade, valerato, caproato, isobutirato, metilbutirato, 2-metilbutirato e traços de outros ácidos de cadeia mais longa, são produzidos no ruminorretículo como alguns dos produtos resultantes da atividade microbiana sobre a matéria orgânica (France & Siddons, 1993), podem prover até 80% da exigência diária de energia dos ruminantes (Bergman, 1990).

A concentração de AGV no fluido ruminal é bastante variável, podendo oscilar entre 70 e 150 mM em vacas leiteiras de alta produção, dependendo da composição da dieta, bem como do tempo decorrido após a alimentação. O pico de concentração ocorre entre 10 a 14 horas após a primeira alimentação em vacas leiteiras alimentadas com dieta completa, apresentando elevado teor energético (Pereira & Armentano, 2000; Salvador et al., 2008).

O padrão de fermentação é determinado pela composição da população microbiana, a qual é determinada pela dieta basal, particularmente pelo tipo de carboidrato dietético. Dietas baseadas em forragem, apresentando altos teores de fibra, estimulam o crescimento de espécies de bactérias produtoras de acetato e a proporção molar entre acetato : propionato : butirato estará em torno de 70 : 20 : 10. Entretanto, dietas ricas em amido propiciam o desenvolvimento de bactérias produtoras de propionato e estão associadas com aumento na proporção de propionato em detrimento do acetato, embora acetato seja sempre o mais abundante dos AGV. Sob certas condições, dietas concentradas podem estimular o desenvolvimento de uma grande população microbiana com aumento na proporção de butirato ao invés de propionato. Outros fatores podem também afetar o padrão de fermentação como a forma física da dieta, o nível de consumo, a frequência de alimentação e o uso de aditivos químicos (France & Siddons, 1993).

Além dos carboidratos dietéticos, as proteínas e parcialmente os lipídios podem gerar AGV no rúmen. A contribuição de lipídios é muito pequena, porque somente a porção carboidrato, isto é, glicerol e galactose gerados a partir da hidrólise de lipídios é fermentada, o que não ocorre com os ácidos graxos de cadeia longa. As proteínas, entretanto, podem ser uma fonte significativa de AGV quando as dietas têm alto teor de proteína degradável no rúmen. As proteínas são hidrolisadas a aminoácidos, os quais são desaminados antes da conversão para AGV. A partir dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina, são

formados os AGV isobutírico, 3-metilbutírico, e 2-metilbutírico, respectivamente. Esses AGV de cadeia ramificada são fatores de crescimento essenciais para certas espécies de bactérias no rúmen (Cotta & Hespell, 1986).

A remoção (*clearance*) dos AGV produzidos no ruminorretículo ocorre por dois processos: absorção pela parede do órgão e passagem com a fase fluida ruminal pelo óstio retículo-omasal (Peters et al., 1990; Resende Júnior et al., 2006b). A absorção através da parede do rúmen ocorre tanto por difusão simples dos ácidos na forma protonada (Dijkstra, 1993; Sehested et al., 1999), quanto por absorção na forma aniônica, provavelmente devido a um mecanismo de troca iônica envolvendo Cl^- e HCO_3^- (Kramer et al., 1996; Gäbel et al., 2002). 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 intrarruminal, já que prótons são absorvidos junto com os AGV. Por outro lado, a absorção de AGV na forma aniônica poderia induzir 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 aniônica, ocorre liberação de bicarbonato para o lúmen ruminal, evitando uma possível queda no pH (Kramer et al., 1996; Gäbel et al., 2002).

Os fatores que influenciam o *clearance* por absorção são a concentração ruminal de AGV (Dijkstra et al., 1993; Gäbel et al., 1993), o pH do ambiente ruminal (Dijkstra, 1993), o volume de fluido ruminal (Dijkstra, 1993; Resende Junior et al., 2006a) e a extensão da superfície absorptiva, a qual reflete diretamente o tamanho das papilas do rúmen (Dirksen et al., 1984; Daniel et al., 2006). Já o *clearance* por passagem com a fase fluida para o omaso é principalmente influenciado pela motilidade (Crichlow & Chaplin, 1985) e pelo volume de líquido ruminal (Resende Junior et al., 2006a).

Da quantidade total de AGV que sai do ruminorretículo por passagem, a maioria parece ser absorvida no omaso (Rupp et al., 1994). Cerca de 50 a 60% do *clearance* ruminal de AGV acontece por absorção pela parede do ruminorretículo e os outros 40 a 50% passam para o omaso (Peters et al., 1990; Voelker & Allen, 2003; Resende Junior et al., 2006a), porém uma quantidade razoável de AGV atinge o abomaso (Rupp et al., 1994), provavelmente incorporada ao fluido que não atingiu os recessos interlaminares do omaso.

As áreas das superfícies epiteliais do ruminorretículo (Dirksen et al., 1984) e, provavelmente, do omaso estão diretamente relacionadas com a capacidade de absorção de AGV. Na mesma unidade de área existe diferença entre a velocidade de absorção de AGV pela parede do rúmen e pela parede do omaso (Daniel et al., 2006), demonstrando que os fatores determinantes da absorção de AGV variam conforme as características morfofisiológicas dos diferentes segmentos do TGI. Existem indícios de que a morfologia do epitélio do omaso também seja influenciada pela dieta (Daniel & Resende Júnior, 2007; Costa et al., 2008).

2.3 Proliferação celular no ruminorretículo

No epitélio da mucosa ruminal a proliferação celular ocorre a partir da camada basal, onde as células entram em divisão mitótica. Essas, por sua vez, sofrem diferenciação e migram para as camadas superiores do epitélio até alcançar a camada córnea e descamar para dentro do lume ruminal (Banks, 1992; Dellman & Eurell, 1998).

Os AGV são estimuladores de proliferação celular do epitélio ruminal (Sakata & Tamate, 1978, 1979). O efeito direto no epitélio varia conforme o tipo de AGV (Gálfi et al., 1986) e ao menos um mediador, a insulina (Sakata et al., 1980; Resende Júnior et al., 2006b), está envolvido no processo de estimulação da proliferação celular. Como existe um efeito estimulador direto dos AGV na

proliferação celular, as papilas ruminais são mais desenvolvidas onde a fase fluida permanece mais tempo em contato com a parede, uma vez que esses ácidos encontram-se incorporados ao líquido ruminal. Devido a este, e provavelmente também a outros fatores, o tamanho e a forma das papilas ruminais variam de acordo com a região do rúmen (Beharka et al., 1998; Daniel et al., 2006).

A resposta morfológica das papilas às variações da dieta também é diferente conforme a região, estando já estabelecido que as papilas localizadas no saco cranial do rúmen são as que menos respondem às variações dietéticas em bovinos (McGavin & Morril, 1976; Beharka et al., 1998). Alguns experimentos não foram capazes de detectar resposta papilar às variações nutricionais sutis (Andersen et al., 1999; Reynolds, 2004; Resende Júnior et al., 2006b), provavelmente por terem utilizado papilas oriundas do saco cranial do rúmen. Entretanto, Resende Júnior et al. (2006b), mesmo trabalhando com papilas oriundas do saco cranial, conseguiram encontrar diferença no índice mitótico da camada basal do epitélio, que foi mais alto ($P=0,03$) em papilas de vacas alimentadas com concentrado uma vez ao dia do que em papilas de vacas alimentadas com concentrado quatro vezes ao dia, uma vez que ocorre uma maior resposta da mucosa ruminal a picos na concentração de AGV. No mesmo experimento, os autores puderam também detectar que, na transição de uma dieta de padronização, baseada em feno, para uma dieta com concentrado e feno, as papilas ruminais tenderam ($P=0,07$) a crescer rapidamente atingindo o seu tamanho máximo, 12 dias após a introdução do concentrado. Por outro lado, se a presença de AGV estimula a proliferação epitelial, sua ausência ou menor quantidade pode levar à involução do epitélio (Sakata et al., 1974). Jejum de dois dias teve efeito agudo na diminuição do tamanho papilar e índice mitótico e no aumento do índice apoptótico em papilas coletadas no saco cranial do rúmen de vacas (Resende Júnior et al., 2006a).

2.4 Período periparturiente de vacas leiteiras

O período de transição de uma vaca compreende as três semanas antes do parto e as três semanas após o parto (Grummer, 1995). Esse período é caracterizado por ajustes metabólicos e endócrinos para viabilizar a adaptação orgânica ao parto e à lactação.

Bauman & Currie (1980) definiram homeorrese como “mudanças coordenadas ou orquestradas no metabolismo de tecidos corporais necessárias para dar suporte a um determinado *status* fisiológico”. De acordo com os autores, as principais características da relação homeorrética são a sua natureza crônica, influência simultânea em múltiplos tecidos, muitas vezes não relacionados e sua mediação por meio de respostas alteradas a sinais homeostáticos. A transição metabólica do final da gestação para o início da lactação é um exemplo típico dessas características.

As concentrações de insulina plasmática diminuem no período final da gestação e no início da lactação em vacas leiteiras, com picos agudos no dia do parto (Kunz et al., 1985). A resistência à insulina previamente observada em humanos e animais de laboratório durante o final da gestação também ocorre em ruminantes (Pettersen et al., 1993, 1994). Este evento é manifestado por meio da sensibilidade diminuída à insulina por várias vias metabólicas associadas com a utilização de glicose por todo o organismo e diminuição da resposta à insulina em relação à lipólise e à mobilização de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (Pettersen et al., 1994). A mobilização de gordura durante o final da gestação é facilitada em parte pela diminuição da habilidade da insulina em promover a lipogênese e de se opor à lipólise (Bell, 1995).

As concentrações plasmáticas do hormônio do crescimento aumentam durante o final da gestação, apresentam um pico durante a parição, e se mantêm moderadamente elevadas durante o início da lactação (Tucker, 1985).

Durante as últimas três semanas de gestação a demanda por nutrientes pelo feto e placenta atinge o nível máximo (Bell, 1995), no entanto a ingestão de matéria seca (IMS) diminui em 10 a 30% (Hayirli et al., 2002). Após o parto, com o início da síntese do leite e o aumento rápido na produção de leite, há grande aumento na demanda de glicose para a síntese da lactose do leite, em um período em que ainda não há a máxima IMS (TABELA 1). Em razão da maioria dos carboidratos provenientes da dieta ser fermentada no rúmen, pouca glicose é absorvida diretamente do trato digestivo. As vacas leiteiras, portanto, dependem muito da gliconeogênese hepática para atender às grandes demandas sistêmicas de glicose. A produção de propionato, devido ao baixo consumo, é insuficiente para atender as demandas sistêmicas de glicose (Drackley et al., 2001). Os aminoácidos da dieta e oriundos da mobilização de músculos esqueléticos, e o glicerol oriundo da mobilização de gordura corporal fornecem o restante da glicose necessária (Reynolds et al., 2003).

TABELA 1 Exigências de energia líquida de lactação (ELI, MJ/d) para vacas leiteiras e novilhas dois dias antes versus dois dias após o parto

Função	Primípara 570 kg		Múltipara 725 kg	
	-2 d	+2 d	-2 d	+2 d
Mantença	38,9	35,6	46,9	42,2
Prenhez	11,7	-	13,8	-
Crescimento	7,9	7,1	-	-
Produção de Leite	-	62,3	-	78,2
Total	58,5	105	60,7	120,4

Calculado pelo National Research Council - NRC (2001), assumindo produção de leite corrigida para 4% de gordura igual à de 25 kg/d para vacas múltíparas e 20 kg/d para vacas primíparas. Adaptado de Drackley et al. (2005).

Com a aproximação do momento do parto ocorre queda acentuada e aguda na IMS de vacas leiteiras (Vazquez-Añon et al., 1994), sendo geralmente menor que as exigências de energia mesmo em vacas que não manifestam doenças metabólicas (Bell, 1995). A alta relação de hormônio do crescimento/insulina no sangue de vacas no pós-parto permite a mobilização de ácidos graxos de cadeia longa de triglicérides (TG) provenientes do tecido adiposo, com o objetivo de suprir o déficit entre o consumo de energia e as exigências (balanço energético negativo). Ácidos graxos liberados do tecido adiposo circulam como AGNE, sendo a principal fonte de energia para a vaca durante esse período. A concentração de AGNE no sangue reflete a magnitude da mobilização do tecido adiposo (Pullen et al., 1989), portanto com o aumento do balanço energético negativo, mais AGNE é liberado do tecido adiposo, aumentando a sua concentração no sangue.

Com o aumento da concentração de AGNE no sangue ao redor do parto ou no início de lactação, mais AGNE é absorvido pelo fígado (Reynolds et al., 2003). No fígado, os AGNE podem ser: completamente oxidados a dióxido de carbono para fornecimento de energia para o fígado, parcialmente oxidados para produção de corpos cetônicos que são liberados no sangue e servem como fontes de energia para outros tecidos ou reconvertidos para TG, que são armazenados.

2.5 Acidose ruminal

Vacas leiteiras de alta produção recebem dietas altamente energéticas após o parto. Essas dietas, ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis no ruminorretículo, levam à produção de ácidos graxos voláteis em alta velocidade. Se a taxa de produção excede a taxa de remoção dos AGV no ambiente ruminal, haverá acúmulo desses ácidos na fase fluida, levando a um quadro conhecido como acidose ruminal (Barker et al., 1995), um dos principais distúrbios metabólicos que ocorre no início da lactação.

A acidose ruminal pode ter efeitos negativos sobre o desempenho e a saúde dos animais, provocando efeitos deletérios sobre a ingestão de alimentos (Elliot et al., 1995), a degradação ruminal da fibra (Grant & Mertens, 1992), a motilidade do rúmen (Leek & Harding, 1975; Crichlow & Chaplin, 1985) e a morfologia da parede ruminal (Gäbel et al., 2002).

A acidose ruminal subaguda (ARSA) pode ocorrer em rebanhos leiteiros, sem sinais clínicos muito evidentes como ocorre no caso da acidose ruminal aguda. A ARSA pode causar problemas nos animais e diminuir a longevidade do rebanho e é uma doença que não pode ser tratada, mas sim prevenida. Dentre os problemas causados pela ARSA, citam-se a diminuição na ingestão de matéria seca com consequente perda na produção e condição corporal, distúrbios de locomoção, complexo paraqueratose-ruminite-abcesso hepático, alteração na consistência das fezes e depressão na gordura do leite (Kleen et al., 2003). Na acidose clínica, frequentemente chamada de acidose láctica, ocorre um processo mais avançado (Nocek, 1997) que envolve, além do acúmulo de AGV, a seleção de microrganismos produtores de ácido láctico e a inibição (Russel & Allen, 1983, citados por Allen et al., 1997) dos microrganismos que metabolizam o ácido láctico, convertendo-o, principalmente a acetato, propionato e butirato (Gill et al., 1986).

2.6 Dieta de transição

Há mais de oitenta anos recomenda-se aumentar o fornecimento de concentrado nas últimas três semanas de gestação de vacas leiteiras de alto potencial produtivo, como forma de prepará-las para a lactação (Boutflour, 1928). Distúrbios metabólicos são comuns nesse período e podem dificultar a expressão do potencial produtivo do animal durante a lactação (Grummer & Kulick, 1995).

Rabelo et al. (2003), comparando dietas fornecidas com baixo e alto teor de CNF durante 28 pré-parto, encontraram tendência ($P=0,08$) de maior comprimento das papilas do saco ventral nas vacas que receberam dietas com maior teor de CNF. Há então indícios de que possa haver resposta morfológica da parede do rúmen quando se aumenta a quantidade de grãos na dieta, até em um tempo mais curto do que as três semanas, pré-parto, preconizadas tradicionalmente para utilização da dieta de transição.

O local mais indicado para amostragem da mucosa do rúmen é o saco ventral devido à melhor resposta às variações da dieta. A amostragem de um fragmento da mucosa do saco ventral, na região do recesso do rúmen, também possibilita a estimativa da superfície absorptiva total do ruminorretículo, utilizando-se a equação de regressão proposta por Daniel et al. (2006).

Apesar dos indícios de que a superfície absorptiva é diretamente proporcional à capacidade de absorção do ruminorretículo, como constatado em bezerros por Sutton et al. (1963) e em vacas por Melo (2007), o único experimento realizado com vacas, em período de transição é o de Dirksen et al. (1984). Apesar do pioneirismo do trabalho, alguns detalhes metodológicos impedem que esse experimento possa apresentar uma informação realmente confiável. O experimento de absorção foi realizado com apenas duas vacas, a ingestão de matéria seca não é relatada e a técnica de medição da capacidade de absorção utilizada foi a do ruminorretículo evacuado e lavado, o que não

representa uma situação fisiológica. Melo (2007), avaliou a capacidade de absorção de ácido valérico pelo epitélio ruminal e detectou modificações na superfície absorptiva em resposta a dietas com diferentes níveis energéticos. Neste experimento analisando fragmentos da parede do saco ventral do rúmen foi observado que a maior superfície absorptiva foi correlacionada à maior velocidade de absorção de ácido valérico, a qual é representativa da absorção de outros AGV, conforme constatado por Resende Júnior et al. (2006a). Apesar do mérito do trabalho de Melo (2007), as condições fisiológicas do ruminorretículo foram também alteradas, uma vez que o óstio retículo-omasal foi ocluído durante o período de coleta de dados, o qual refletiu em acúmulo de líquido, muito provavelmente devido à secreção salivar e também ao trânsito de água pela parede do rúmen.

Um trabalho que pretenda estabelecer definitivamente se o aumento da superfície absorptiva, determinado pela dieta de transição, reflete em aumento na capacidade de absorção deve utilizar um número maior de animais e as medições de absorção devem ser feitas em condições fisiológicas, ou seja, com o ruminorretículo repleto de digesta e sem qualquer alteração do fluxo da fase fluida e da motilidade ruminal. A técnica do valerato-cobalto proposta por Allen et al. (2000) e validada por Resende Júnior et al. (2006a), possibilita perfeitamente a estimativa da capacidade de absorção de AGV, pela parede do rúmen, em condição muito próxima da fisiológica.

O aumento da densidade energética da dieta por meio do aumento do teor de CNF durante o período de transição pode ter alguns benefícios (Grummer, 1995; Haar et al., 1999), como permitir que os microorganismos ruminais se adaptem às dietas ricas em concentrado, que serão fornecidas após o parto ou a diminuir a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo relacionadas com distúrbios metabólicos (Grummer, 1993; Haar et al., 1999).

2.7 Microbiologia rumial

Grummer (2005), um dos pesquisadores que mais estudou o período de transição em vacas leiteiras, em uma conferência proferida no Brasil, citou que é curioso notar a ausência de pesquisas que descrevam mudanças nas populações microbianas no rúmen à medida que a vaca passa pelo período de transição ou que expliquem como essas mudanças poderão ser influenciadas pela dieta. Afirmou ainda que o conceito associado ao fornecimento de grãos adicionais, antes da parição, para facilitar a adaptação microbiana às dietas com alto teor de amido pode ser contestado simplesmente pela falta de dados para sustentar essa prática. Relatou também que dados obtidos com bovinos de corte em confinamento e, em menor grau, com vacas leiteiras em lactação, sugerem que as populações microbianas requerem três semanas para atingir um nível estacionário após mudanças abruptas na dieta. Obviamente a grande diversidade do ecossistema ruminorreticular dificulta o trabalho de identificação qualitativa de microorganismos. Variações sutis na dieta que possam provocar essas mudanças qualitativas, representativas da adaptação microbiana, necessitam de técnicas que possam ser simples e eficientes.

Recentes progressos em biologia molecular têm levado ao desenvolvimento de novas técnicas para a identificação de microorganismos, baseada na similaridade ou dissimilaridade de DNA, RNA ou proteínas. Isto inclui padrões de aloenzimas, hibridização DNA-DNA, cariotipagem eletroforética, análise de microsátélites, RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) e RFLP de DNA cromossomal e RFLP de DNA mitocondrial. A técnica PCR (Reação em cadeia de polimerase) ou reação em cadeia da polimerase desenvolvida por Mullis & Faloona (1987) trouxeram grande contribuição para estudos moleculares de diversidade e ecologia microbiana. Esta técnica permitiu a amplificação de sequências de DNA

específicas utilizando oligonucleotídeos “primers”, sendo simples, rápida e de alta sensibilidade para pequenas quantidades de DNA molde.

Utilizando iniciadores específicos para a região conservada rDNA é possível, por PCR, gerar produtos com tamanho de fragmentos semelhantes, mas com composição de bases diferentes. A variabilidade da sequência pode ser analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) (Muyzer et al., 1993). A DGGE de amplicons de rDNA 16S e 18S, tem sido utilizada para caracterizar ecossistemas complexos, inclusive ruminais (McEwan et al., 2005; Sun et al., 2006). Segundo essa técnica, o DNA total do habitat de interesse é extraído e uma região hipervariada do rDNA 16S para microrganismos procarióticos e 18S para microrganismos eucarióticos é amplificada pela PCR. Amplicons de DNA com mesmo tamanho, mas com composição distinta, podem ser separados pela DGGE, gerando um perfil genotípico da comunidade. Nesta técnica, utilizam-se géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear desnaturante (de ureia e formamida), no qual moléculas de DNA de mesmo tamanho, porém, com diferentes sequências, apresentam perfis migratórios diferentes. Essa separação baseia-se em um princípio físico simples de que a mobilidade eletroforética do DNA em um gel de poliacrilamida é sensível à estrutura secundária da molécula em relação a sua conformação, que pode ser helicoidal, parcialmente desnaturada ou fita simples. As moléculas parcialmente desnaturadas movimentam-se mais lentamente no gel do que moléculas em fita dupla (Muyzer & Smalla, 1998). Durante a eletroforese em condições crescentes de desnaturação, os fragmentos permanecem em dupla fita até que eles atinjam as condições necessárias para a desnaturação dos domínios da molécula chamados “melting domains”. Esses domínios caracterizam por possuírem condições de desnaturação idênticas, fazendo com que, à uma determinada concentração de desnaturante ocorra uma desnaturação completa nesses domínios, situados ao longo da molécula. Quando

há a desnaturação de um domínio, processa-se uma transição na conformação da molécula, que passa de helicoidal para parcialmente desnaturada e a migração da molécula no gel é interrompida (Rosado & Duarte, 2002).

Sun et al. (2006) usaram a técnica DGGE para investigar a dinâmica da população de microorganismos de co-cultura de fungos e bactérias celulolíticas ruminais cultivadas com substratos com diferentes proporções entre casca de arroz e milho. Esses autores detectaram aumento de bactérias celulolíticas em resposta ao aumento do teor de milho no substrato e comportamento inverso em relação aos fungos. Já McEwan et al. (2005) pesquisaram a dinâmica da população microbiana ruminal de ovelhas em resposta ao fotoperíodo, usando a técnica de DGGE, mas não encontraram diferenças associadas ao comprimento do dia na diversidade de microorganismos ciliados. No entanto, esses pesquisadores postularam que a composição da dieta deve ser considerada quando se pretende estudar populações microbianas ruminais, o que corrobora para a proposta desse projeto, em se utilizar a técnica de DGGE, para checar as variações qualitativas nas populações microbianas ruminais em resposta a diferentes dietas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dietas

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Bioética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Lavras (Protocolo N° 042/2009).

Foram utilizadas seis vacas da raça Holandesa, com cânula no saco dorsal do rúmen, alocadas em dois tratamentos em um delineamento em blocos casualizados. Foram formados três blocos de duas vacas, definidos por data prevista de parto. Seis semanas antes do parto esperado, as vacas tiveram sua lactação anterior encerrada, foram alojadas em um *Tie Stall* com cama de areia e receberam uma dieta de padronização, de acordo com as necessidades previstas pelo NRC (2001), que foi composta por silagem de milho, ureia e premix mineral-vitaminico e água, *ad libitum*. Quatro semanas antes do parto esperado as vacas foram alocadas aos tratamentos que consistiram de variação da proporção FDN:CNF da dieta (TABELA 2). Após o parto, todas as vacas receberam a mesma dieta formulada conforme preconização do NRC (2001), para suportar alta lactação. Na formulação da dieta foram considerados os nutrientes dos alimentos que foram fornecidos, previamente determinados em laboratório. As dietas foram oferecidas, diariamente, duas vezes ao dia (às 7 e às 16 horas), como ração total (TMR), *ad libitum*, em quantidade suficiente para obter no mínimo 15% do oferecido como sobra diária. O consumo foi aferido diariamente por pesagem do oferecido e da sobra. Amostras de forragem, concentrado, dieta oferecida e sobras foram obtidas semanalmente e secadas a 60°C para a determinação de matéria seca. Os resultados foram usados para ajustar a dieta semanalmente.

Alíquotas de forragem foram coletadas semanalmente para compor uma amostra de duas semanas. Alíquotas de concentrado foram coletadas a cada duas

semanas para comporem uma amostra mensal. Essas amostras foram pré-secas a 60°C por 72 horas, para determinação do teor de matéria seca (Soest et al., 1991).

TABELA 2 Composição das dietas experimentais: padronização, “baixo carboidratos não-fibrosos” (BCNF), “alto carboidratos não-fibrosos” (ACNF) e lactação, oferecidas 28 dias antes do parto previsto até o dia do parto

Alimento	Padronização	ACNF	BCNF	Lactação
Silagem de milho	98,17%	58,17%	98,17%	40,27%
Farelo de soja	-	13,26%	-	18,10%
Milho maduro moído fino	-	26,74%	-	20,13%
Ureia	1,00%	1,00%	1,00%	0,30%
Premix mineral vitamínico	0,83%	0,83%	0,83%	1,00%
Polpa cítrica	-	-	-	5,85%
Caroço de algodão	-	-	-	14,33%
Princípios nutritivos				
Proteína bruta (%)	8,80%	16,00%	8,80%	18,74%
Fibra em detergente neutro (%)	58,90%	38,87%	58,90%	36,57%
Extrato etéreo (%)	3,14%	3,16%	3,14%	5,41%
Cinzas (%)	5,05%	4,62%	5,05%	5,24%
Carboidratos não-fibrosos (%)	25,52%	38,89%	25,52%	34,57%
FDN de forragem (%)	58,90%	34,90%	58,90%	24,16%
Relação forragem:concentrado	100:00	61:39	100:00	40:60
Energia Líquida (Mcal/Kg MS)	1,33	1,59	1,33	1,71
Nutrientes digestíveis totais (NDT) (%)	58,90%	67,62%	58,90%	71,13%

3.2 Mensurações da produção e composição láctea

Após o parto, as vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 06h e às 16h, e a produção de leite foi monitorada a cada ordenha. A produção diária de leite corrigido para 3,5% de gordura foi calculada pela equação (Gravert, 1987): Leite 3,5% (kg) = (0,432 x produção diária de leite em kg) + (16,23 x produção diária de gordura em kg). Amostras de leite foram obtidas a cada sete dias de quatro ordenhas consecutivas e analisadas para gordura, proteína e nitrogênio total (Laboratório de Análises de Leite do DCA-UFLA).

3.3 Mensurações da taxa de passagem, volume da digesta e pH do ruminorretículo

As mensurações da taxa de passagem foram realizadas as seis, quatro, duas e uma semana antes do parto esperado e aos dois dias, duas, quatro, seis e oito semanas após o parto. Os ensaios tiveram início três horas após a alimentação da tarde, ou seja, às 19 horas. Para cada vaca e cada dia de coleta foi elaborada uma solução de marcador de fase fluida ruminal, contendo 800 ppm de cromo, na forma de Cr-EDTA (Binnerts et al., 1968), diluídos em um volume de quatro litros de água.

Antes da infusão da solução de marcador, uma amostra de fluido ruminal, de aproximadamente 100 mL, foi coletada do saco ventral do rúmen, para determinação do pH e análises microbiológicas. As amostras de fluidos foram coletadas utilizando-se um tubo de PVC rígido de 3/4" com múltiplos orifícios no terço distal, acoplado a um dispositivo de sucção.

Após a coleta da amostra inicial, os quatro litros de solução marcadora foram infundidos no ruminorretículo utilizando-se um funil acoplado ao tubo de PVC utilizado para as coletas de fluido (Daniel & Resende Júnior, 2007). Antes da infusão, a solução teve o pH ajustado para o pH ruminal inicial com solução de NaOH a 50%. O volume infundido foi dividido em quatro partes iguais (1000

mL), para que uma das partes fosse infundida no saco cranial e o restante infundido em três pontos do saco ventral do rúmen, conforme preconizado por Daniel & Resende Júnior (2007). Coletas seriadas de amostras do fluido do saco ventral do rúmen foram feitas aos 90, 105, 135, 195, 255 e 315 minutos após a infusão dos marcadores. O pH do fluido foi medido imediatamente após cada coleta e uma amostra de 10 mL foi congelada a -20°C, para posterior análise do teor de cromo por espectrofotometria de absorção atômica (SpectrAA 110, Varian®, Vitória, Austrália), para determinação da taxa fracional de passagem de fluido, conforme descrito por Resende Júnior et al. (2006a). A taxa fracional de passagem da fase fluida, assumida como idêntica ao *clearance* ruminal de AGV por passagem para o omaso foi calculada pela regressão exponencial que descreveu a queda da concentração ruminal de cromo ao longo do tempo.

Após a última coleta, o ruminorretículo foi evacuado, a digesta foi pesada e foi coletada uma amostra correspondente a 10% do total para determinação de MS. O volume de fluido ruminal foi estimado multiplicando-se o peso da digesta evacuada pelo seu teor de umidade (1 - teor de matéria seca).

3.4 Mensurações morfológicas

Nos mesmos dias em que ocorreram os ensaios de taxa de passagem, foi realizada uma biópsia da mucosa do rúmen. Após a evacuação da digesta, um fragmento de aproximadamente 3 cm² foi coletado, do saco ventral do rúmen e em seguida subdividido em dois fragmentos menores.

Um dos fragmentos foi destinado às mensurações macroscópicas, portanto foi preservada em solução tampão bicarbonato Krebs-ringer (Sigma-Aldrich®) até as mensurações, segundo metodologia descrita por Daniel et al. (2006) e Resende Júnior et al. (2006b). Foi realizada a contagem do número de papilas ruminais presentes no fragmento. Posteriormente, as papilas ruminais foram seccionadas na base por meio de uma lâmina de bisturi e suas imagens

foram digitalizadas com um *scanner*, sendo suas áreas estimadas por meio do programa de análise de imagens UTHSCSA Image Tool (software livre). A área da superfície do fragmento foi determinada, conforme metodologia descrita por Daniel et al. (2006) e a superfície total do ruminorretículo foi estimada pelas equações de regressão propostas pelos mesmos autores.

Outra alíquota do fragmento foi imersa em solução de Bouin por 18 horas, preservadas em solução de etanol a 70% e processadas segundo protocolo de rotina para inclusão em parafina. As análises microscópicas foram efetuadas em microscópio óptico (Olympus CX31, Olympus Optical Co, Japão) em secções de fragmentos de 5µm, coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para determinação do índice mitótico, conforme proposto por Sakata & Tamate (1974).

3.5 Mensurações microbiológicas

A amostra de 100 mL do fluido ruminal, coletada antes da infusão de marcadores, nos dias 42, 28, 14 e sete antes do parto e aos dois, 14, 28, 42 e 56 dias após o parto, foi congelada imediatamente a -20°C até as análises (McEwan et al., 2005). Por ocasião das análises foi feita uma composição, equitativa, de amostras de fluido das três vacas de cada tratamento em cada dia de coleta. Os procedimentos de DGGE foram então realizados nas dezoito amostras, compostas por fluido ruminal de todas as vacas do tratamento em cada dia de coleta.

De cada amostra foram colhidas alíquotas de 2 mL e submetidas à extração do DNA total da amostra utilizando-se o kit comercial QIAamp® para extração de DNA de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico foi resuspenso em água deionizada esterilizada e armazenados a -20°C.

Na reação em cadeia da polimerase (PCR), para amplificação de fragmentos específicos da região V3 do rDNA 16S de microrganismos de

domínio *Bacteria*, foi utilizado o seguinte conjunto de iniciadores: BA338fCG (5' CGC CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG 3') e UN518r (5' ATTACCGCGGCTGCT GG 3'), em solução com volume total de 50 µl, contendo 0,2 µM de cada primer, 0,5U de *GoTaq* Flexi DNA Polimerase (Promega®), 5 µl do tampão da reação 10X com 20 mM de MgCl₂, 0,125 mM de dNTPs Mix (Promega®) e 40 ng de DNA molde. A amplificação foi realizada em tubos de 0,2 mL, utilizando um termociclador (Modelo PCYL220, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) nas seguintes condições: desnaturação inicial durante 4 min a 94°C; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 54°C por 1 min, extensão a 72°C durante 1 min e extensão final a 72°C durante 5 min.

Os amplicons do rDNA 16S foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com gradiente desnaturante variando de 20 a 35%. O gradiente foi preparado utilizando-se poliacrilamida contendo 0-100% de desnaturante (ureia 7M e 40% de formamida). A DGGE foi realizada com auxílio do equipamento DCode (BioRad Universal DCode Sistema de Detecção de Mutação, EUA) em géis e tampão TAE 0,5X (20 mM Tris acetato e 0,5 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 130V e uma temperatura constante de 60°C, durante 6 horas. Após a eletroforese os géis foram corados com Siber-Green por 30 min e analisados e fotografadas em um transiluminador UV (L-Pix, Loccus biotecnologia).

3.6 Análises estatísticas

A taxa fracional de passagem do fluido ruminal, o pH médio do fluido por dia de coleta, o peso e o volume da digesta, a ingestão de matéria seca e de nutrientes, a superfície absorptiva total do rúmen, o número de papilas por cm², a área de epitélio por cm² de fragmento, o índice mitótico, a produção de leite e seus componentes e a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura foram

submetidos a análise de variância usando o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis Systems Institute - SAS Institute, 1996). O modelo utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + T_j + D_k + TD_{(jk)} + e_{2ijk}$$

Em que: Y_{ijk} : Variável dependente; μ : Média geral da população; B_i : Efeito de bloco ($i = 3$); T_k : Efeito do teor de CNF ($j = 2$); D_k : Efeito de dia relativo ao parto ($k = 9$); $TD_{(jk)}$: Efeito da interação entre dia relativo ao parto e teor de CNF na dieta; e_{ijk} : Erro experimental.

Para as análises de produção de leite, produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e componentes do leite apenas os dias pós-parto foram considerados portanto, $k=5$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O incremento da densidade energética da dieta durante as quatro últimas semanas de gestação proporcionou maior aumento na ingestão de matéria seca, imediatamente após o parto (FIGURA 1). As vacas que receberam a dieta com baixo teor de CNF no pré-parto, não alcançaram nos primeiros 60 dias de lactação o nível de IMS das vacas que consumiram alto teor de CNF no pré-parto. Baixa IMS após o parto é associada à ocorrência de acidose ruminal (Elliot et al., 1995), sugerindo que a dieta de transição com alto teor de grãos pode ter contribuído para diminuir a ocorrência de acidose ruminal subaguda. Outros experimentos (Holcomb et al., 2001; Rabelo et al., 2003), constataram que a IMS apresentou aumento gradativo no período pós-parto. Hayirli et al. (2002), avaliaram dados da IMS de 699 vacas da raça Holandesa, alimentadas com 49 dietas durante as três últimas semanas de gestação em 16 experimentos e observaram que a IMS apresentou decréscimo linear com o incremento de FDN na dieta.

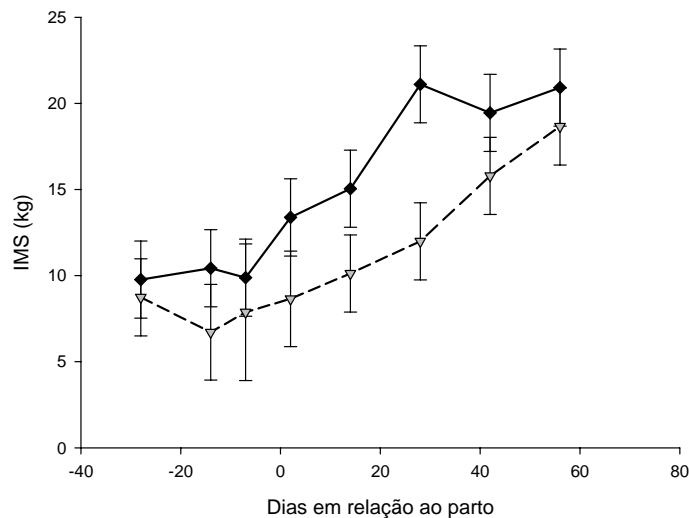


FIGURA 1 Ingestão de matéria seca (IMS) de em vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (●) ou baixo (▼) teor de carboidratos não-fibrosos no pré-parto ($P < 0,01$, para efeito de tratamento e dia de coleta; $P = 0,76$ para interação entre tratamento e dia de coleta)

A produção leiteira, a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e a produção de gordura foram maiores nas vacas que receberam a dieta com maior teor de CNF no pré-parto (TABELA 3). Este aumento foi relacionado à maior ingestão de nutrientes. Os teores de gordura, proteína e nitrogênio total no leite, entretanto, não diferiram entre os tratamentos. O melhor desempenho dos animais que receberam a dieta com maior teor de CNF no pré-parto pode estar associado à melhores condições fisiológicas do ruminorretículo. A ocorrência de acidose ruminal pode ter efeitos nocivos sobre o desempenho e a saúde dos animais, provocando efeitos negativos sobre a ingestão de alimentos (Elliot et al., 1995), a degradação ruminal da fibra (Grant & Mertens, 1992), a motilidade do rúmen (Leek & Harding, 1975; Crichlow & Chaplin, 1985) e a morfologia da parede ruminal (Gäbel et al., 2002).

Blaxter (1944) sugeriu que o aumento da produção leiteira em vacas suplementadas no final da gestação é atribuído aos efeitos da disponibilidade de nutrientes sobre o desenvolvimento mamário antes do parto, mas as mudanças nas necessidades de nutrientes de outros tecidos e muitos outros fatores também estão envolvidos (NRC, 2001). No entanto, Guo et al. (2007) comparando dietas com diferentes teores energéticos no pré-parto não observaram diferenças no consumo de matéria seca, produção de leite, composição do leite, variação de peso e condição corporal durante o período pós-parto.

TABELA 3 Ingestão de matéria seca (IMS) pós-parto, produção leiteira, produção leiteira corrigida para 3,5% de gordura, produção de gordura e teores de proteína, gordura e nitrogênio total (NT) de vacas submetidas a tratamentos com baixo ou alto teor de carboidratos não fibrosos (CNF) no pré-parto

	Alto CNF	Baixo CNF	EPM¹	P²
IMS (kg)	17,98	13,03	1,15	<0,01
Leite (kg)	25,03	17,14	1,05	<0,01
Leite 3,5%	24,53	17,40	1,27	<0,01
Gordura (kg)	0,85	0,62	0,05	<0,01
Proteína (%)	4,02	4,04	0,11	0,89
Gordura (%)	3,39	3,52	0,08	0,26

¹Erro padrão da média

²Probabilidade para efeito de tratamento

A dieta com alto teor de CNF no pré-parto propiciou maior extensão da superfície absorviva total do rúmen no pós-parto do que a dieta com baixo teor de CNF (FIGURA 2). Isso demonstra que a dieta de transição com alto teor de grãos é capaz de induzir maior superfície absorviva do rúmen no pós-parto. A maior superfície absorviva tem alta correlação com a capacidade de absorção de AGV (Dirksen et al., 1984; Melo, 2007), sendo importante no controle da

acidose ruminal. A extensão da superfície absorptiva do ruminorretículo é determinada pela quantidade de energia da dieta, portanto dietas diferentes podem induzir diferentes taxas de produção e *clearance* de AGV, podendo então ter potencial diferenciado para a indução do desenvolvimento do epitélio ruminal (Resende Júnior et al., 2006a). Isso pode ser explicado devido a um aumento na disponibilização de AGV para as células epiteliais, uma vez que esses são os principais responsáveis pela indução do crescimento papilar (Sakata & Tamate, 1979).

A área da superfície absorptiva das vacas que ingeriram alto teor de CNF no pré-parto aumentou gradativa e agudamente, das quatro semanas antecedentes ao parto, até as duas semanas após o parto e a partir daí continuou aumentando menos acentuadamente até a sexta semana após o parto. Nesses animais não foi observada a queda de IMS previamente relatada por ocasião do parto (Vazquez-Añon et al., 1994).

A área de superfície absorptiva das vacas que ingeriram baixo teor de CNF no pré-parto se manteve com valores estáveis das seis semanas anteriores ao parto até as quatro semanas após o parto e aí começou a aumentar. Somente por volta de 40 dias após o parto, a superfície absorptiva do rúmen dessas vacas atingiu área semelhante à da superfície absorptiva do rúmen das vacas que ingeriram alto teor de CNF no pré-parto. Esse fato precedeu à equiparação da IMS, que só ocorreu por volta de 60 dias após o parto, indicando o provável controle de acidose ruminal proporcionado pela extensão adequada de superfície absorptiva de AGV ruminal, resultando na normalização da IMS.

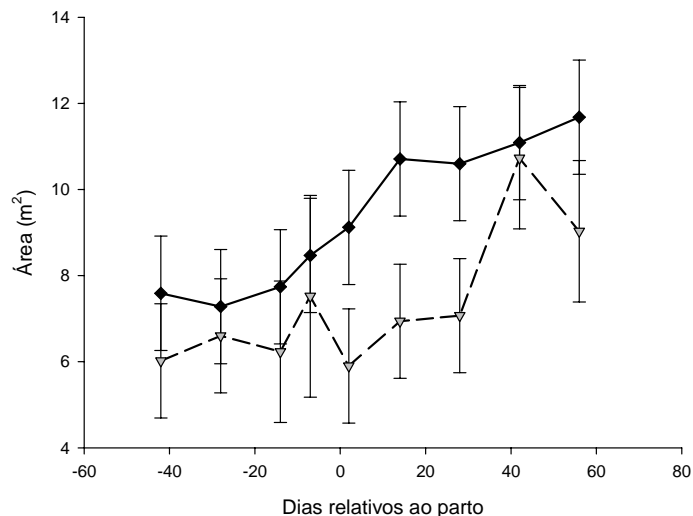


FIGURA 2 Superfície absorptiva do ruminorretículo de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (◆) ou baixo (▼) teor de carboidratos não fibrosos no pré-parto ($P < 0,01$, para efeito de tratamento; $P = 0,08$ para efeito de dia e $P = 0,88$ interação entre dia e tratamento)

A área das papilas ruminais (FIGURA 3), bem como o número de papilas por cm^2 (FIGURA 4), não diferiram entre os tratamentos. No entanto, a área das papilas apresentou um aumento ($P < 0,01$) no período pós-parto. Reynolds et al. (2004) observaram aumento na massa das papilas ruminais 10 dias pós-parto, o que provavelmente reflete o teor de concentrado crescente da ração e o aumento da absorção de AGV. Em outros estudos substituindo cevada por forragem na dieta de vacas leiteiras no final da gestação, objetivando aumentar as concentrações de AGV no rúmen, não foi observado efeito sobre as características das papilas ruminais (Andersen et al., 1999) ou o desempenho lactacional (Ingvarsen et al., 2001).

Estimativas da capacidade de absorção do epitélio ruminal por meio da medida da área e do número de papilas ruminais em um determinado fragmento

do rúmen não tem sido eficientes para detectar o efeito de variações devido à dieta das vacas (Rabelo et al., 2003; Resende Júnior et al., 2006b). Entretanto, a metodologia proposta por Daniel & Resende Júnior (2007), tem se mostrado eficiente para detectar macroscopicamente a proliferação da superfície absorptiva do epitélio ruminal em função de variação na dieta (Melo, 2007).

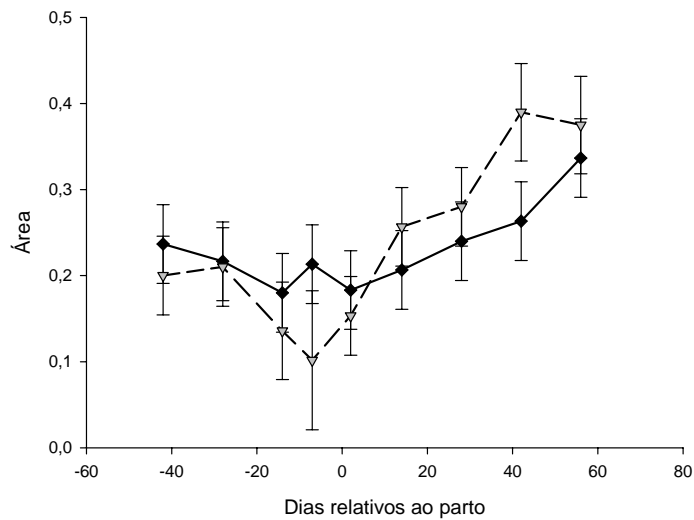


FIGURA 3 Área das papilas do recesso ruminal de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (●) ou baixo (▼) teor de carboidratos não fibrosos no pré-parto ($P = 0,90$, para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de dia e $P = 0,59$ para interação entre tratamento e dia de coleta)

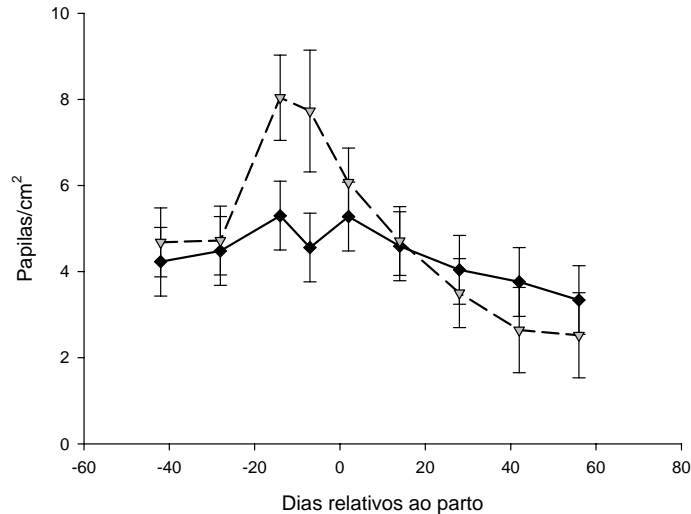


FIGURA 4 Número de papilas por cm^2 em vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (●) ou baixo (▼) teor de carboidratos não fibrosos no pré-parto ($P=0,19$ para efeito de tratamento; $P<0,01$ para efeito de dia da coleta e $P=0,35$ para interação entre tratamento e dia)

O índice mitótico não diferiu ($P=0,22$) entre os tratamentos (FIGURA 5). Nas vacas que ingeriram dieta com alto teor de CNF no pré-parto, foi observado um pico importante do IM nas duas primeiras semanas após o parto, o que poderia estar associado à maior extensão da superfície absorptiva do rúmen detectada nesses animais, mas provavelmente o número de unidades experimentais não foi suficiente para se detectar diferença significativa nessa variável. Numericamente também se observa queda aguda do IM no periparto nos dois tratamentos, o que poderia ser esperado caso houvesse diminuição da IMS nessa ocasião como relatado por Vazquez-Añon et al. (1994). Entretanto, apesar de o presente trabalho não mostrar queda na IMS nas vacas que ingeriram alto teor de CNF no pré-parto, outros fatores fisiológicos poderiam ter influenciado negativamente a proliferação celular no periparto. Apesar de não

ter havido diferença estatística no presente experimento, o IM tem se mostrado eficiente para detectar variações na proliferação do epitélio ruminal em função 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 infusões intrarruminal de acetato e propionato induziram um pico no IM por volta do quarto dia de infusão e queda subsequente na atividade mitótica do epitélio. Como a primeira biopsia após a mudança da dieta de adaptação para as dietas experimentais foi no 14º dia, pode ter ocorrido um aumento no IM neste intervalo com subsequente queda e, portanto, pode não ter sido detectada diferença significativa entre os tratamentos. 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 dezenove.

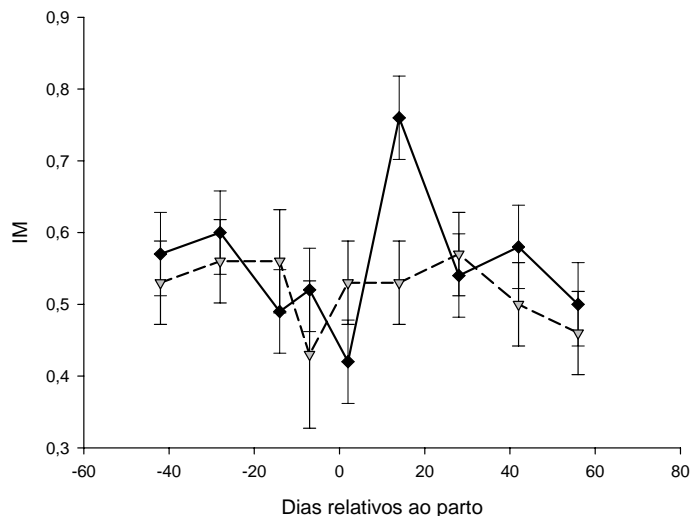


FIGURA 5 Índice mitótico do rúmen de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (●) ou baixo (▼) teor de carboidratos não fibrosos no pré-parto ($P=0,23$, para efeito de tratamento; $P=0,16$ para dia de coleta e $P=0,24$ interação entre tratamento e dia)

O pH do fluido ruminal não foi afetado pelos tratamentos ($P=0,53$). Após o parto ocorreu queda do pH, provavelmente devido aos efeitos da dieta lactacional que apresenta um maior teor de CNF e consequentemente uma maior produção de AGV, já que estes são os maiores determinantes do pH ruminal, devido à sua natureza ácida. Pereira & Armentano (2000), encontraram correlação negativa entre a concentração de AGV e o pH ruminal.

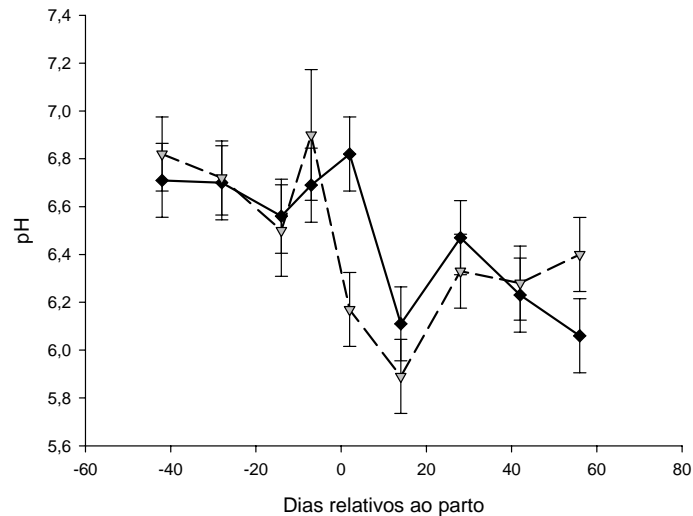


FIGURA 6 pH do fluido ruminal de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (●) ou baixo (▼) teor de carboidratos não-fibrosos no pré-parto ($P=0,53$ para efeito de tratamento, $P<0,01$ para dia de coleta e $P=0,19$ interação entre tratamento e dia de coleta)

A taxa fracional de passagem da fase fluida ruminal para o omaso não diferiu entre os tratamentos ($P=0,33$) (FIGURA 7). De acordo com Voelker & Allen (2003) a taxa fracional de absorção de AGV apresenta correlação positiva com a taxa de passagem. O *clearance* por passagem com a fase fluida para o omaso é principalmente influenciado pela motilidade (Clichlow & Chaplin, 1985) e pelo volume de fluido ruminal (Resende Júnior et al., 2006a).

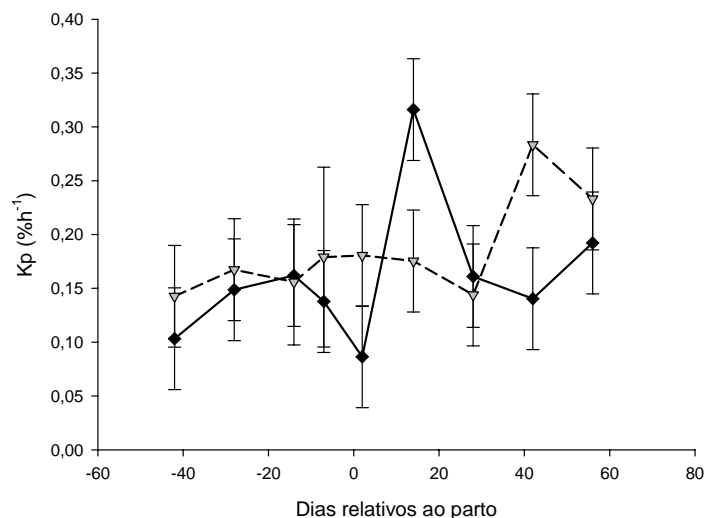


FIGURA 7 Taxa fracional de passagem (Kp) do fluido ruminal, estimadas pela técnica de Cr-EDTA de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (●) ou baixo (▼) teor de carboidratos não-fibrosos no pré-parto ($P=0,33$ para efeito de tratamento; $P=0,20$ para dia de coleta e $P=0,24$ para interação entre tratamento e dia de coleta)

As vacas submetidas ao tratamento com baixo teor de CNF no pré-parto tiveram maior peso da digesta ruminal refletindo o maior peso de líquido ruminal desses animais (TABELA 4). Essa maior quantidade de líquido está associada à dieta com maior teor de FDN o que pode ser indicativo de maior atividade mastigatória, resultando em maior influxo de água para o rúmen por meio da secreção salivar. O teor de matéria seca do conteúdo ruminal, entretanto, foi maior naquelas vacas que consumiram dieta com maior teor de CNF no pré-parto. O periparto foi caracterizado pelo menor peso da digesta refletindo o menor peso do líquido ruminal nos dois tratamentos (FIGURA 8). Isso pode estar associado a algum grau de desidratação pela menor ingestão de água, devido ao stress do periparto, somada à evasão dos fluidos uterinos e alta atividade metabólica. Desidratação está associada à menor taxa de salivação e

consequentemente menor influxo de água para o rúmen. No pós-parto imediato é relatado aumento do volume de digesta ruminal em vacas leiteiras, comparado a fase final da gestação (Dann et al., 1999). Já o estágio de lactação (Hartnell & Satter, 1979) não teve efeito sobre o fluido ruminal e a cinética da digesta. O fluido ruminal e o volume da digesta declinaram com o avanço da gestação (Ingvarstsen et al., 2001). Do final da gestação para o início da lactação foi observado um incremento no volume ruminal (Dann et al., 1999), resultado semelhante ao encontrado no presente experimento.

TABELA 4 Peso vivo (PV), digesta, relação digesta/PV (DPV), matéria seca da digesta (MS) de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (Alto CNF) ou baixo (Baixo CNF) teor de carboidratos não-fibrosos no pré-parto

	Alto CNF	Baixo CNF	EPM¹	P²
PV (kg)	507,61	506,77	12,61	0,96
Digesta (kg)	58,87	64,32	1,61	0,02
DPV (%)	11,73	12,93	0,48	0,09
MS (%)	17,60	14,36	0,88	0,01
MSP (%)	3,53	2,92	0,22	0,06
Sólido (kg)	10,47	9,45	0,74	0,34
SPV (%)	2,06	1,92	0,20	0,61
Líquido (kg)	48,40	54,95	1,22	<0,01
LPV (%)	9,66	10,88	0,36	0,03

PV=peso vivo; DPV=relação digesta/peso vivo; MS= matéria seca da digesta; MSP= relação matéria seca da digesta/peso vivo; SPV= relação sólido da digesta ruminal/peso vivo; LPV relação líquido da digesta/peso vivo

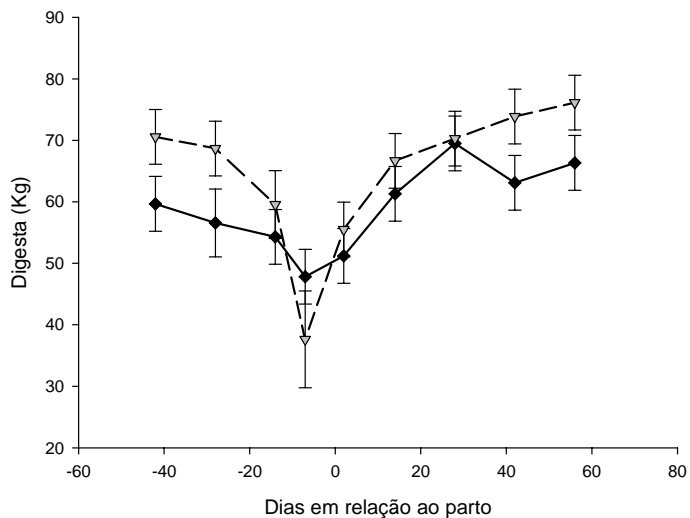


FIGURA 8 Peso da digesta (kg) de vacas leiteiras periparturientes alimentadas com alto (◆) ou baixo (▼) teor de carboidratos não-fibrosos no pré-parto ($P=0,02$, para efeito de tratamento; $P<0,01$ para dia de coleta e $P=0,63$ para interação entre tratamento e dia)

A amplificação das amostras de bactérias apresentou o perfil visto na figura 9. A análise de eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE) demonstra que ocorreu uma variação sutil na diversidade bacteriana entre as amostras. Quando as amostras foram agrupadas de acordo com a faixa de semelhança de padrões pela distância Euclidiana os grupos foram estáveis entre espécies (FIGURA 10) com exceção da amostra correspondente as vacas do tratamento Alto CNF 42 dias antes do parto que apresentou uma maior diferença na população bacteriana do fluido ruminal, no entanto, nesse período todas as vacas se encontravam no período de padronização. Após a instituição das dietas experimentais, que ocorreram 28 dias antes do parto esperado, as alterações na dinâmica populacional bacteriana apresentaram uma pequena distância entre as bandas do DGGE. As vacas que receberam o tratamento Baixo CNF

apresentaram uma maior diferença nos dias 42 e 14 antes do parto e dois dias após o parto.

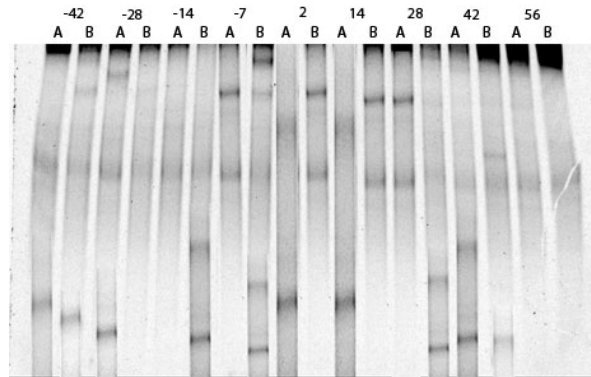


FIGURA 9 Perfil do DGGE das bactérias presentes no fluido ruminal de vacas holandesas periparturientes, submetidas às dietas com alto (A) ou baixo (B) teor de CNF no pré-parto. Dias em relação ao parto -42, -28, -14, -7, 2, 14, 28, 42 e 56

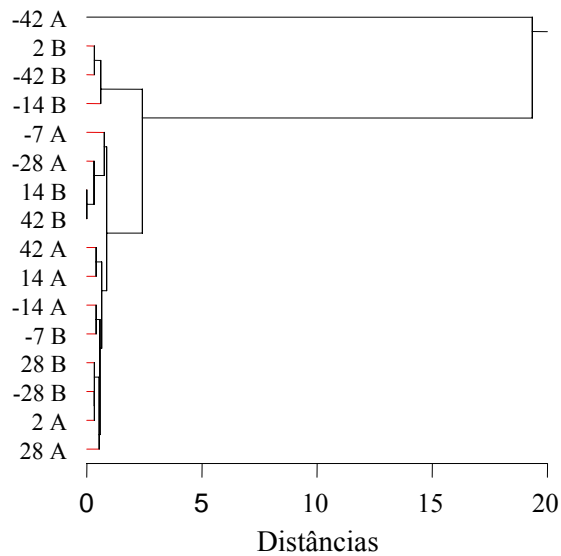


FIGURA 10 Relação entre os padrões de bandas de DGGE, detectadas em amostras de fluido ruminal de vacas leiteiras periparturientes, submetidas a dietas com alto (A) ou baixo (B) teor de CNF no pré-parto. Dias ao parto -42, -28, -14, -7, 2, 14, 28, 42 e 56. A distância métrica corresponde à distância Euclidiana do método de variância mínima

5 CONCLUSÕES

O fornecimento de dieta com elevado teor de CNF no pré-parto pode ser uma boa alternativa no controle da acidose ruminal pós-parto em vacas leiteiras de alta produção, por promover maior desenvolvimento da superfície absorptiva do rúmen evitando o acúmulo de AGV neste compartimento. A maior ingestão de matéria seca e a maior produção leiteira associada à dieta com alto teor de CNF no pré-parto parecem ter sido reflexo de melhores condições morfofisiológicas do rúmen desses animais. A dieta de transição não alterou a diversidade da população microbiana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M. S.; ARMENTANO, L. E.; PEREIRA, M. N.; YING, Y.; XU, J. Method to measure fractional rate of volatile fatty acid absorption from the rumen. In: CONFERENCE ON RUMEN FUNCTION, 25., 2000, Chicago. **Proceedings...** Chicago: University of Chicago, 2000. p. 26.
- ANDERSEN, 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 Agriculturae Scandinavica**, London, v. 49, n. 3, p. 149-155, 1999.
- BALDWIN, R.; JESSE, B. W. Technical note: isolation and characterization of sheep ruminal epithelial cells. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 69, n. 9, p. 3603-3609, Sept. 1991.
- BANKS, W. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- BARKER, I. K.; DREUMEL, A. A. van; PALMER, N. The alimentary system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Ed.). **Pathology of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic, 1995. v. 2, p. 163-173, 747 p.
- BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 63, n. 9, p. 1514-1529, Sept. 1980.
- BEHARKA, A. A.; NAGARAJA, T. G.; MORRILL, J. L.; KENNEDY, G. A.; KLEMM, R. D. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 7, p. 1946-1955, July 1998.
- BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 9, p. 2804-2819, Sept. 1995.
- BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 567-590, 1990.

BINNERTS, W. T.; KLOOSTER, A. T. van; FRENS, A. M. Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. **The Veterinary Record**, London, v. 82, p. 470-472, 1968.

BLAXTER, K. L. Experiments on the use of home grown foods for milk production: II., the effect of feeding concentrated and bulky foods before calving on subsequent milk production. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 34, p. 27-28, 1944.

BOUTFLOUR, R. B. Limiting factors in the feeding and management of milk cows. In: WORLD'S DAIRY CONGRESS, 8., 1928, London. **Proceedings...** London: International Dairy Federation, 1928. p. 15-20.

COSTA, S. F.; PEREIRA, M. N.; MELO, L. Q.; RESENDE JUNIOR, J. C.; CHAVES, M. L. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros: I., aspectos histológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 1-9, jan./fev. 2008.

COTTA, M. A.; HESPEL, R. B. Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. In: MILLIGAN, L. P.; GROVUM, W. L.; DOBSON, A. (Ed.). **Control of digestion and metabolism in ruminants**. New Jersey: Prentice Hall, 1986. p. 122-136.

CRICHLow, E. C.; CHAPLIN, R. K. Ruminal lactic acidosis: relationship of forestomach motility to nondissociated volatile fatty acids levels. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, n. 9, p. 1908-1911, Sept. 1985.

DANIEL, J. L. P.; RESENDE JÚNIOR, J. C. **Morphofisiologic evaluation of absorption and metabolism of volatile fatty acids by bovine forestomach**. San Antonio: ADSA, 2007. 30 p.

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, 2006.

DANN, H. M.; VARGA, G. A.; PUTNAM, D. E. Improving energy supply to late gestation and early postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 1765-1778, Aug. 1999.

DELLMANN, H. D.; EURELL, J. A. **Textbook of veterinary histology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. 380 p.

DIJKSTRA, J. 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, Apr. 1993.

DIRKSEN, G.; LIEBICH, H. G.; BROSI, G.; HAGEMEISTER, H.; MAYER, E. Morphologie der pansenschleimhaut und fettsäureresorption beim rind-bedeutende faktoren für gesunkheit und leistung. **Zentralblatt für Veterinar Medizin**, Berlin, v. 31, n. 7, p. 414-430, July 1984.

DRACKLEY, J. K.; DANN, H. M.; DOUGLAS, G. N.; JANOVICK-GURETZKY, N. A.; LITHERLAND, N. B.; UNDERWOOD, J. P.; LOOR, J. J. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. **Italian Journal of Animal Science**, Pavia, v. 4, n. 2, p. 323-344, 2005.

DRACKLEY, J. K.; OVERTON, T. R.; DOUGLAS, G. N. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 100-112, 2001. Supplement.

ELLIOT, J. P.; DRACKLEY, J. K.; FAHEY, G. C.; SHANKS, R. D. Utilization of supplemental fat by dairy cows fed diets varying in content of nonstructural carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, n. 7, p. 1512-1525, July 1995.

FRANCE, J.; SIDDON, R. C. Volatile fatty acid production. In: FORBES, J. M. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Wallingford: CAB International, 1993. chap. 5, p. 107-121.

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

GÄBEL, G.; MAREK, M.; MARTENS, H. Influence of food deprivation on SCFA and electrolytes transport across sheep reticulorumen. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 40, n. 5, p. 339-341, Sept. 1993.

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

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

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

GILL, M. R. C.; SIDDON, D. E.; BEEVER, D. E.; ROWE, J. B. Metabolism of lactic acid isomers in the rumen of silage-fed sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 55, n. 2, p. 399-400, 1986.

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

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

GRAVERT, H. O. Breeding of dairy cattle. In: _____. **Dairy cattle production**. New York: Elsevier Science, 1987. p. 35-76.

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

GRUMMER, R. R.; KULICK, A. Alto teor de forragem ou alto teor de grãos para vacas no período de transição pré-parto? In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 10., 2005, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2005. p. 71-78.

GUO, J.; PETERS, R. R.; KOHN, R. A. Effect of a transition diet on production performance and metabolism in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 11, p. 5247-5258, Nov. 2007.

HARTNELL, G. F.; SATTER, L. D. Determination of rumen fill, retention time and ruminal turnover rates of ingesta at different stages of lactation in dairy cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 48, n. 2, p. 381-392, Feb. 1979.

HAYIRLI, A.; GRUMMER, R. R.; NORDHEIM, E. V.; CRUMP, P. M. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in holsteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 12, p. 3430-3443, Dec. 2002.

HENRIKSON, R. C. Ultrastructure of ovine ruminal epithelium and localization of sodium in the tissue. **Journal of Ultra Structure Research**, San Diego, v. 30, n. 3/4, p. 385-386, 1970.

HOLCOMB, C. S.; HORN, H. H. van; HEAD, H. H.; HALL, M. B.; WILCOX, C. J. Effects of prepartum dry matter intake and forage percentage on postpartum performance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 9, p. 2051-2058, Sept. 2001.

INGVARSTEN, K. L.; AAES, O.; ANDERSEN, J. B. Effects of pattern of concentrate allocation in the dry period and early lactation on feed intake and lactation performance in dairy cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 207-221, Feb. 2001.

KLEEN, J. L.; HOOIJER, G. A.; REHAGE, J.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. **Journal of Veterinary Medicine A**, Berlin, v. 50, n. 8, p. 406-414, Aug. 2003.

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

KUNZ, P. L.; BLUM, J. W.; HART, I. C.; BICKEL, H.; LANDIS, J. Effects of different energy intakes before and after calving on food-intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. **Animal Production**, Edinburgh, v. 40, n. 1, p. 219-231, Jan. 1985.

LAVKER, R. M.; CHALUPA, W.; DICKEY, J. F. An electron microscopic investigation of rumen mucosa. **Journal of Ultrastructure Research**, San Diego, v. 28, n. 1/2, p. 1-12, 1969.

LAVKER, R. M.; MALTOLTSY, A. G. The fate of cell organelles and differentiation products in ruminal epithelium. **Journal Cell Biology**, New York, v. 44, p. 501-505, 1970.

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

McEWAN, N. R.; ABECIA, L.; REGENSBOGEVA, M.; ADAM, C. L.; FINDLAY, P. A.; NEWBOLD, C. J. Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 97-101, Jan. 2005.

McGAVIN, M. D.; MORRIL, J. L. Scanning electron microscopy of ruminal papillae in calves fed various amounts and forms of roughage. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 37, n. 5, p. 497-508, 1976.

MELO, L. Q. **Morfometria ruminal e o efeito do pH e do volume da digesta sobre a absorção de ácidos graxos voláteis**. 2007. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, n. 1, p. 335-350, Jan. 1987.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 127-141, Jan. 1998.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction: amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar. 1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washington, 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 domestic mammals**. Berlin: V.P. Parey, 1981. v. 3, 610 p.

NOCEK, J. E. Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 5, p. 1005-1028, May 1997.

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.

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

PETTERSON, J. A.; DUNSHEA, F. R.; EHRHARDT, R. A.; BELL, A. W. Pregnancy and undernutrition alter glucose metabolic responses to insulin in sheep. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 7, p. 1286-1295, July 1993.

PETTERSON, J. A.; SLEPETIS, R.; EHRHARDT, R. A.; DUNSHEA, F. R.; BELL, A. W. Pregnancy but not moderate undernutrition attenuates insulin suppression of fat mobilization in sheep. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 12, p. 2431-2442, Dec. 1994.

PULLEN, D. L.; PALMQUIST, D. L.; EMERY, R. S. Effect of days of lactation and methionine hydroxy analog on incorporation of plasma fatty acids into plasma triglycerides. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 6, p. 49-58, June 1989.

RABELO, E.; REZENDE, R. L.; BERTICS, S. J.; GRUMMER, R. R. Effects of transition diets varying in dietary energy density on lactation performance and ruminal parameters of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 3, p. 916-925, Mar. 2003.

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

REYNOLDS, C. K.; AIKMAN, P. C.; LUPOLI, B.; HUMPHRIES, D. J.; BEEVER, D. E. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 1201-1217, Apr. 2003.

REYNOLDS, C. K.; DURST, B.; LUPOLI, B.; HUMPHRIES, D. J.; BEEVER, D. E. Visceral tissue mass and rumen volume in dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 4, p. 961-971, Apr. 2004.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: MELLO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. (Ed.). **Genética e melhoramento de microrganismos**. São Paulo: USP, 2002. p. 97-128.

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

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

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

SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 61, n. 8, p. 1109-1113, Aug. 1978.

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

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, v. 60, n. 3, p. 682-690, maio/jun. 2008.

SCHNORR, B.; VOLLMERHAUS, B. Das oberflächenrelief der pansenschleimhaut bei rind und ziege: erste mitteilung zur funktionellen morphologie der vormagen der hauswiederkauer. **Zentralblatt Für Veterinar Medizin**, Berlin, v. 14, n. 1, p. 93-95, 1967.

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. 1999.

SOEST, P. J. van; ROBERTSON, J. B.; LEW, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, Oct. 1991.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE. **SAS/STAT guide**. Cary, 1996. 117 p.

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

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

SUN, Y. Z.; MAO, S. Y.; YAO, W.; ZHU, W. Y. The dynamics of microorganism populations and fermentation characters of co-cultures of rumen fungi and cellulolytic bacteria on different substrates. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, Beijing, v. 4, n. 3, p. 422-426, Sept. 2006.

SUTTON, J. D.; MCGILLIARD, A. D.; JACOBSON, N. L. Functional development of rumen mucosa: I., absorptive ability. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 46, n. 6, p. 426-436, June 1963.

TAMATE, H.; KIKUCHI, T. Electron microscopy study on parakeratotic ruminal epithelium in beef cattle. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Hokkaido, v. 40, n. 1, p. 21-23, 1978.

TUCKER, H. A. Endocrine and neural control of the mammary gland. In: LARSON, B. L. (Ed.). **Lactation**. Ames: Iowa State University, 1985. p. 39-40.

VANDEHAAR, M. J.; YOUSIF, G.; SHARMA, B. K.; HERDT, T. H.; EMERY, R. S.; ALLEN, M. S.; LIESMAN, J. S. Effect of energy and protein density of prepartum diets on fat and protein metabolism of dairy cattle in the periparturiente period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 6, p. 1282-1295, June 1999.

VAZQUEZ-AÑÓN, M.; BERTICS, S. J.; LUCK, M.; GRUMMER, R. R. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 9, p. 1521-1528, Sept. 1994.

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