



**EFEITO DA FREQUÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO  
CONCENTRADA SOBRE A MORFOLOGIA DAS  
PAPILAS DO RÚMEN**

**JOÃO CHRYSOSTOMO DE RESENDE JÚNIOR**

**1999**

JOÃO CHRYSOSTOMO DE RESENDE JÚNIOR

**EFEITO DA FREQUÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO CONCENTRADA  
SOBRE A MORFOLOGIA DAS PÁPILAS DO RÚMEN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal – Bovinos Leiteiros, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Marcos Neves Pereira

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

1999

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

Resende Júnior, João Chrysostomo de

Efeito da frequência de alimentação concentrada sobre a morfologia das papilas do rúmen / João Chrysostomo de Resende Júnior. – Lavras: UFLA, 1999.

67 p. : il.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Acidose. 2. Insulina. 3. Papila. 4. Rúmen. 5. Epitélio. 6. Índice mitótico. 7. PH. 8. Alimentação concentrada. 9. Dieta de transição. 10. Morfologia. 11. Gado leiteiro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

8101  
CDD-636.20855

ASSINATURA  
Data: 10/01/99  
BIBLIOTECA  
-636.2142

**JOÃO CHRYSOSTOMO DE RESENDE JÚNIOR**

**EFEITO DA FREQUÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO CONCENTRADA  
SOBRE A MORFOLOGIA DAS PÁPILAS DO RÚMEN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal – Bovinos Leiteiros, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 04 de maio de 1999

Prof. José Camisão de Sousa - UFLA

Prof. Júlio Sílvio de Sousa Bueno Filho - UFLA

Prof. Suely de Fátima Costa – UFLA

  
Prof. Marcos Neves Pereira - UFLA

(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

*Dedico o presente trabalho à memória de meu falecido pai, João Chrysostomo de Resende, que apesar dos poucos anos de nossa convivência, me direcionou no caminho do trabalho honesto e me incentivou a embrenhar-me nas veredas do conhecimento. Deus esteja em sua companhia.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me conceder a vida e com ela a oportunidade e capacidade de elaborar este trabalho.

Ao Professor Marcos Neves Pereira, que demonstrou enorme capacidade, disposição e paciência em me orientar. Minha sincera gratidão e admiração.

A realização deste trabalho seria impossível, não fosse a valiosa colaboração do estudante de Medicina Veterinária Edmarcos Corrêa Oliveira e da Ms. Maria Gabriela Rocca Magallanes.

Colaboração prestimosa obtive também do técnico em histologia Wesley de Andrade Vilela, dos Zootecnistas Paulo Gallo e Gabriela Arruda Caestine, das estudantes Mariana Santos e Paula Alessandra de Fillipo, dos Professores Luciano da Silva Alonso, José Camisão de Sousa, Suely de Fátima Costa e Lisete Chamma Davide.

Ao Professor Luiz Carlos Oliveira Lima e Eduardo Valério de Barros Vilas Boas do DCA/UFLA e ao Dr. José Alair Couto do Laboratório Santa Cecília, pelo desprendimento na cessão de seus laboratórios.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste.

Ao Grande Amigo, Professor Henrique Ribeiro Alves de Resende, pelo incentivo ao meu ingresso na vida acadêmica e apoio irrestrito.

À minha Mãe Dona Zutinha e irmãs (Lilinha, Marília, Isa, Márcia e Maria Ester) e suas respectivas famílias, pelo apoio e incentivo ao longo destes anos.

Não tenho palavras para expressar minha gratidão à minha esposa Adriana e aos meus filhos Mariana e Matheus, por seu amor desprendido e pela paciência em face às infinitas horas de ausência e inúmeras dificuldades impostas no decorrer do presente. Tenham certeza de que são vocês a razão principal de todo o meu trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
2.1 Desenvolvimento das papilas do rúmen.....	7
2.2 Desenvolvimento papilar e absorção de AGV.....	21
2.3 Divisão celular e desenvolvimento do epitélio.....	22
2.4 Hipóteses.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Período de padronização.....	27
3.3 Período de comparação.....	27
3.4 Tratamentos.....	28
3.5 Período de jejum.....	28
3.6 Estimativa do consumo.....	28
3.7 Coleta de dados.....	29
3.8 Amostras de sangue.....	29
3.9 Amostras de fluido ruminal.....	30
3.10 Biópsias de papilas.....	30
3.11 Digitalização das imagens.....	31
3.12 Preparações histológicas.....	35
3.13 Mensurações macroscópicas.....	36
3.14 Dosagens de insulina plasmática.....	37
3.15 Determinação do índice mitótico.....	40
3.16 Análises estatísticas.....	40

3.16.1 Consumo .....	45
3.16.2 Insulina plasmática, pH ruminal e papilas .....	45
3.17 Locais de realização do trabalho .....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
5 CONCLUSÃO .....	61
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62



## RESUMO

RESENDE JÚNIOR, João Chrysostomo de. **Efeito da Frequência de Alimentação Concentrada Sobre a Morfologia das Papilas do Rúmen.** Lavras: UFLA, 1999. 67 p (Dissertação – Mestrado em Zootecnia)\*

A manipulação das dimensões das papilas do rúmen pode ser uma estratégia para aumentar a capacidade de absorção do epitélio ruminal e controlar acidose em vacas leiteiras. A insulina é um plausível mediador do crescimento das papilas do rúmen. Variação na concentração de insulina plasmática foi induzida fornecendo-se concentrado 1 ou 4 vezes ao dia a 7 vacas Holandesas e Jersey não lactantes. Durante um período de padronização de 7 dias as vacas receberam apenas forragem. No período de comparação de 19 dias, receberam feno *ad libitum* e concentrado à base de milho em quantidade correspondente a 0,5% do peso corporal. No vigésimo dia, iniciou-se um período de jejum, simulando a depressão de consumo que ocorre em torno do parto. No sétimo dia do período de padronização e nos dias 4, 12 e 19 do período de comparação, 12 papilas ruminais foram coletadas por biópsia do saco cranial do rúmen. Papilas foram também coletadas às 24, 48 e 72 horas após o início do jejum. Amostras de fluido ruminal e sangue foram obtidas nos tempos 0, 90, 180 e 360 minutos após a alimentação em cada dia de biópsia. As amostras do sétimo dia do período de padronização foram usadas como covariável no modelo para análise estatística. O pH do rúmen caiu e a concentração de insulina plasmática aumentou entre zero e 360 minutos após alimentação nas vacas recebendo concentrado 1 vez ao dia e foram constantes nas vacas recebendo-o 4 vezes ao dia ( $P < 0,02$  para a interação entre tratamento e tempo de amostragem). O tamanho das papilas não foi afetado pela frequência de alimentação concentrada ( $P > 0,22$ ). Entretanto, a porcentagem de células em mitose na camada basal do epitélio ruminal foi maior em vacas comendo concentrado uma vez ao dia ( $P = 0,03$ ). No jejum, a queda de insulina e aumento no pH ruminal foram associados à queda no índice mitótico e no tamanho das papilas. A variação na frequência de alimentação concentrada merece consideração como maneira de manipular a morfologia das papilas do rúmen.

Comitê Orientador: Marcos Neves Pereira - UFLA (Orientador), José Camisão de Sousa - UFLA e Aloísio Ricardo Pereira da Silva - UFLA.

## ABSTRACT

RESENDE JÚNIOR, João Chrysostomo de. **Effect of the Frequency of Concentrate Feeding on Rumen Papillae Morphology.** Lavras: UFLA, 1999. 67 p (Dissertation – Master Program in Animal Science).

Manipulation of rumen papillae size may be a promising strategy to control ruminal acidosis in dairy cows. Insulin is a plausible mediator of rumen papillae growth. We induced variation in plasma insulin levels by feeding concentrate to 7 non-lactating, rumen-fistulated Holstein and Jersey cows either once or four times a day. Cows were fed for 19 days on a grass hay diet supplemented with 0.5% of body weight of a corn based concentrate, following a 7-day standardization period on a 100% forage diet. On day 7 of the standardization period 12 papillae were biopsied from the cranial sac of the rumen to be used as covariate in the model for analysis of variance. Papillae were also biopsied on days 4, 12, and 19 of the comparison period. On day 20 cows were fasted for 72 hours to simulate a period of intake depression. Papillae were biopsied 24, 48 and 72 hours after onset of the fasting period. Rumen fluid and blood samples were obtained at 0, 1.5, 3, and 6 hours post-feeding at each biopsy day. Over time rumen pH decreased and insulin increased in cows fed concentrate once a day and did not change in cows fed 4 times a day ( $P < .02$  for the interaction of treatment and sampling time). Papillae size, measured as area over length, was not affected by treatment ( $P = .52$ ) and was smaller on day 4 ( $P = < .001$  for the sampling day effect). However, the percentage of cells undergoing mitosis in the basal layer of the epithelium was greater for cows fed once a day ( $P = .03$ ). Fasting acutely decreased rumen epithelium mitotic index and plasma insulin and increased rumen pH ( $P < .001$  for the sampling day effect). Although frequency of concentrate feeding had no effect on rumen papillae macroscopy, the lower frequency of grain feeding increased epithelial cell proliferation. Frequency of concentrate feeding may be used to regulate rumen papillae absorptive capacity.

Graduate Committee: Marcos Neves Pereira - UFLA (Major Professor), José Camisão de Sousa - UFLA e Aloísio Ricardo Pereira da Silva – UFLA

## 1 INTRODUÇÃO

O estômago de animais ruminantes é constituído de quatro câmaras distintas. A parte aglandular é denominada pró-ventrículo e é formada pelo rúmen, retículo e omaso. A glandular é constituída pelo abomaso ou estômago verdadeiro. Os compartimentos do pró-ventrículo funcionam como câmaras de fermentação, fundamentais para o desempenho da perfeita fisiologia do ruminante. Nestas câmaras, carboidratos dietéticos são fermentados por ação dos microorganismos, gerando, como um dos produtos finais, os ácidos graxos voláteis (AGV).

O rúmen é o maior compartimento do pró-ventrículo e o controle da sua capacidade de absorção e metabolização dos AGV é fundamental em ruminantes de interesse econômico, principalmente bovinos leiteiros. Nestes animais, a alta demanda nutricional para lactação exige dietas altamente energéticas introduzidas logo após o parto. Estas dietas, ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen, levam à alta produção de AGV, podendo desencadear a ocorrência de acidose ruminal, caso a parede do órgão não esteja devidamente capacitada em absorver estes AGV (Dirksen et al., 1984). Acidose ruminal pode afetar negativamente o desempenho e a saúde animal através de efeitos deletérios sobre a motilidade do rúmen (Crichlow & Chaplin, 1985; Leek & Harding, 1975), a fermentação da fibra (Grant & Mertens, 1992), o consumo de alimentos (Elliot et al, 1995) e a morfologia da parede ruminal.

A parede do rúmen apresenta quatro túnicas denominadas, no sentido da cavidade abdominal para o lúmen ruminal, serosa, muscular, submucosa e mucosa (Figura 1). O desenvolvimento dos componentes estruturais da parede do rúmen está relacionado à dieta ingerida (Sutton, McGilliard, Jacobson, 1962).

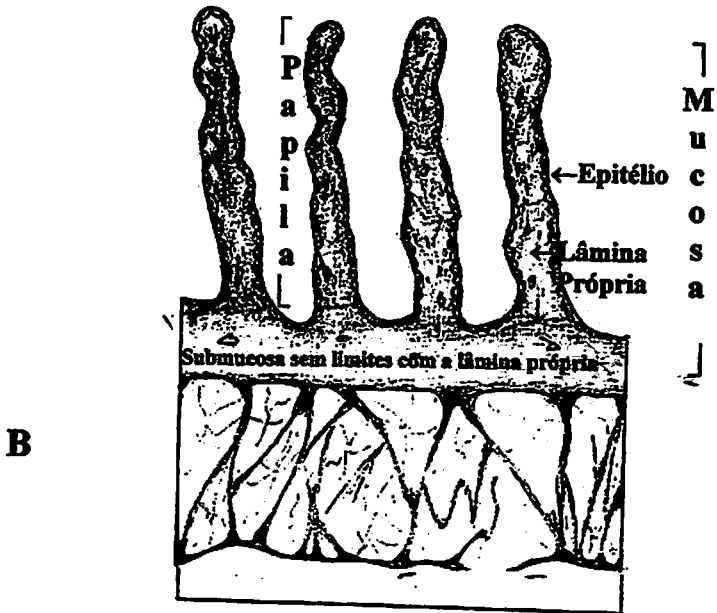
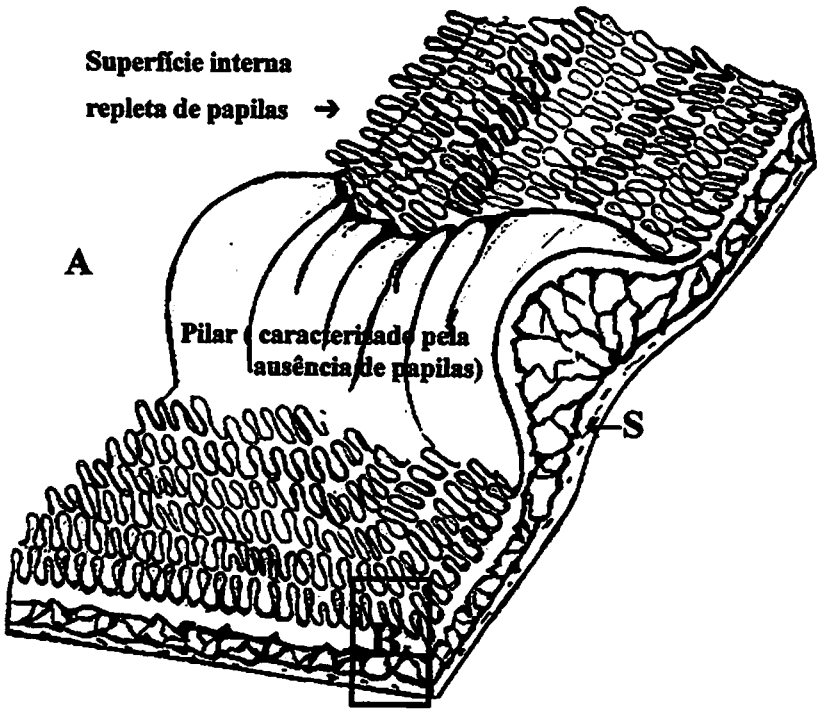


FIGURA 1: Desenho esquemático tridimensional (A) e transversal (B) da parede do rúmen.

O trabalho físico de motilidade do trato digestivo é responsável pelo desenvolvimento da túnica muscular, enquanto as células epiteliais da mucosa requerem a presença de AGV para sua proliferação (Browlee,1956; Sander,1959; Tamate et al.,1962 ).

A túnica mucosa desempenha um papel fundamental na absorção e metabolização dos AGV (Sutton, Mcgilliard, Jacobson,1962; Dirksen et al.,1984; Gaebel et al.,1987) . A mucosa morfológicamente é constituída pelo epitélio apoiado em uma membrana basal e lâmina própria. No epitélio estão presentes as células responsáveis pela absorção e metabolização dos AGV, bem como a camada queratinizada que desempenha uma importante função protetora deste epitélio (Lavker, Chalupa, Dickey, 1969). A lâmina própria é formada por tecido conjuntivo e nela estão presentes os capilares sangüíneos que levam nutrientes às células e recebem os produtos por elas absorvidos e metabolizados (Schnorr e Vollmerhaus,1968). A parede do rúmen apresenta inúmeras projeções da mucosa, denominadas papilas ruminais, que aumentam a superfície de absorção do órgão. O tamanho e a forma das papilas varia de acordo com a localização no rúmen (Henrikson, 1970; Schnorr e Vollmerhaus, 1968). O tamanho das papilas ruminais está correlacionado à proliferação do epitélio ruminal (Bullough,1972; Sakata e Tamate,1974; Goodlad,1981), bem como ao fluxo sangüíneo para o órgão (Tamate, Kikuchi e Sakata,1974).

O epitélio ruminal é do tipo estratificado pavimentoso queratinizado (Figura 2), 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

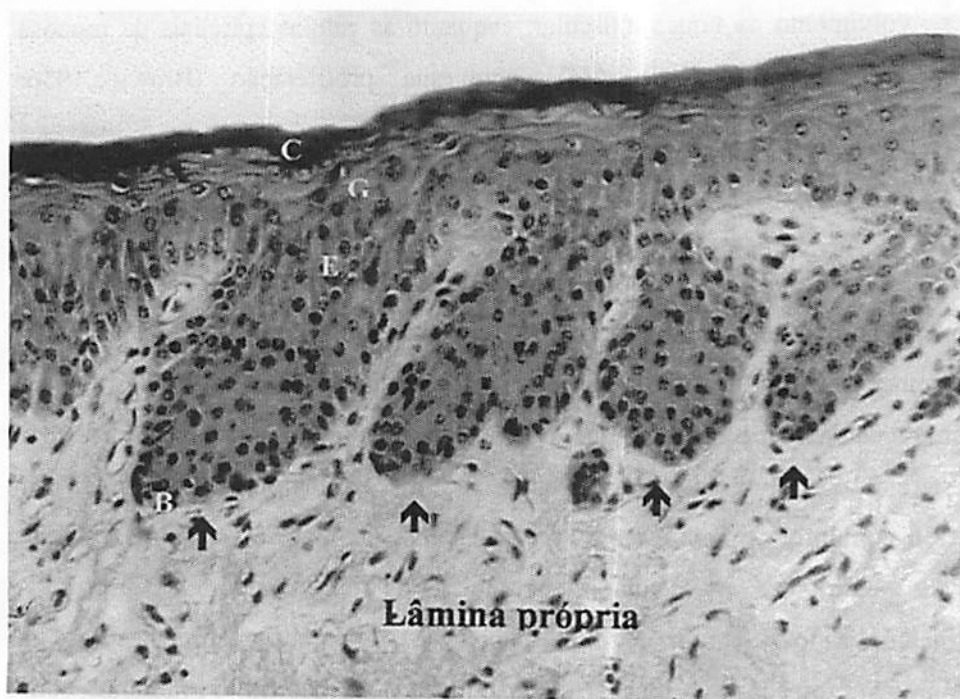


FIGURA 2: Corte longitudinal de parte da papila do rúmen. Note as diversas camadas do epitélio estratificado pavimentoso queratinizado (B = camada basal; E = camada espinhosa; G = camada granulosa; C = camada córnea) e as cunhas epiteliais (setas). Coloração pela hematoxilina eosina (HE). 128X.

diferenciação e migram para as demais camadas do epitélio até alcançar a camada córnea e descamar para dentro do lúmen ruminal (Lavker e Matoltsy,1970). O epitélio apresenta projeções em direção à lâmina própria, denominadas cunhas epiteliais (figura 2).

~~X~~ O crescimento das papilas ruminais parece estar diretamente correlacionado à capacidade absorptiva do rúmen (Sutton, Mcgilliard, Jacobson,1962; Dirksen et al.,1984; Gaebel et al.,1987) e requer a presença de AGV, porém o exato mecanismo desencadeador do processo ainda é desconhecido. O butirato, um dos AGV produzidos no rúmen, é inibidor de crescimento celular *in vitro* (Gálfi et al., 1981; Gálfi, Neogrády, Kutas, 1986) e *in vivo* quando permanece continuamente em contato com o epitélio ruminal (Gálfi, Neogrády, Kutas, 1986). Em contrapartida, picos agudos de AGV são estimuladores de proliferação epitelial *in vivo* (Sakata e Tamate, 1978a; Sakata e Tamate, 1979), sendo provável a existência de mediadores no mecanismo de regulação do desenvolvimento papilar. A insulina, que é um hormônio produzido pelo pâncreas, é estimuladora de proliferação celular *in vitro* e pode estar envolvida na mediação do efeito trófico dos AGV *in vivo* (Sakata et al.,1980). Os AGV estimulam a liberação de insulina pelo pâncreas *in vitro* (Mans, Boda, Willes, 1967) e *in vivo* (Sano et al 1995a e Sano et al., 1995b). A variação na concentração de AGV no rúmen, que pode ser determinada pela frequência alimentar, parece influenciar o estímulo do crescimento papilar. Infusões intraruminais de AGV apenas uma vez ao dia foram mais eficientes na indução de proliferação do epitélio do que infusões contínuas na mesma quantidade (Sakata e Tamate, 1978a; Sakata e Tamate,1979).

No rúmen, a quantidade total de AGV, e de cada ácido em separado, muda bruscamente quando a frequência de alimentação é reduzida (Knox e Ward,1961). O propilenoglicol, que é um composto glicogênico , administrado uma vez ao dia, puro ou misturado ao concentrado, foi mais eficiente em

aumentar os níveis séricos de insulina, do que quando fornecido como parte de uma ração total administrada continuamente a vacas não lactantes (Christensen, et al.,1997).

Estratégias alimentares objetivando promover a proliferação do epitélio ruminal antes do parto poderiam melhorar a capacidade de absorção do órgão, reduzindo a incidência de acidose ruminal quando dietas ricas em carboidratos prontamente fermentáveis fossem fornecidas no início da lactação. O fornecimento de concentrado em baixa frequência diária pode ser mais eficiente em estimular o crescimento papilar do que a administração do mesmo como parte de uma dieta completa fornecida continuamente aos animais. Entretanto, se a presença de AGV estimula a proliferação epitelial, sua ausência ou menor quantidade pode levar à involução do epitélio. Vacas no período peri-parto sofrem diminuição acentuada no consumo de matéria seca (Vazquez-Añon et al,1994) , o que poderia contrapor medidas alimentares adotadas no pré parto visando adaptar o epitélio à dietas ricas em grãos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da frequência de alimentação concentrada e do jejum sobre o índice mitótico da camada basal do epitélio do rúmen , as dimensões macroscópicas das papilas, o pH ruminal e a concentração de insulina plasmática em vacas não lactantes. Com este intuito, simulou-se o que ocorreria em uma dieta de transição de vacas leiteiras recebendo concentrado em uma alimentação diária ou continuamente ao longo do dia. Simulou-se, ainda, a redução de consumo observada na época do parto.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Desenvolvimento das papilas do rúmen

Desde meados da década de 50, pesquisadores vêm tentando demonstrar o mecanismo pelo qual o estômago dos ruminantes se desenvolve morfo-fisiologicamente. Alguns autores concluíram, logo nas primeiras pesquisas, que o desenvolvimento da musculatura do pró-ventrículo era independente do desenvolvimento do epitélio (Brownlee, 1956; Sander et al, 1959; Tamate et al., 1962). Substâncias não fermentáveis foram efetivas em estimular o desenvolvimento muscular do rúmen de novilhas leiteiras (Harrison et al., 1960). Esponjas plásticas introduzidas no rúmen de bezerros aumentaram a capacidade do órgão por promoverem desenvolvimento da musculatura lisa (Tamate et al, 1962).

Demonstrou-se que o grau de desenvolvimento das papilas do rúmen foi provavelmente determinado pelo teor de energia da dieta, ou pela velocidade com que a dieta era quebrada em frações absorvíveis (Brownlee, 1956). Dieta completamente peletizada contendo 50% de grão e 50% de forragem resultou em bom crescimento papilar em carneiros (Thompson, Kintner, Pfander, 1958). 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 recebendo butirato ou propionato de sódio intraruminalmente apresentaram extenso desenvolvimento papilar (Sander et al, 1959). Tamate et al. (1962) constataram evolução no desenvolvimento papilar, entre o nascimento e as 12 semanas de idade, em bezerros holandeses alimentados com leite, feno e concentrado. Em contrapartida, animais alimentados apenas com leite tiveram diminuição no

tamanho de papilas do rúmen no mesmo período. No mesmo experimento, observou-se também que a dose de AGV era importante para estimulação do crescimento papilar. A infusão de AGV no rúmen de bezerros alimentados apenas com leite foi eficiente na promoção do desenvolvimento papilar quando a dose diária foi 61 e 43 mol de ácido butírico e propiônico, respectivamente. Entretanto, a dosagem diária de 30 mol não estimulou o desenvolvimento de papilas durante período experimental de 8 semanas.

Apesar das evidências que infusões de AGV estimulavam o crescimento papilar, nenhuma comprovação histológica deste fato havia sido realizada. Em vista disto, Sakata e Tamate (1976) submeteram dois carneiros machos adultos a um experimento com três ensaios. No período experimental, os animais ficaram em jejum com água e minerais *ad libitum*. O carneiro A – recebeu infusão intraruminal de 500 ml de butirato de sódio a 10% através de fistula e o carneiro B – controle recebeu 500 ml de solução salina. No ensaio 1, as infusões foram feitas 1 vez ao dia por 5 dias. Nos ensaios 2 e 3, estas foram feitas por sete dias. As papilas foram coletadas por biópsia diariamente antes da infusão. Foram também coletadas 24 horas após a última infusão em cada ensaio. O índice mitótico do epitélio ruminal foi estimado dividindo-se o número de núcleos de células basais mostrando figuras mitóticas, pelo número total de núcleos das células basais contados. Houve estimulação do índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen do carneiro A em todos os ensaios. No ensaio 1, isto ocorreu no dia 4 e 5 após o início das infusões. No ensaio 2, a estimulação foi notada já no dia 2, permanecendo também no dia 3 e 4. No ensaio 3, o aumento no índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen foi percebido no dia 5, permanecendo no dia 6 e 7. Em nenhum dos ensaios houve estimulação do índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen do carneiro B.

Para avaliar o efeito da frequência alimentar sobre o epitélio ruminal, Sakata e Tamate (1974) alimentaram dois carneiros com dietas contendo a mesma relação forragem : concentrado em duas frequências diárias. Um carneiro foi alimentado às 9:00 h e às 11:00 h no primeiro dia, seguido por dois dias de jejum, repetindo-se esta seqüência por três vezes num total de 9 dias. O outro carneiro recebeu todo o alimento do dia às 9:00 h, por 9 dias consecutivos. Os dois carneiros foram também alimentados às 9:00 h no décimo dia. Papilas ruminais foram coletadas por biópsia da parede lateral direita do saco ventral do rúmen às 6:00 , 24:00 e 48:00 h após a alimentação do 9º dia. O índice mitótico das células basais do epitélio ruminal foi significativamente mais alto nas amostras oriundas do carneiro alimentado intermitentemente do que no carneiro que vinha sido alimentado diariamente, 1 vez ao dia, nas amostras tomadas 24 e 48 horas após alimentação. Em outro experimento, Tamate, Kikuchi e Sakata (1974) trabalharam com um carneiro adulto com fistula ruminal. Alimentaram o animal 1 vez ao dia com uma dieta convencional durante vários dias e depois submeteram-no a 3 dias de jejum, realimentando-o com a mesma dieta no terceiro dia. Coletaram papilas no período anterior ao jejum, aos 30 minutos antes da realimentação e às 6 e 23 horas após a realimentação. O índice mitótico da camada basal do epitélio ruminal foi de 1,23% no período anterior ao jejum. Após três dias de jejum, foi 0,11% . O índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen só retornou ao patamar observado anteriormente ao jejum na amostra coletada 24 horas após a realimentação.

Pesquisadores especularam que a maior eficiência de baixa frequência alimentar em estimular a proliferação do epitélio ruminal seria resultante de uma variação brusca na taxa de produção intraruminal de AGV. O período em que os animais passavam sem alimento reduzia a produção de AGV, havendo um aumento súbito quando os animais eram realimentados. Em contrapartida, a produção contínua, resultante da alimentação freqüente, não era capaz de

estimular a proliferação nos mesmos níveis. Sendo assim, Sakata e Tamate (1978a) delinearão outro experimento onde usaram 2 pares de carneiros adultos, com fistulas ruminais, em quatro ensaios diferentes. Em cada um dos ensaios, submeteram os animais a um período pré experimental de pelo menos 2 semanas, no qual os animais eram alimentados, para suprir a manutenção, com feno e concentrado fornecidos uma vez ao dia, e a um período experimental no qual os animais recebiam apenas água e minerais. Administraram aos animais infusões intraruminais de 2 g / Kg de peso vivo de butirato de sódio (solução aquosa a 10%) e de solução salina a 0,9%. Nos ensaios 1 e 2, um carneiro recebeu infusões rápidas (dentro de 10 segundos) de butirato de sódio uma vez ao dia e infusões lentas de solução salina, durante 20 a 24 horas por dia. O outro carneiro recebeu infusões rápidas de solução salina e infusão lenta de butirato de sódio. Nos ensaios 3 e 4, um animal recebeu infusão rápida de butirato de sódio e o outro recebeu infusão lenta, sem infusões de solução salina. As infusões foram feitas por seis dias no ensaio 1 e por três dias nos ensaios 2, 3 e 4. Papilas ruminais foram coletadas por biópsia antes de cada infusão e 24 horas após a última infusão da série. Infusões rápidas de butirato foram eficientes em promover aumento significativo no índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen a partir do primeiro dia após o início das infusões em todos os ensaios. Este índice mitótico manteve-se alto até o quinto dia após as infusões, voltando a valores semelhantes ao inicial no dia 6 do ensaio 1.

~~X~~ Pode-se concluir que, uma vez atingida a massa epitelial necessária para absorver e metabolizar o novo nível de AGV ruminal, a taxa de divisão celular retorna a valores iniciais, apenas para manter a renovação celular normal.

Infusões lentas de butirato de sódio não estimularam o aumento do índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen em nenhum dos ensaios. Além dos resultados observados no índice mitótico, as preparações histológicas também demonstraram que as cunhas epiteliais do rúmen

desenvolveram-se marcadamente nos carneiros que receberam infusões rápidas de butirato, sugerindo que o aumento no índice mitótico levou ao aumento do número de células do epitélio (Sakata e Tamate, 1978 a).

Estava estabelecido que aumento súbito de butirato intraruminal induzia a proliferação do epitélio, mas faltava saber se propionato e acetato também eram indutores de crescimento papilar. Quatro carneiros adultos permaneceram, em um período pré-experimental de duas semanas, alimentados com concentrado e feno 1 vez ao dia (Sakata e Tamate, 1979). No período experimental, foram submetidos a jejum, recebendo apenas água e minerais. Um carneiro recebeu infusões intraruminais diárias de 18 m mols por Kg de peso corporal de propionato administrado rapidamente (10 segundos) por 5 dias, tendo como controle outro carneiro recebendo solução salina 0,9% da mesma maneira. Realizou-se o mesmo procedimento, mas com acetato de sódio, utilizando-se outro par de carneiros. Papilas ruminais foram coletadas por biópsias antes de cada administração e 24 horas após a última administração da série. O propionato estimulou o índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen a partir do segundo dia após infusões, mantendo este efeito até o quarto dia. O acetato também estimulou a proliferação celular, mas a partir do terceiro dia, mantendo-se até o quarto dia após início das infusões. O efeito mitogênico do propionato pareceu ser mais forte do que o do acetato uma vez que o primeiro promoveu pico de índice mitótico 2 dias após a primeira infusão e o último promoveu pico somente 3 dias após a primeira infusão. Ao compará-lo com outro experimento dos mesmos autores, onde infusões de butirato estimularam proliferação celular apenas 1 dia após início das infusões (Sakata e Tamate, 1978a), pôde-se especular a seguinte ordem de eficiência de estimulação do crescimento epitelial : butirato>propionato>acetato. //

Até então, pesquisas comprovavam o efeito dos AGV na proliferação do epitélio ruminal por aumento da taxa de mitose, mas nada se sabia sobre a

involução deste epitélio na ausência de AGV. Atentos a este fato, Tamate e Fell (1978) delinearam um experimento com 2 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 freqüentes, 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 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 mudança da dieta de cevada para feno, as células da camada basal pareciam estar encolhidas e seus núcleos apresentavam contorno irregular, características que se acentuaram 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 na região 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 carneiros sob três diferentes dietas, as quais foram formuladas para resultar em diferentes proporções de AGV no rúmen. Inicialmente os animais foram alimentados durante 7 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 mudança, 1 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 a partir 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 a 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 exfoliação), 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 da morfologia 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 ( $0,35\% \pm 0,03$ ).

Em um outro ensaio no mesmo experimento, Goodlad (1981) alimentou 2 carneiros por um período com forragem, seguindo outro período de alimentação exclusivamente com concentrados por vários meses. A [ $^3\text{H}$ ]Timidina foi injetada nos animais como marcador de pares de bases do DNA, visando obter uma determinação quantitativa de divisão celular no epitélio ruminal. O marcador foi injetado no período onde recebiam apenas forragem, na transição de forragem para concentrado e após vários meses com dieta exclusiva de concentrado. O índice mitótico na transição da dieta de forragem para concentrado atingiu, aos 5 e 6 dias após início da mudança,

aproximadamente o dobro do detectado na dieta de forragem. Isto foi seguido por um agudo declínio, atingindo, no dia 8, valores próximos aos observados inicialmente. A riqueza de técnicas permitiu ao pesquisador estimar a duração do ciclo celular da camada basal, o qual foi de 23,1 horas na dieta de forragem, diminuindo para 17 horas na transição de forragem para concentrados. Após vários meses ingerindo concentrado, o ciclo celular da camada basal do epitélio ruminal foi 24,4 horas. O tempo de renovação da camada basal na dieta de forragem foi 7,5 dias, baixando para 1,9 dia durante a transição para concentrados. Após vários meses com concentrado o tempo estimado de renovação da camada basal foi de 4,1 dias. A estimativa de renovação do epitélio inteiro foi 16,5 dias na dieta de forragem, 4,3 dias na transição de forragem para concentrados e 10,9 dias após vários meses comendo concentrado. A taxa de proliferação celular da camada basal do epitélio foi também calculada. Na dieta de forragem, a camada basal proliferou 9%. Na transição de forragem para concentrados esta taxa foi de 32,7% e, após vários meses de concentrado, a proliferação foi de 17,3%. Estes dados indicam que o efeito agudo de introdução de concentrado estimula mais a proliferação celular do que efeito crônico. Isto provavelmente acontece porque na transição de forragem para concentrado, uma massa celular bem maior deve ser atingida para possibilitar absorção e metabolização eficiente dos AGV. Uma vez atingida esta massa celular, a proliferação epitelial cai a uma taxa capaz de possibilitar a reposição de células metabolicamente ativas perdidas por diferenciação e descamação.

Estava bem estabelecido que os AGV *in vivo* realmente estimulavam a proliferação do epitélio ruminal, mas o mecanismo pelo qual isto acontecia não estava claro. Experimentos evidenciaram que ácido butírico *in vitro* geralmente inibia a proliferação de células de mamíferos normalmente com alterações nas formas celulares (Ginsburg et al,1973). Em culturas primárias de epitélio



ruminal, butirato causou diminuição na incorporação de [<sup>3</sup>H]Timidina, um marcador de síntese, ao DNA celular (Gálfi et al., 1981). Esta contradição entre estudos *in vivo*, onde butirato estimulou a mitose no epitélio ruminal (Sakata e Tamate, 1978a) e *in vitro*, sugeriam a existência de um ou mais mediadores, não presentes nas preparações *in vitro*. Sabia-se que os hormônios pancreáticos Insulina e Glucagon eram liberados na presença de ácidos butírico ou propiônico (Mans, Boda, Willes, 1967; Jordan e Philips, 1978). Cogitou-se que Insulina, por ser fator essencial para a proliferação de células mamíferas *in vitro* (Bottenstein et al., 1979), pudesse ser um mediador hormonal na proliferação do epitélio ruminal.

Sakata et al. (1980) alimentaram dois carneiros adultos com fistulas ruminais com 300g de concentrado e 700g de feno apenas 1 vez ao dia em um período pré-experimental. Um catéter de polietileno foi implantado na veia jugular externa de cada animal. Retiraram a comida e a água 1 hora antes do início de cada ensaio experimental. Em cinco ensaios, infundiram insulina (0,125 UI/Kg de peso corporal por hora) juntamente com glicose (300 mg/Kg de peso corporal por hora), para prevenir hipoglicemia. Em dois ensaios controles, infundiram apenas glicose (300 mg/Kg de peso corporal por hora). Em outro ensaio controle, administraram apenas solução salina fisiológica (solução de cloreto de sódio a 0,154 M). As soluções foram infundidas na veia jugular externa direita por 6 horas, à taxa de 0,5 ml / min, com uma bomba peristáltica. Amostras de sangue da veia jugular externa foram coletadas nos seguintes tempos: -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 24 e 48 horas após o início da infusão. Executaram biópsia de três a cinco papilas da região do átrio do rúmen (saco cranial) através da cânula ruminal às 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas após infusões. O índice mitótico nos carneiros que receberam insulina mais glicose aumentou significativamente entre zero e três horas após infusão, permaneceu alto até as 24 horas e retornou ao valor inicial às 48 horas. Nos carneiros

infundidos apenas com glicose, o índice mitótico também aumentou significativamente entre 6 a 24 horas. O índice mitótico do controle com salina não mostrou flutuações marcantes durante o experimento. O aumento no nível do índice mitótico nos carneiros infundidos com insulina e glicose foi significativamente mais alto do que naqueles recebendo apenas glicose.

Objetivando esclarecer a aparente contradição entre o efeito de butirato *in vitro* e *in vivo*, Gálfi, Neogrády e Kutas (1986), trabalharam com três ovelhas com fistulas ruminais alimentadas com feno *ad libitum* e 400 g de concentrado divididos em duas alimentações diárias. Em duas ovelhas, fizeram infusões intraruminais com butirato de sódio (2 g / Kg de peso corporal) diariamente, por 9 dias. Um dos animais recebeu infusão contínua através de uma bomba peristáltica. O outro recebeu infusão rápida dentro de 1 a 2 minutos, uma vez ao dia. O terceiro animal foi tratado com infusão rápida de solução salina fisiológica. Papilas ruminais foram colhidas diariamente e cultivadas em presença de [<sup>3</sup>H]Timidina ou preparadas histologicamente. Fluido ruminal foi colhido para pesquisas de AGV. A ovelha que recebeu infusão contínua de butirato teve uma alta concentração deste AGV no rúmen por volta do segundo dia de infusão, enquanto a incorporação de [<sup>3</sup>H]Timidina pelas papilas ruminais tendeu a diminuir continuamente até o último dia de infusão, alcançando apenas 20% em relação ao controle. O índice mitótico da camada basal de células epiteliais foi particularmente baixo do 4º ao 9º dia. As camadas de células do estrato córneo foram mais numerosas em relação ao controle e as do estrato espinhoso foram menos numerosas. Nas amostras coletadas no 9º dia, houve uma marcante diminuição das cunhas epiteliais. A ovelha que recebeu infusão aguda teve um nível médio mais baixo de butirato intraruminal em relação àquela com infusão contínua. Apresentou um aumento acentuado de incorporação de [<sup>3</sup>H]Timidina pelas papilas ruminais. No 9º dia a, incorporação de [<sup>3</sup>H]Timidina foi 2 vezes maior em comparação ao controle. Observou-se

também um alto índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen. Simultaneamente, foi observado um aumento nas camadas de células do estrato espinhoso e, aos 9 dias, um alongamento das cunhas epiteliais em relação ao controle. Estes resultados mostraram que ocorreu inibição de divisão celular na presença contínua de butirato no rúmen, semelhante aos resultados observados nos experimentos *in vitro*.

O conjunto de evidências levavam à conclusão da existência de um mediador para o efeito trófico dos AGV *in vivo*. Em ratos com fistula ileal, os AGV estimularam o desenvolvimento de criptas intestinais no ceco e cólon (Sakata, 1987). Em contrapartida, os AGV inibiram proliferação epitelial de células de ceco isoladas de rato *in vitro*.

Trabalhos realizados *in vitro* demonstraram que a insulina estimulou a proliferação de células epiteliais do rúmen independentemente da ação inibitória do ácido butírico coexistente na cultura (Gálfi et al, 1993). Ambos os efeitos, estimulatório da insulina e inibitório de butirato, foram doses dependentes. O glucagon, cuja secreção é também regulada por AGV (Mineo et al, 1990), também estimulou a proliferação de culturas primárias de células epiteliais do rúmen, mas apenas na ausência de butirato (Gálfi et al, 1993), sendo portanto de importância questionável *in vivo*.

Infusão de propionato, em doses fisiológicas (acima de 8  $\mu\text{mol}$  / Kg de peso corporal), nas veias mesentéricas e femorais de carneiros, estimulou a secreção de insulina e glucagon (Sano et al., 1995 a). Butirato administrado na veia femoral de carneiros também estimulou a liberação de insulina plasmática (Sano et al., 1995 b), porém em doses mais baixas do que propionato (2  $\mu\text{mol}$  / Kg de peso corporal). A liberação de glucagon foi observada apenas com doses acima de 32  $\mu\text{mol}$  / Kg de peso corporal. A liberação de insulina tendeu a ser mais alta e por período mais longo estimulada por butirato (Sano et al., 1995 b) do que para propionato (Sano et al., 1995 a).

A liberação de insulina tendeu a ser  
mais alta e por período mais longo estimulada  
por butirato

Diante das evidências de que o efeito dos AGV na proliferação epitelial do rúmen é indireto, sendo mediado ao menos em parte por insulina (Sakata et al.,1980), a estimulação da liberação deste hormônio pelo pâncreas poderia influenciar o desenvolvimento do epitélio ruminal. O propilenoglicol, que é um composto glicogênico, apesar de escapar quase intacto da fermentação ruminal para ser transformado em glicose pelo fígado, tem uma porção metabolizada para propionato no rúmen (Emery et al.,1964). A adição de propilenoglicol na ração, comparado com dieta de amido, produziu uma grande porcentagem molar de propionato ruminal e estimulou uma maior liberação de insulina (Fronk, 1975).

Vaughn, Grummer e Bertics (1993), trabalhando com 24 vacas holandesas múltiparas secas e gestantes, alimentaram estes animais, durante 21 dias antes do parto, com feno de alfafa ad libitum e 1,8 Kg de concentrado, diariamente. Após o parto, alimentaram estes animais com 50% de feno de alfafa e 50% de forragem baseados na matéria seca. Forneceram, a partir de 7 dias antes do parto esperado, 1 litro de propilenoglicol, oralmente, 1 vez ao dia, ou a mesma quantidade de água fornecida da mesma maneira como controle. Amostras de sangue foram colhidas nos dias 16 e 17 antes do parto esperado. A partir de 7 dias antes do parto, coletaram sangue diariamente até os 3 dias após o parto. Coletaram também com 7, 14 e 21 dias após o parto. A concentração de insulina plasmática foi significativamente elevada aos 15 minutos após a administração de propilenoglicol. O pico de concentração de insulina ocorreu antes do pico de concentração de glicose. A concentração de insulina foi diminuída no dia do parto. A insulina plasmática não foi diferente entre os tratamentos após o parto, porém no pré parto a concentração de insulina foi mais alta nos animais recebendo propilenoglicol.

Em vacas leiteiras ocorre uma diminuição da ingestão de matéria seca antes do parto. Vazquez-Añon et al. (1994), em um experimento com nove vacas

secas gestantes, demonstraram uma diminuição na ingestão de matéria seca iniciando-se 2 dias antes do parto e atingindo, no dia do parto, queda de 60% em relação à matéria seca ingerida 3 dias antes. Christensen et al. (1996) testaram o efeito do método de administração de propilenoglicol nos metabólitos plasmáticos de vacas com alimentação restrita. Utilizaram 4 novilhas gestantes faltando em média 79 dias para o parto e 4 vacas aos 84 dias pré parto. Usaram um delineamento em quadrado latino 4 x 4 replicado com períodos de 14 dias. Durante os primeiros 7 dias, os animais foram alimentados com 2,5 Kg de concentrados baseado na matéria seca e silagem de alfafa *ad libitum*. Nos dias 8, 9 e 10, os animais receberam a quantidade média de silagem de alfafa que consumiram nos dias 5, 6 e 7. Os tratamentos foram iniciados no dia 8, sendo :

- 1) Controle ( forragem e concentrados fornecidos como uma dieta total sem propilenoglicol).
- 2) Propilenoglicol fornecido como injeção oral, 1 vez ao dia, aos animais alimentados com dieta completa.
- 3) Propilenoglicol misturado ao concentrado fornecido 1 vez ao dia separadamente do volumoso.
- 4) Propilenoglicol misturado à dieta completa fornecida aos animais.

A quantidade diária de propilenoglicol para cada vaca e novilha foi de 2,5 ml / Kg de peso corporal metabólico ( $PV^{0,75}$ ) ao início do experimento. Nos dias 11, 12, 13 e 14, ingestão de forragem foi restringida a 80, 60, 40 e 40%, respectivamente, em relação à quantidade média de alimento ingerido nos dias 5, 6 e 7. A restrição de alimentação foi para simular a diminuição da ingestão peri-parto. No dia 10 de cada período (antes da restrição alimentar), obtiveram-se amostras de sangue aos tempos 0, 90, e 180 minutos após a administração de propilenoglicol . No dia 14 , amostras foram coletadas aos tempos 0, 30, 60, 90, 180, e 330 minutos após a administração de propilenoglicol. A insulina foi medida apenas nas vacas multíparas e foi aumentada em vacas recebendo propilenoglicol. As concentrações de insulina plasmática foram mais altas em vacas recebendo propilenoglicol oral ( $33 \pm 3 \mu\text{UI/ml}$ ) ou junto com o concentrado

( $31,9 \pm 3 \mu\text{UI/ml}$ ) do que naquelas que o recebiam como parte de uma dieta completa ( $24 \pm 3 \mu\text{UI/ml}$ ). As concentrações de insulina plasmática dos animais controle foi de  $16,6 \pm 3 \mu\text{UI/ml}$ . A interação entre tratamento e tempo indicou que a resposta da insulina foi mais longa para vacas recebendo propilenoglicol oral ou junto com concentrado do que quando fornecido como parte de uma dieta completa. O comportamento da insulina em relação aos tratamentos, durante o período de restrição alimentar, foi muito similar. A insulina foi mais alta em vacas recebendo propilenoglicol, e o propilenoglicol oral ou com concentrado foi mais efetivo em aumentar a concentração de insulina do que como parte de dieta completa.

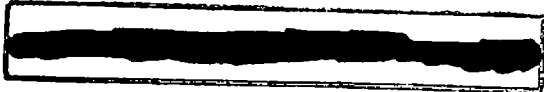
Lane e Jesse (1996) propuseram avaliar o efeito da administração contínua de AGV no epitélio ruminal de carneiros recém nascidos, uma vez que isto havia sido testado somente em carneiros adultos. Eles implantaram catéteres cirurgicamente no rúmen de carneiros neonatos e infundiram AGV (acetato, propionato e butirato) ou solução salina continuamente à taxa de 1 ml por minuto. Mantiveram também um grupo que não recebeu infusão. A quantidade de AGV infundida foi estimada para suprir uma porcentagem do requerimento de energia líquida para ganho, tendo variado entre 12,5% na primeira semana de infusão e 50% na sexta semana. Carneiros infundidos com AGV tenderam ( $P < 0,23$ ) a ter papilas mais longas do que aqueles infundidos com salina ou não infundidos.

Greenwood et al. (1997) trabalharam com doze bezerros, fornecendo-lhes dietas com os mesmos ingredientes, mas com tamanhos de partículas diferentes. O comprimento das papilas ruminiais aumentou quando o tamanho de partículas da dieta diminuiu, o mesmo acontecendo com o porcentual de queratina em relação às demais camadas epiteliais. O pH ruminal foi mais baixo nas dietas com menores tamanhos de partículas, mas não existiram diferenças significativas entre as concentrações ruminiais de AGV.

## 2.2 Desenvolvimento papilar e absorção de AGV

No início da década de 60, pesquisadores demonstraram que a taxa de absorção de AGV pelo epitélio do rúmen é positivamente correlacionada com o desenvolvimento das papilas (Sutton, Mcgilliard, Jacobson, 1963). Bezerros holandeses alimentados com leite, feno e concentrados apresentavam bom desenvolvimento papilar às 4 semanas de idade, e às 13 semanas tinham a mucosa semelhante a de um ruminante adulto, o que não ocorreu em bezerros alimentados apenas com leite no mesmo experimento. Paralelamente, a taxa de absorção de ácido acético aumentou marcadamente entre 1 e 13 semanas de idade naqueles bezerros alimentados com leite, feno e ração, mas não mudou naqueles alimentados apenas com leite.

A manipulação do crescimento das papilas de vacas leiteiras no pré-parto, objetivando reduzir a incidência de problemas atribuídos à baixa capacidade absorptiva do epitélio em vacas recebendo dietas lactacionais ricas em carboidratos prontamente fermentáveis, teria grande aplicabilidade / Dirksen et al. (1984) avaliaram a relação entre crescimento papilar e capacidade de absorção em vacas leiteiras. Utilizaram 2 novilhas holandesas em três períodos experimentais. Forneceram uma dieta pobre em energia, seguida de uma rica em energia e novamente uma pobre em energia, por 7 a 14 dias cada. Aumento no aporte dietético de concentrado desencadeou aumento no tamanho papilar. A absorção de ácidos acético, butírico e propiônico foi 5 vezes mais rápida e a quantidade absorvida por minuto foi 3 vezes maior com a mucosa desenvolvida do que com a mucosa involuída. Os mesmos autores também avaliaram a dinâmica de crescimento papilar em vacas holandesas no período peri-parto. No início do período seco, reduziram drasticamente o conteúdo energético da ração. Duas semanas antes do parto, mudou-se o regime alimentar para uma dieta lactacional rica em energia. Biópsias da mucosa do rúmen foram realizadas em



seis ocasiões, em intervalos de uma a duas semanas a partir de 8 a 9 semanas antes do parto até 8 semanas pós parto. As amostras foram analisadas morfometricamente por microscopia óptica e eletrônica. Observou-se redução progressiva da mucosa ruminal nas vacas quando a ração do período seco pobre em energia foi introduzida. Após a mudança para a ração de alta energia, 14 dias antes do parto, iniciou-se um processo intenso de proliferação. Entretanto, a mucosa atingiu seu maior tamanho apenas 4 a 5 semanas após o parto.

O jejum leva à diminuição da concentração de AGV ruminal, que por sua vez leva à involução do epitélio, e isto provavelmente diminui a absorção de AGV presentes no rúmen. Para testar esta hipótese, Gäbel, Marek e Martens (1993) utilizaram 6 carneiros com fistulas ruminiais. Alimentaram os animais com feno *ad libitum* e 300 g de concentrados por dia e submeteram-os a jejum de dois dias. Em comparação com o período de alimentação, o jejum diminuiu a concentração total de AGV de 76,2 mM para 27,1 mM e levou a um aumento no pH intraruminal de 6,41 para 7,44. O jejum não levou a mudanças na área superficial das papilas, mas reduziu a capacidade de absorção de minerais e AGV pela parede do rúmen.

Perrier et al. (1994), trabalhando com 4 carneiros, forneceram a 2 deles uma dieta para suprir a manutenção e, aos outros dois, deram alimento para suprir apenas metade da manutenção. Encontraram uma taxa de absorção de AGV significativamente mais baixa nos animais que receberam meia manutenção do que naqueles que receberam manutenção total.

### 2.3 Divisão celular e desenvolvimento do epitélio

O epitélio ruminal é estratificado pavimentoso queratinizado. Sua espessura é uma medida da massa de células epiteliais a qual é determinada pela



taxa mitótica e pela taxa de deleção celular (Bullough, 1972; Tamate e Fell, 1978). O índice mitótico tem sido usado para expressar a atividade proliferativa do epitélio ruminal (Sakata e Tamate, 1974; Tamate, Kikuchi, Sakata, 1974; Sakata e Tamate, 1978; Tamate e Fell, 1978; Sakata e Tamate, 1979; Sakata et al., 1980; Goodlad, 1981; Gálfi et al. 1986).

Em animais de laboratório, o epitélio do trato gastrointestinal geralmente mostra um ritmo circadiano do índice mitótico (Bullough, 1948; Wolfsberg, 1964; Pilgrim e Maurer 1963, 1965; Sigdestadt et al. 1969; Chang 1971; Scheving et al., 1972 – citados por Sakata e Tamate, 1978b). Para investigar a existência de um ritmo circadiano no epitélio ruminal de carneiros, Sakata e Tamate (1978b) realizaram um experimento com 2 ensaios. No ensaio 1, utilizaram 2 carneiros adultos. Eles foram alimentados 1 vez ao dia, às 11:00, com 350 g de concentrado e 500 g de feno. Papilas foram coletadas por biópsia do recesso do rúmen de 4 em 4 horas (00:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 e 20:00) durante 5 dias. O índice mitótico do epitélio ruminal foi relativamente baixo pela manhã e tornou-se alto à tarde e à noite. No segundo ensaio, utilizaram outros dois carneiros adultos alimentados com 300 g de concentrado e 500 g de feno às 07:00 horas. Executaram-se biópsias às 8:00 e 20:00 h no primeiro dia, às 12:00 e 24:00 no segundo dia e às 04:00 e 16:00 no terceiro dia. O índice mitótico foi razoavelmente baixo às 8:00, 1 hora após a alimentação, e aumentou às 12:00, 5 horas após a alimentação, permanecendo relativamente alto até as 04:00. No ensaio 1, o pico do índice mitótico aconteceu 5 horas após a alimentação e permaneceu até 13 horas após. Existiu, nos dois ensaios, um ritmo circadiano influenciado pela alimentação. O aumento no índice mitótico foi percebido a partir de 5 horas após a alimentação nos dois ensaios, aparentemente coincidindo com o período de maior fermentação de digesta no rúmen e acúmulo de AGV (Pereira, 1997).

Em outro experimento, Ohawada e Tamate (1983) utilizaram três carneiros adultos com fistulas ruminais. Alimentaram-nos com 1 Kg de feno no ensaio 1, e com 200g de feno e 800 g de concentrado no ensaio 2., apenas 1 vez ao dia, às 18:00 horas. No ensaio 3, forneceram 100 g de feno e 400 g de concentrado ,2 vezes ao dia, às 06:00 e 18:00 horas. Papilas foram coletadas por biópsia do átrio do rúmen às 03:00, 07:00, 11:00, 15:00, 19:00 e 23:00 horas. O índice mitótico apresentou um ritmo circadiano nos três ensaios. O valor mais baixo do índice mitótico ocorreu 1 hora após a alimentação nos ensaios 1 e 2 , e 1 hora após a alimentação da manhã no ensaio 3. O pico do índice mitótico apareceu 5 horas após a alimentação no ensaio 1; 9 horas após no ensaio 2 e 5 horas após cada alimentação no ensaio 3. Os valores do índice mitótico foram mais baixos no ensaio 3 do que nos ensaios 1 e 2, sugerindo que a frequência alimentar foi maior determinante do índice mitótico que o teor de concentrado na dieta.

A população de células do epitélio ruminal é regulada pela fração de células que estão no ciclo de renovação celular e também pela duração das fases do ciclo, especificamente da mitose (M), do período pós-mitótico e pré-sintético (G1), do período de síntese de DNA (S) e do período pós-sintético e pré-mitótico (G2). O número de células no epitélio também depende do tempo necessário para a migração das células filhas, desde o seu surgimento até a exfoliação na superfície luminal. Se as taxas de divisão e diferenciação celular estão em distúrbio, condições patológicas como hiperqueratose, paraqueratose e ruminites podem ocorrer.

Visando estabelecer o porcentual de células epiteliais do rúmen nas diferentes fases, o seguinte experimento foi realizado: Dois carneiros adultos foram alimentados, uma vez ao dia, com uma dieta convencional composta de 400g de concentrado e 600g de feno, até um dia antes do sacrifício (Ohwada e Tamate, 1979). Estes foram sacrificados e segmentos da mucosa ruminal

coletados do átrio do rúmen. As mensurações do complexo DNA-Feulgen foram obtidas nos núcleos das células da camada espinhosa, basal e intra-cunha do epitélio ruminal. O histograma das células espinhosas exibiu apenas um pico na região diplóide (2N), consistindo apenas de células em G1. Os valores das células das cunhas epiteliais foram também agrupados em uma única classe, mas poucos núcleos mostraram maior quantidade de DNA do que os núcleos diplóides. O histograma das células basais mostrou um pico relativamente amplo representando células com conteúdo diplóide (2N), ou seja, células em G1. Algumas células localizadas próximas do valor tetraplóide (4N) de DNA representam as células em G2. As células em fase S foram consideradas como tendo valores de DNA entre 2N e 4N. Espera-se que a maioria das células estejam localizadas na fase G1 e que um número relativamente pequeno de células estejam nos compartimentos S e G2. A partir do histograma, foi grosseiramente estimado que o número relativo de células em S e G2 no extrato basal foi cerca de 12% no carneiro 1 e 17% no carneiro 2.

Goodlad (1981), visando estabelecer a taxa de diferenciação celular e estágios do ciclo celular no epitélio ruminal, alimentou carneiros com forragem, depois mudou para grãos e novamente introduziu forragem. Injetou [<sup>3</sup>H]Timidina nos animais como marcador de pares de bases do DNA, quando estes eram alimentados com forragem, na transição de forragem para concentrados e após os carneiros estarem em dieta concentrada por vários meses. Para a determinação da proporção de cada camada do epitélio, foi usada fotomicrografia de baixa magnitude das papilas ruminais coletadas por biópsia 1, 2 ou 26 horas após a administração do radioisótopo. A porcentagem de núcleos celulares basais marcados em mitose foi determinada por autoradiografia. O índice mitótico na transição da dieta de forragem para concentrado aumentou até atingir o pico 5 a 6 dias após o início da mudança da dieta, o qual foi seguido por um agudo declínio ao nível original. A duração do

ciclo celular foi inicialmente de 23 horas, mas diminuiu para 17 horas quando a proliferação celular foi estimulada por mudança na dieta de forragem para concentrados . A diminuição no tempo do ciclo celular foi resultado da diminuição da duração da fase de síntese do DNA (Fase S). Após vários meses com concentrado, a duração do ciclo celular foi de 24 horas. O fornecimento de dieta com alto teor de concentrado aparentemente levou à hiperqueratose do epitélio ruminal. Na dieta de forragem e na transição de forragem para concentrado, a porcentagem de células nas diversas camadas do epitélio foi 44%, 21%, 16% e 19% nas camadas basal, espinhosa, granulosa e córnea, respectivamente. Depois de alguns meses na dieta com concentrados, estas porcentagens foram 36%, 24%, 16% e 24% nas camadas basal, espinhosa, granulosa e córnea, respectivamente. Hiperqueratose e paraqueratose são freqüentemente observadas em ruminantes consumindo dietas ricas em concentrados ( McGavin e Morril, 1976).

A adoção de estratégias alimentares que possam induzir o crescimento papilar no pré-parto de vacas leiteiras pode diminuir a ocorrência de acidose ruminal no início da lactação, uma vez que o maior tamanho das papilas está associado à maior capacidade de absorção. Em contrapartida, a queda de consumo que ocorre fisiologicamente no peri-parto pode contrapor estas estratégias adotadas, por efeitos negativos sobre a morfologia das papilas do rúmen.

## **2.4 Hipóteses**

O fornecimento de concentrado em baixa freqüência diária é mais eficiente em promover a proliferação do epitélio ruminal do que o fornecimento contínuo ao longo do dia.

O jejum induz a involução aguda do epitélio ruminal.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizadas sete vacas das raças Jersey (4) e Holandesa (3), não lactantes e não gestantes, com cânulas ruminais implantadas cirurgicamente no saco dorsal do rúmen. Os animais foram abrigados e alimentados individualmente em baias com cama de areia.

#### 3.2 Período de padronização

Os animais foram submetidos a um período de padronização de sete dias. Durante este período receberam apenas feno de Coastcross {[*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] cv. Coastal x *Cynodon nlemfuensis* Vandyerst var. *robustus*} e água *ad libitum*. O peso corporal médio no dia 1 do período de padronização foi 375 Kg nos animais Jersey, variando de 313 a 443 Kg. Nos animais Holandeses, o peso médio foi 527 Kg, variando de 455 a 580 Kg.

#### 3.3 Período de comparação

Após o período de padronização, iniciou-se o período de comparação, de 19 dias de duração. Durante este período, os animais consumiram uma dieta composta por concentrado, em quantidade equivalente a 0,5% do peso corporal, e feno de Coastcross *ad libitum*. O concentrado foi composto de 90% de grão de milho moído, 6% de farelo de soja, 2% de uréia, 2% de mistura mineral e apresentou os seguintes valores nutricionais: 88,8% de matéria seca, 15,4% de

proteína bruta, e 11,1% de fibra em detergente neutro. A composição do feno foi a seguinte: 92,3% de matéria seca, 6,7% de proteína bruta , 87,1% de fibra em detergente neutro.

### **3.4 Tratamentos**

Os animais dentro de cada raça foram aleatoriamente alocados em um dos dois tratamentos:

T1 = A quantidade diária de concentrado foi fornecida apenas 1 vez ao dia, às 06:00 horas.

T4 = A quantidade diária de concentrado foi fornecida em 4 alimentações, às 06:00, 12:00, 18:00 e 24:00 horas.

O concentrado foi fornecido separadamente da forragem, que por sua vez foi fornecida após o consumo total do concentrado oferecido.

### **3.5 Período de jejum**

Após o período de comparação, seguiu-se um período de jejum de 72 horas, em que os animais receberam apenas água *ad libitum*.

### **3.6 Estimativa do consumo**

A partir do sexto dia do período de comparação, determinou-se o consumo diário de alimento por vaca, por pesagem do oferecido e sobra de feno e concentrado. Às 6:00, as sobras individuais de alimento presentes no cocho eram recolhidas e pesadas para estimativa do consumo de matéria seca. Não

houve sobra de concentrado em nenhum dos dias. O consumo de matéria seca como porcentagem do peso vivo foi calculado utilizando-se o peso corporal obtido no primeiro dia do período de padronização. A matéria seca foi determinada por secagem a 100° C das amostras de alimento moídas em peneira de 1 mm (moinho Marconi tipo Willy).

### **3.7 Coleta de dados**

Procederam-se sete coletas de dados ao longo do experimento:

- 1ª) Último dia do período de padronização.
- 2ª) Quarto dia do período de comparação.
- 3ª) Décimo segundo dia do período de comparação.
- 4ª) Décimo nono dia do período de comparação.
- 5ª) Vinte e quatro horas de jejum.
- 6ª) Quarenta e oito horas de jejum.
- 7ª) Setenta e duas horas de jejum.

Os dados foram obtidos após a alimentação fornecida às 06:00 horas.

### **3.8 Amostras de sangue**

Amostras de sangue em cada dia de coleta foram obtidas 0, 90, 180 e 360 minutos após a administração do concentrado às 6:00 no período de comparação. No período de padronização foram obedecidos estes tempos após a administração de feno no mesmos horário. Nos dias de jejum apenas uma coleta foi feita em cada animal em horário correspondente ao tempo zero do período de comparação. Foram puncionados os vasos coccígeos medianos utilizando-se tubos vacuntainer 13 X 75 mm, com capacidade para 5 ml, contendo 0,05 ml de

EDTA (K3) [Merck S.A. Indústrias Químicas. Estrada dos Bandeirantes, 1099. Rio de Janeiro – RJ – CEP 22710-571. Tel (021) 444 2000]. As amostras foram colocadas em gelo imediatamente após a coleta e posteriormente centrifugadas a 4° C e a 2118 g, por 15 minutos, para obtenção do plasma sanguíneo. O plasma foi congelado a 20° C negativos para posterior análise de insulina.

### 3.9 Amostras de fluido ruminal

Amostras de fluido ruminal foram obtidas nos mesmos tempos das amostras de sangue. Introduziu-se um becker com capacidade para 100 ml, tampado pela mão, no saco ventral do rúmen, onde permitiu-se o preenchimento do recipiente por fluido ruminal. O fluido ruminal foi filtrado imediatamente em um tufo de gaze de 4 dobras. Após a filtragem, mediu-se o pH do fluido através de um medidor portátil (pH – meter CG 837, Schott Geräte).

### 3.10 Biópsias de papilas

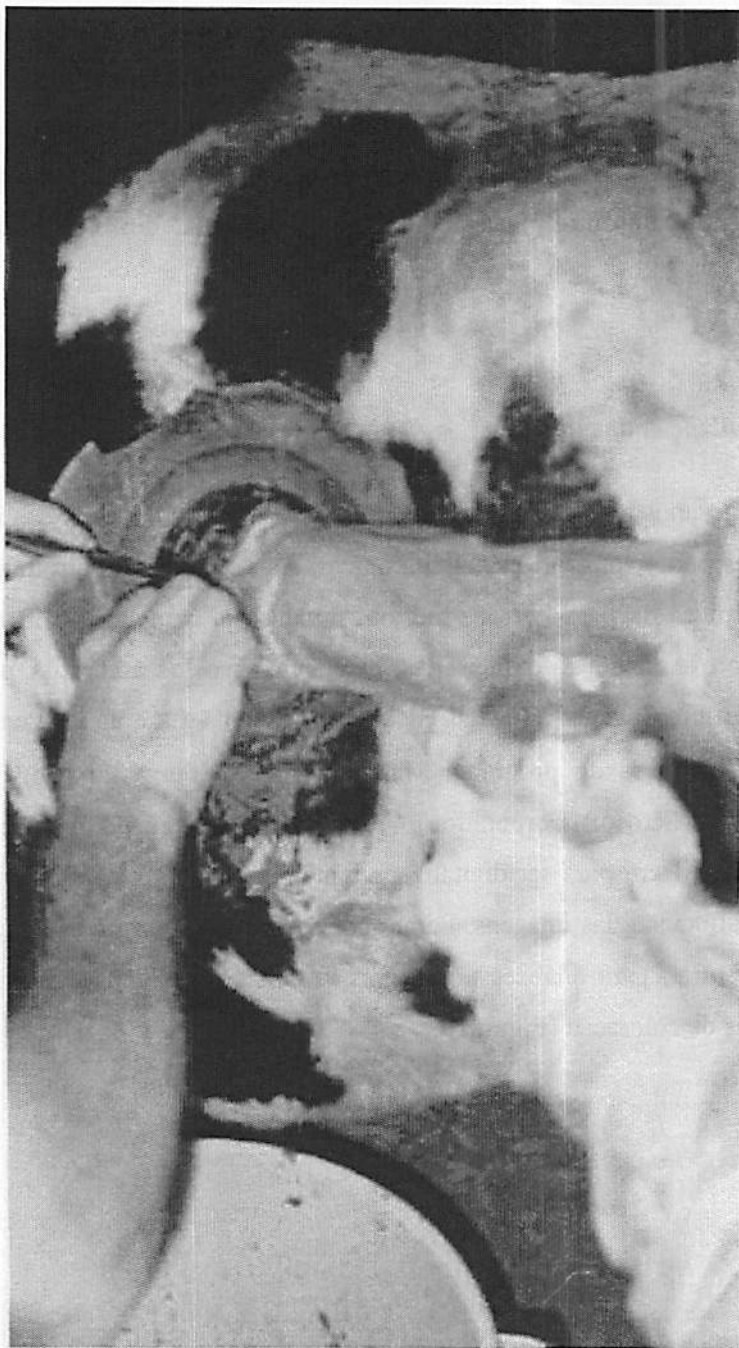
As biópsias de papilas foram executadas após a coleta de sangue e fluido ruminal, no tempo 360. No período de jejum, adotou-se o mesmo procedimento, porém o tempo da coleta foi correspondente ao zero. Esvaziou-se parcialmente o rúmen do animal, coletando-se a digesta em um recipiente de 60 litros, para retornar posteriormente ao rúmen. Introduzindo-se a mão direita através da cânula, tracionou-se o pilar cranial do rúmen até a sua exteriorização (Figura 3). Foram cortadas, aleatoriamente, 12 papilas utilizando uma tesoura cirúrgica de 10 cm, tendo o cuidado de obedecer sempre o mesmo local do saco cranial do rúmen (*Atrium ruminis*), tomando como referência a área localizada a cerca de 10 cm medialmente à parede lateral esquerda e 5 cm cranialmente ao



pilar cranial (Figura 4). As papilas foram colocadas em uma placa de petri (70 mm de diâmetro por 13 mm de altura) contendo solução tampão fosfato (PBS = 0,79 g de NaCl ; 0,223 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,0524 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; H<sub>2</sub>O qsp 100 ml) ajustada para pH 7,4. As papilas foram lavadas nesta solução e transferidas imediatamente para outra placa de petri com as mesmas dimensões, contendo PBS.

### **3.11 Digitalização das imagens**

Logo após a coleta de papilas, procedeu-se a digitalização das imagens das mesmas para mensurações macroscópicas. As 12 papilas foram transferidas para outra placa de petri com as mesmas dimensões, contendo 2 ml de PBS, tomando-se o cuidado de enfileirá-las, nivelando-as pelos ápices. A placa foi colocada em um Scanner (Hewlett Packard – Scanjet 4 C) e as imagens foram digitalizadas através do programa Microsoft Photo Editor 3.0 (Copyright © 1989-1997 – Microsoft Corporation). Ao lado da placa de petri, foi colocada uma escala de 1 cm para ser digitalizada juntamente com as papilas e permitir posterior calibração das imagens. Foram obtidas imagens em preto e branco no tamanho natural, para análises posteriores, e também imagens coloridas para observações de coloração (Figura 5).



**FIGURA 3: Biópsia das papilas do rúmen**

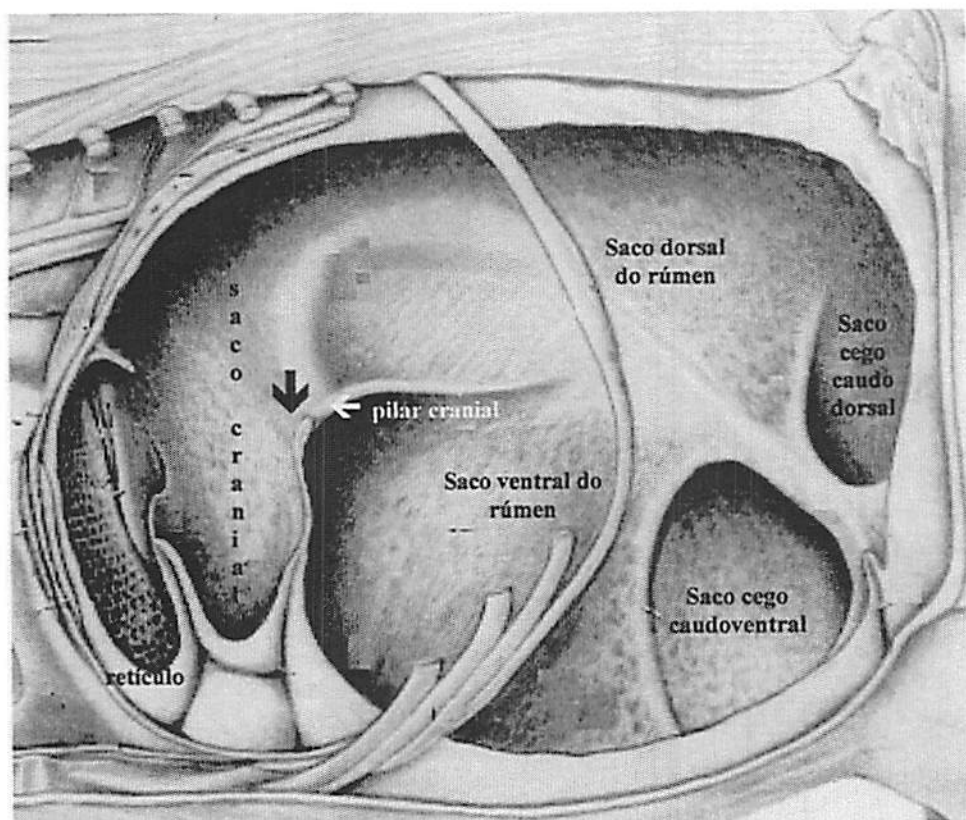


FIGURA 4: Corte sagital do rúmen e do retículo (esquemático). A seta preta indica o local de biópsia das papilas (área localizada a cerca de 10 cm medialmente à parede lateral esquerda e 5 cm cranialmente ao pilar cranial).

**A**



**B**



FIGURA 5: Imagem de papilas do rúmen, coletadas no 4º dia do período de padronização, digitalizada em tamanho natural em preto e branco (A) e colorida (B). Observe a escala de 1 cm digitalizada junto às papilas.

### 3.12 Preparações histológicas

Imediatamente após a digitalização, as papilas foram mergulhadas em líquido fixador de Bouin com a seguinte composição:

- Solução aquosa saturada de ácido pícrico ( 6,5 g de ácido pícrico diluído em 500 ml de água destilada) -----75 ml
- Formalina a 40 % -----25 ml
- Ácido acético glacial -----5 ml

As papilas foram deixadas no fixador por 22 horas, transferindo-as depois para álcool etílico a 70%, onde ficaram reservadas para posterior preparação histológica. Procedeu-se, então, a desidratação das papilas em uma série de álcool etílico com concentrações crescentes. As papilas foram retiradas do recipiente no qual estavam com etanol a 70% e transferidas para outro com etanol a 80%, onde ficaram imersas por 30 minutos. Da mesma maneira, foram transferidas para o etanol a 95% onde ficaram por mais 30 minutos. Logo após, foram passadas para outro recipiente contendo etanol absoluto, ficando imersas novamente por 30 minutos. Este último passo foi repetido uma vez. Em seguida, foram imersas em xilol PA (  $C_6H_4(CH_3)_2$ ) por 30 minutos para diafanização, também repetindo-se esta operação uma vez. Logo após, as papilas foram imersas em parafina histológica à temperatura de 60° C. Foram incluídas 6 papilas em cada bloco de parafina. Para manter a temperatura da parafina até a inclusão de todas as papilas utilizou-se uma placa aquecedora. Após resfriado o material, procedeu-se o corte histológico utilizando-se um micrótomo manual (Ancap), obtendo-se secções de 5  $\mu$ m de espessura. Os cortes obtidos foram fixados em lâminas histológicas revestidas com clara de ovo. As lâminas foram coradas por Hematoxilina - eosina (HE), utilizando-se o seguinte procedimento:

- As lâminas foram imersas em xilol (  $C_6H_4(CH_3)_2$ ), por no mínimo 25 minutos.
- Foi feita a imersão em uma série de etanol com concentrações decrescentes (absoluto, 95%, 80% e 70%) para reidratar, deixando-se 2 minutos em cada.
- Foram imersas em hematoxilina por 2 a 3 minutos.
- Foram colocadas em uma cuba em banho de água corrente por 25 minutos.
- Foram imersas em eosina por 30 segundos.
- Outras duas séries de etanol com concentrações crescentes (70%, 80%, 95%, absoluto 1, absoluto 2 e absoluto 3) foram utilizadas para desidratar novamente o material, deixando-se as lâminas por 10 segundos em cada álcool.
- As lâminas foram banhadas duas vezes em xilol por 10 e 40 segundos.
- As lâminas foram montadas utilizando-se uma camada de bálsamo do Canadá e superpondo-se uma lamínula em cada lâmina.

### 3.13 Mensurações macroscópicas

As imagens digitalizadas foram mensuradas através do programa de análises de imagens Sigma Scan Pro 2.0 (Jandel Corporation 1993-1995). As medidas obtidas foram comprimento, área e uma relação área/comprimento para cada uma das 12 papilas amostradas em cada dia de coleta. O método de biópsia utilizado não permitiu uma padronização da altura do corte da papila em relação à parede do rúmen, e isto pode ter influenciado as medidas de comprimento e área das papilas. Portanto, a relação área/comprimento parece ser a mais adequada, pois isola-se o efeito do comprimento. As ferramentas do programa foram utilizadas para medir o comprimento. Para medição da área, foi utilizada a opção de preenchimento e pseudocoloração. As imagens foram convertidas para escala de 256 tonalidades de cinza (8 bits). Os valores próximos a zero foram

padronizados pelo o fundo da placa de petri e os próximos a 255 pelo tom mais escuro das papilas, para os extremos das cores branca e preta, respectivamente. As figuras foram calibradas para o tamanho real através da escala digitalizada junto às papilas.

### **3.14 Dosagens de insulina plasmática**

A insulina plasmática foi dosada por radioimunoensaio em fase sólida pelo procedimento modificado (Vaughn, Grummer, Bertics, 1993) do Kit Coat-a-Count (DPC MEDLAB PRODUTOS MÉDICO-HOSPITALARES LTDA. Av. Pedroso de Morais, 613 Pinheiros – 05419-000, São Paulo – SP, Tel:55.11.816-4033), marcado com iodo radioativo ( $^{125}\text{I}$ ). O seguinte procedimento foi adotado:

- Ao frasco contendo insulina iodada concentrada [ $^3\text{uCi}$  (111 kBq)], foram adicionados 100 ml de água destilada misturando-se por leves inversões do frasco.
- Ao frasco contendo o calibrador A (padrão com concentração zero de insulina) foram adicionados 6 ml de água destilada. Em cada um dos frascos com calibradores B a G, os quais contêm concentrações padrões de insulina de 5, 15, 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{UI/ml}$ , respectivamente, foram adicionados 3 ml de água destilada.
- Os calibradores de insulina foram divididos em alíquotas, congelando-as para serem utilizadas em dois ensaios.
- Os tubos de polipropileno, revestidos internamente com anticorpos anti-insulina, foram identificados para receber o padrão A em duplicata e os demais padrões, B a G, sem repetição. Identificou-se também os tubos para receberem

as amostras de plasma, sem repetição. Um tubo foi destinado à contagem total de radioatividade total do  $^{125}\text{I}$ .

- Os tubos, devidamente identificados, foram preparados para receber os calibradores (Tabela 1).

**TABELA 1: Preparação dos calibradores a serem utilizados no procedimento de radioimunoensaio para dosagem da insulina plasmática.**

Tubos preparados para receber os padrões e servirem como calibradores	Quantidade adicionada do respectivo padrão ( $\mu\text{l}$ )	Quantidade adicionada do padrão zero ( $\mu\text{l}$ )	Concentração de insulina padrão obtida $\mu\text{UI/ml}$
A	300	-	0
B	200	100	3,3
C	200	100	9,9
D	200	100	33
E	200	100	66
F	200	100	132
G	200	100	264

- Em cada frasco devidamente identificado para receber as amostras de plasma, foram colocados 300 $\mu\text{l}$  de cada amostra.
- Adicionou-se 1 ml de insulina iodada em todos os tubos.
- Naquele tubo destinado à medição total da radioatividade do iodo, foi colocado exclusivamente 1,3 ml de insulina iodada.
- Incubou-se por 22 horas em temperatura ambiente.
- Leitura da radioatividade gama:

Desprezou-se o líquido contido nos tubos, e estes foram colocados em posição invertida sobre papel absorvente para escorrer o máximo possível. Procedeu-se, então, a leitura através de um contador Gamma Cord Brand – AMES. Mediu-se a radioatividade gama dos tubos em ordem aleatória. Duas medições foram executadas em cada tubo e quando a diferença da radioatividade foi superior a 0,100 CPM (contagem por minuto), uma nova



leitura foi executada. Para os cálculos foi utilizado o valor médio entre as leituras com diferença menor do que 0,100 CPM.

- **Cálculo dos resultados:**

Para cada ensaio, estimou-se a porcentagem de ligação entre a insulina iodada e os anticorpos presentes na parede do tubo. Quanto maior a ligação da insulina iodada, menor a quantidade de insulina contida no plasma, uma vez que as duas substâncias competem pelo mesmo sítio de ligação. A seguinte fórmula foi utilizada:

$$\% \text{ de ligação} = \frac{\text{CPM de cada calibrador de B a G}}{\text{CPM do calibrador A, o qual representa o máximo de ligação}} \times 100$$

Foi então feita uma transformação logarítmica para obtenção de uma regressão linear da seguinte maneira:

$$\text{Número transformado} = \log (\% \text{ de ligação} / 1 - \% \text{ de ligação})$$

Traçou-se a reta de regressão plotando-se o número transformado no eixo das abcissas e o logaritmo das concentrações dos padrões B a G (log de 3,3 ; 9,9 ; 33 ; 66 ; 32 ; 264) no eixo das ordenadas (Figura 6). A equação de regressão obtida foi utilizada para estimar o logaritmo da insulina plasmática transformando-se posteriormente este número em concentração de insulina.

- **Ensaio realizados:**

Dois ensaios foram necessários para a dosagem de todas as amostras. No primeiro ensaio, foram dosadas as amostras obtidas nos 2 primeiros dias de amostragens (último dia do período de padronização e quarto dia do período de comparação). No segundo ensaio, foram dosados os 2 outros grupos de amostras do período de comparação ( dia 12 e 19) e os 3 grupos de amostras do período de jejum (24, 48 e 72 horas). A variação inter-ensaio foi de 6%. Esta foi calculada baseada nos resultados obtidos de uma mesma amostra de plasma dividida em alíquotas, as quais foram medidas nos dois ensaios. A variação intra-ensaio, baseada na duplicata do calibrador A, foi de 0,9% no ensaio 1, e

de 0,1% no ensaio 2. O  $R^2$  da reta de regressão foi 0,97 em ambos os ensaios (figura 6).

### **3.15 Determinação do índice mitótico**

A determinação do índice mitótico foi feita em microscópio ótico (Ken-A-Vision). Os núcleos das células da camada basal do epitélio (figura 7) foram contados em todas as regiões em que esta podia ser bem delimitada. Para esta contagem foi utilizado um aumento de 400 vezes. Todas as células com núcleo apresentando figuras mitóticas (Figuras 8, 9, 10 e 11) foram contabilizadas. O percentual do índice mitótico foi calculado dividindo-se o número de células apresentando figuras mitóticas pelo número total de núcleos contados (Sakata e Tamate, 1974; Tamate, Kikuchi, Sakata, 1974; Sakata e Tamate, 1978a e b; Tamate e Fell, 1978; Sakata e Tamate, 1979; Sakata et al., 1980; Goodlad, 1981; Gálfi et al. 1986). Dois avaliadores executaram a contagem de células em cada papila e o número médio entre as duas avaliações foi utilizado como resultado. Aproximadamente 400 mil células basais em 588 papilas foram contadas por cada avaliador.

### **3.16 Análises estatísticas**

As variáveis medidas ao longo do tempo foram analisadas como medidas repetidas, pelo procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (Littell et al, 1996). Utilizou-se a estrutura de covariância com o maior valor para o critério de informação de Akaike. As estruturas de covariância consideradas foram: auto regressiva de ordem 1 (Auto regressive order one - AR1), simetria composta (Compound symmetric - CS) e não estruturada (Unstructured -UN).

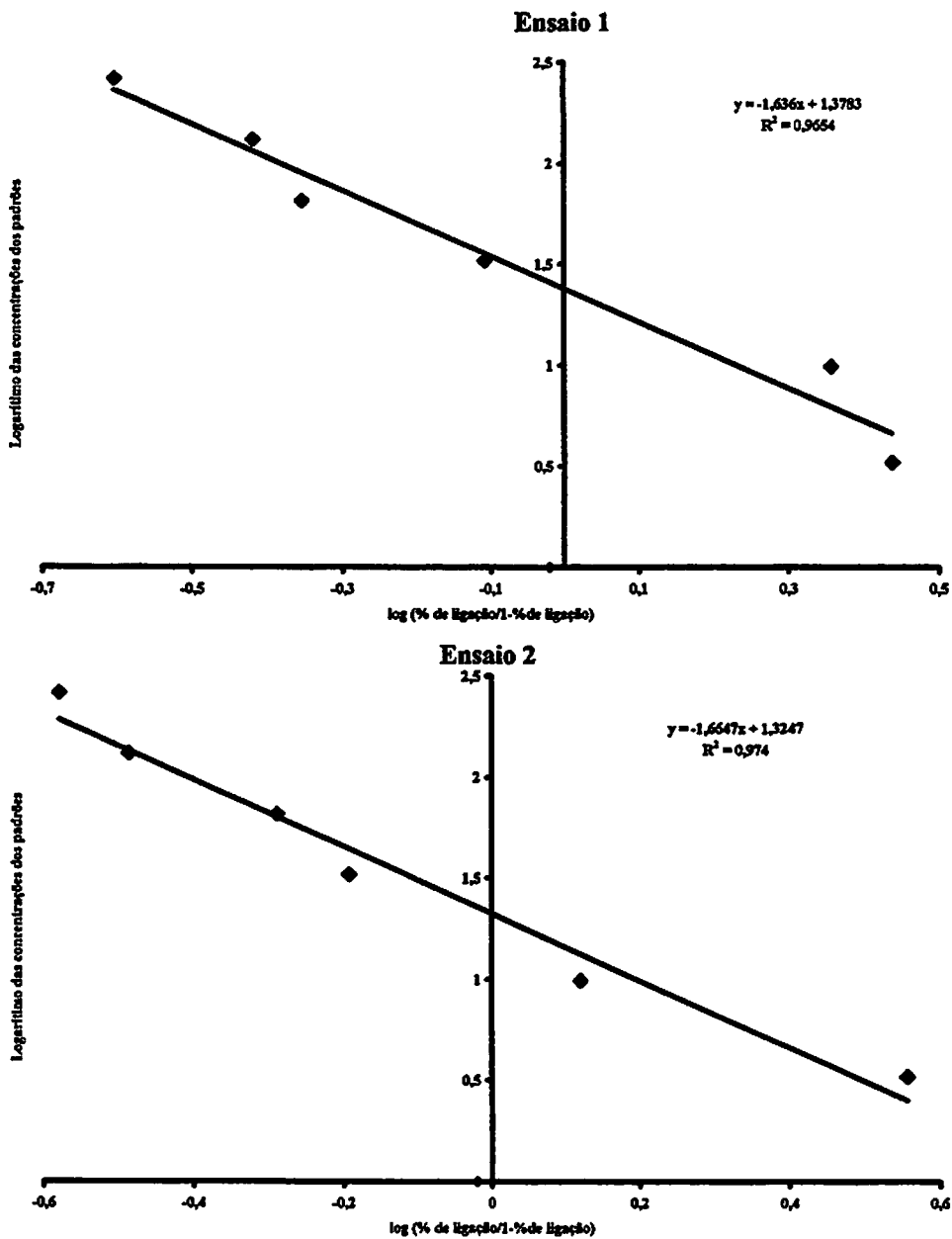


FIGURA 6: Curva padrão utilizada para cálculo das concentrações de insulina plasmática nos ensaio 1 e 2.

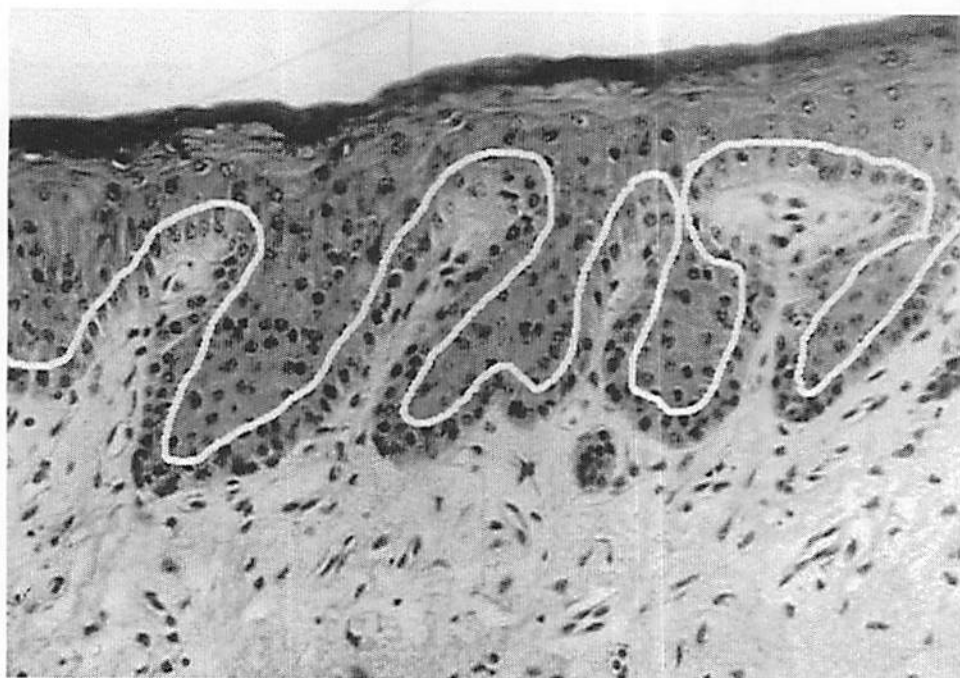


FIGURA 7 : Corte longitudinal de papila do rúmen, coletada no 12º dia do período de comparação. Abaixo da linha branca estão as células da camada basal que foram contadas para determinação do índice mitótico. Coloração em HE. 128X.

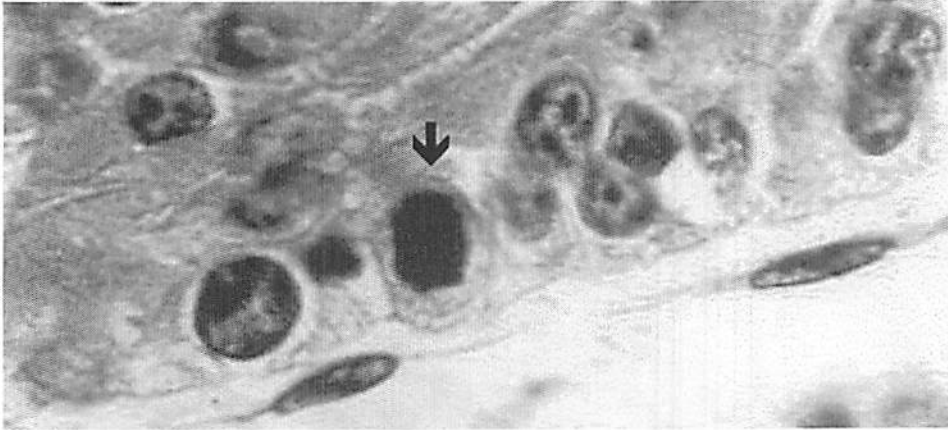


FIGURA 8: Prófase mitótica (seta) em célula da camada basal do epitélio de papila do rúmen, coletada no 12º dia do período de comparação. Coloração em HE. 320X.



FIGURA 9: Prometáfase mitótica (seta) na camada basal do epitélio de papila do rúmen, coletada no 12º dia do período de comparação. Coloração em HE. 630 X.

FIGURA 11: Telófase mitótica (seta) na camada basal do epitélio de papila do rúmen, coletada no 12º dia do período de comparação. Coloração HE. 320 X.

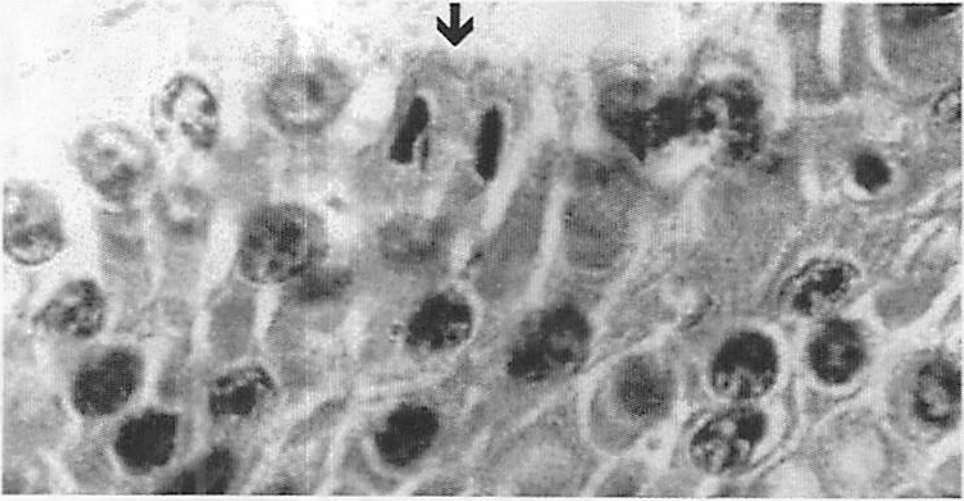
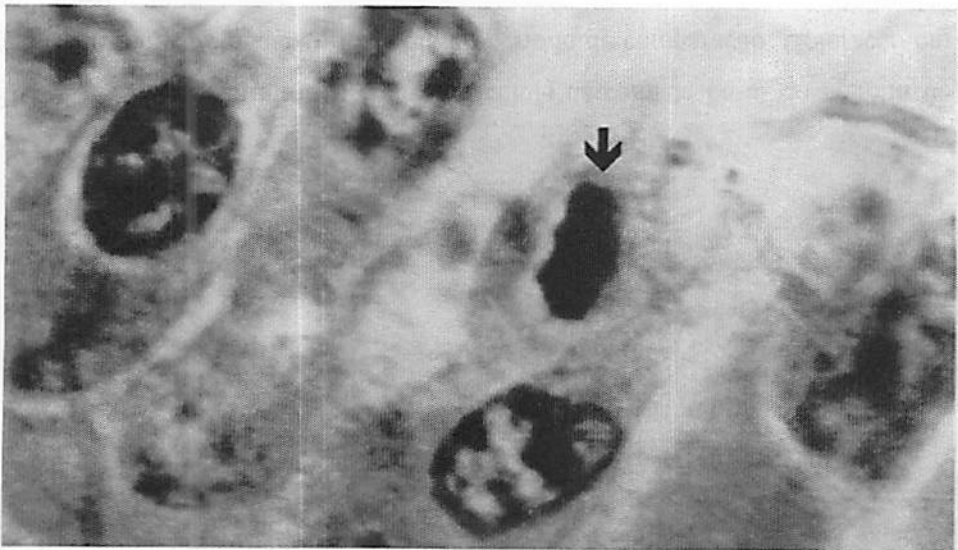


FIGURA 10: Metáfase mitótica (seta) na camada basal do epitélio de papila do rúmen, coletada no 12º dia do período de comparação. Coloração em HE. 630 X.



### 3.16.1 Consumo

O consumo de matéria seca foi analisado pela estrutura de covariância “CS”. As variáveis medidas foram proporção de concentrado na dieta ingerida, ingestão total de matéria seca por dia e consumo de matéria seca como percentagem do peso vivo. Foi utilizado o valor médio de consumo de cada animal ao longo do período de padronização. Os dados foram analisados com o seguinte modelo :

$$Y_{ij} = \mu + R_i + T_j + e_{ij},$$

onde:

$\mu$  = média geral.

$R_i$  = Efeito da raça (i= Holandesa ou Jersey).

$T_j$  = Efeito de tratamento (j= concentrado 1 ou 4 vezes ao dia).

$e_{ij}$  = Erro residual, assumido como independente e identicamente distribuído em distribuição normal com média zero e variância  $\sigma^2$ .

### 3.16.2 Insulina plasmática, pH ruminal e papilas

A análise de insulina plasmática e pH ruminal no período de aplicação dos tratamentos foi realizada utilizando-se a estrutura de covariância “AR1”, segundo o seguinte modelo:

$$Y_{ijkw} = \mu + CV + R_i + T_j + D_k + P_w + T_j * D_k + T_j * P_w + D_k * P_w + T_j * D_k * P_w + e_{ijkw},$$

onde:

$\mu$  = média geral

CV = Efeito da covariável (medições da mesma variável no último dia do período de padronização).

$R_i$  = Efeito da raça (i= Holandesa ou Jersey).

$T_j$  = Efeito de tratamento (j= concentrado 1 ou 4 vezes ao dia).

$D_k$  = Efeito do dia de coleta ( $k$ = dia 4, 12 e 19 do período de comparação).

$P_w$  = Efeito do tempo de coleta ( $w$ = 0, 90, 180 e 360 minutos após alimentação).

$T_j * D_k$  = Interação entre tratamento e dia.

$T_j * P_w$  = Interação entre tratamento e tempo.

$D_k * P_w$  = Interação entre dia e tempo.

$T_j * D_k * P_w$  = Interação entre tratamento, dia e tempo.

$e_{ijkw}$  = Erro residual.

QM de vaca dentro de tratamento foi utilizado como o erro para testar o efeito de tratamento.

Para análise dos dados do período de aplicação dos tratamentos e do jejum, utilizou-se a média de pH ruminal e insulina plasmática entre os tempos de cada dia de coleta e o dado único de cada dia no período de jejum, sob a estrutura de covariância “AR1”. Em relação às papilas, foram analisadas as variáveis comprimento, área, relação área / comprimento e índice mitótico, sob a estrutura de covariância “CS”. O seguinte modelo foi utilizado para estas análises:

$$Y_{ijk} = \mu + CV + R_i + T_j + D_k + T_j * D_k + e_{ijk}$$

onde:

$\mu$  = média geral.

CV = Efeito da covariável (medições da mesma variável no último dia do período de padronização).

$R_i$  = Efeito da raça ( $i$ = Holandesa ou Jersey).

$T_j$  = Efeito de tratamento ( $j$ = concentrado 1 ou 4 vezes ao dia).

$D_k$  = Efeito do dia de coleta ( $k$ = dia 4, 12, 19 do período de comparação e 24, 48 e 72 horas de jejum).

$T_j * D_k$  = Interação entre tratamento e dia.

$e_{ijk}$  = Resíduo.

Vaca dentro de tratamento foi o erro usado para testar tratamento.



### **3.17 Locais de realização do trabalho**

Os procedimentos envolvendo animais foram executados no setor de bovinocultura de leite do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de nutrição do Departamento de Zootecnia, laboratório de histologia do Departamento de Medicina Veterinária e laboratório de análises de alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos, todos eles localizados na UFLA. Os procedimentos de radioimunoensaio foram executados no Laboratório de Análises Clínicas Santa Cecília , em Lavras – Minas Gerais.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais que consumiram concentrado 1 vez ao dia tiveram tendência a maior consumo de matéria seca como porcentagem do peso vivo que animais consumindo concentrado 4 vezes por dia (Tabela 2). O maior consumo foi associado à menor teor de concentrado na dieta, uma vez que a quantidade de concentrado por dia foi fixada em 0,5% do peso vivo. O maior consumo nos animais recebendo concentrado 1 vez ao dia refletiu o maior consumo de feno, resultando em maior teor de FDN na dieta ingerida neste tratamento.

TABELA 2: Consumo de matéria seca e composição das dietas ingeridas por vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes ao dia e feno de gramínea *ad libitum* por 19 dias.

	1	4	Erro Padrão	P
Concentrado (% da MS)	29,6	40,7		
Proteína bruta (% da MS)	9,3	10,2		
Fibra em detergente neutro (% da MS)	64,6	56,2		
Peso corporal (kg)	399	470		
Consumo (kg/d)	6,0	5,3	0,7	0,58
Consumo (% do peso)	1,5	1,2	0,1	0,12

Os animais utilizados estavam não lactantes e não gestantes por anos e se apresentavam em condição corporal tendendo a obesa. No entanto, apesar da baixa demanda metabólica dos animais utilizados, o consumo de matéria seca como porcentagem do peso vivo foi 82 e 105% do previsto (NRC, 1989) para animais comendo concentrado 4 e 1 vez ao dia, respectivamente. É importante ressaltar que as estimativas de consumo do NRC (1989) são baixas quando comparadas a observações de vacas não lactantes consumindo dietas de transição com alto teor de concentrado (Minor et al, 1998). Extrapolações dos dados obtidos neste experimento para situações reais de produção devem,

provavelmente, ser feitas com certa cautela, já que as diferenças observadas podem ser acentuadas em animais pré-parto com maior consumo de dietas contendo teor energético mais alto.

Dois animais da raça Jersey e dois da raça Holandesa foram alimentados com concentrado 4 vezes por dia, enquanto apenas 1 animal da raça Holandesa e 2 da raça Jersey receberam concentrado 1 vez por dia. O desbalanceamento do experimento em termos de raça foi decorrente da morte de um animal da raça Holandesa na segunda semana do período de comparação, causada por uma retículo-pericardite traumática. Animais Jersey consumiram 5,9 kg de matéria seca por dia, enquanto animais Holandeses consumiram 5,4 kg ( $P = 0,67$ ). No entanto, animais Holandeses consumiram 1,1 % do peso vivo, enquanto animais Jersey consumiram 1,6 % ( $P = 0,04$ ). A razão do maior consumo por animais da raça Jersey é obscura, apesar de interessante, devido à significância do efeito de raça sobre o consumo de matéria seca mesmo utilizando-se baixo número de animais.

A menor frequência de alimentação concentrada resultou em maior índice mitótico nas células da camada basal do epitélio ruminal (Tabela 3). No entanto, 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 (Sutton, McGilliard, Jacobson, 1962; Dirksen et al, 1984). Índice mitótico tem mostrado responder agudamente a mudanças no plano alimentar (Sakata e Tamate, 1978 b; Goodlad, 1981). Proliferação celular, no entanto, pode não ser o único determinante de tamanho papilar a curto prazo. Maior fluxo sanguíneo, resultante de maior aporte nutricional e necessidade de absorção, pode resultar em crescimento papilar (Tamate, Kikuchi, Sakata., 1974). Mudanças agudas

**TABELA 3:** Insulina plasmática, pH ruminal, índice mitótico e dimensões macroscópicas das papilas do rúmen de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes ao dia e feno de gramínea *ad libitum*. Valores médios do período de comparação de 19 dias ajustados para o valor da mesma variável no final do período de padronização.

	1	4	Erro Padrão	P	
				Tratamento	Interação Tratamento*Tempo
Insulina ( $\mu$ UI/ml)	13,6	11,8	1,8	0,54	0,02
pH	7,05	7,09	0,11	0,84	< 0,001
Índice mitótico (% dos núcleos basais)	0,97	0,75	0,03	0,03	
Comprimento (mm)	4,20	5,25	0,65	0,41	
Área ( $\text{mm}^2$ )	6,49	9,85	1,45	0,22	
Área/Comprimento (mm)	1,52	1,67	0,14	0,52	

na capacidade de absorção da parede do rúmen podem não estar relacionadas unicamente ao tamanho papilar (Gäbel, Marek, Martens, 1993).

A largura das papilas do rúmen (Figura 12), medida pela relação área/comprimento, foi menor no dia 4 após a aplicação dos tratamentos ( $P < 0,001$  para efeito de dia e  $P = 0,72$  para a interação entre dia e tratamento). Esta observação é de difícil interpretação, devido ao caráter agudo e à tendência negativa da mudança (Dirksen et al, 1984). Possíveis imprecisões na técnica de biópsia papilar podem estar envolvidas nesta observação. Evoluções na técnica podem incluir uma maneira mais efetiva de definição da região anatômica do rúmen a ser biopsiada, bem como maior padronização na altura de corte das papilas em relação à parede do rúmen. Observou-se visualmente que o tamanho papilar adjacente ao pilar cranial do rúmen varia marcadamente dentro de uma área de poucos centímetros, tanto cranial, medial ou lateralmente a este ponto de referência adotado. As biópsias realizadas entre os dias 12 e 23 foram provavelmente mais consistentes metodologicamente, por maior experiência dos autores com a técnica de coleta de papilas. Outra análise estatística foi

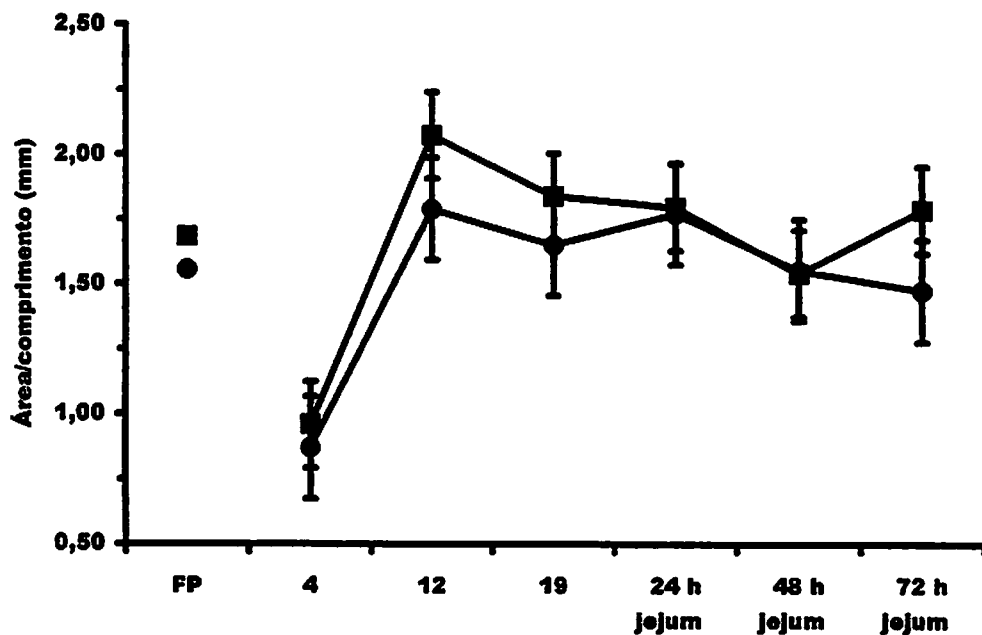


FIGURA 12: Área / comprimento das papilas do rúmen de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes ao dia e feno de gramínea *ad libitum* por 19 dias, seguidos por 72 horas de jejum. Valores ajustados para a medida da mesma variável no final do período de padronização (FP). (●) Concentrado 1 vez ao dia. (■) Concentrado 4 vezes ao dia. ( $P = 0,52$  para o efeito de tratamento;  $P < 0,001$  para efeito de dia;  $P = 0,72$  para a interação entre dia e tratamento).

executada sem os dados do dia 4, para verificar se estes seriam os únicos responsáveis pela alta significância do efeito de dia sobre a macroscopia papilar (Figura 13). Nesta análise, o efeito de dia tendeu a ser significativo ( $P = 0,07$  para efeito de dia,  $P = 0,65$  para interação entre dia e tratamento), sugerindo que o plano alimentar, independentemente da frequência de alimentação concentrada (Tabela 3), afetou a macroscopia papilar. O jejum teve efeito agudo e negativo sobre o tamanho papilar.

O índice mitótico apresentou o valor mais alto no dia 4 de aplicação dos tratamentos (Figura 14) não associado ao maior tamanho papilar [Figura 1] ( $P < 0,001$  para o efeito de dia;  $P = 0,49$  para a interação entre dia e tratamento). Como a dimensão do epitélio é resultado dos processos de síntese e deleção celular (Tamate e Fell, 1978), o efeito agudo da mudança positiva no plano alimentar não foi suficiente para induzir proliferação celular que se traduzisse em maior tamanho das papilas (Goodlad, 1981). No entanto, o efeito negativo do jejum sobre o índice mitótico e a macroscopia papilar foi agudo e unidirecional (Figuras 12 e 14). A depressão no consumo de matéria seca, observada em vacas leiteiras no período peri-parto (Vazquez-Añon et al, 1994), pode contrapor possíveis ganhos em morfologia papilar alcançados com aumento no aporte de concentrados antes do parto. O relacionamento entre taxa de proliferação celular, tamanho papilar e capacidade de absorção do epitélio ruminal no período peri-parto requer maior elucidação visando o controle racional de acidose ruminal em vacas leiteiras.

O índice mitótico foi mais alto 4 dias após a introdução dos tratamentos, declinando nos dias 12 e 19 (Figura 13) para valores próximos aos observados no último dia do período de padronização. A introdução de concentrado na dieta provavelmente causou maior produção de AGV, requerendo uma maior capacidade absorptiva do epitélio ruminal. É provável que inicialmente as células apresentaram alta taxa de divisão mitótica para atingir a massa epitelial

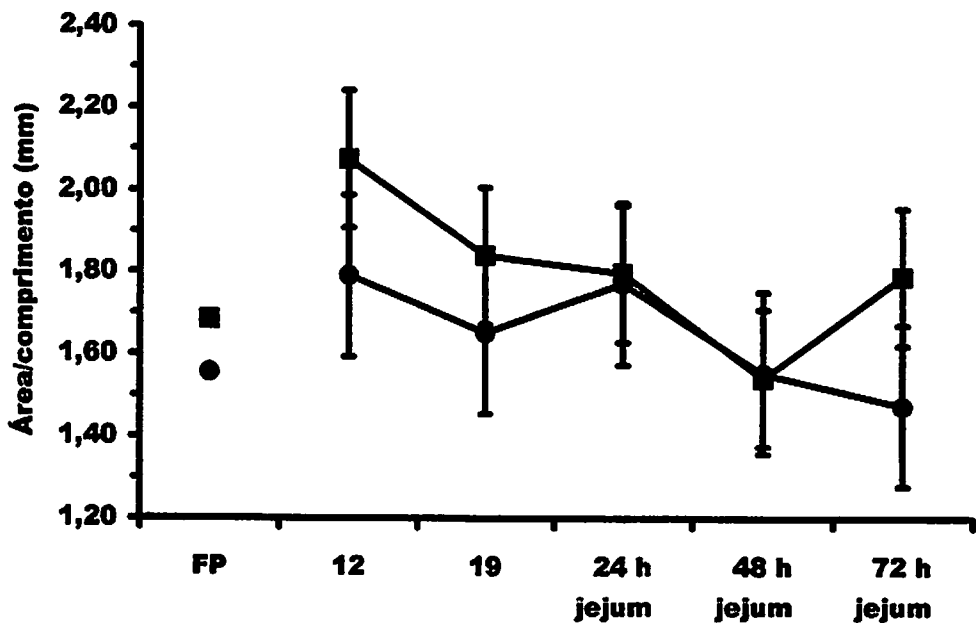


FIGURA 13: Área / comprimento das papilas do rúmen de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes ao dia e feno de gramínea *ad libitum* por 19 dias, seguidos por 72 horas de jejum. Valores ajustados para a medida da mesma variável no final do período de padronização (FP). Foram excluídos os valores do dia 4 do período de comparação. (●) Concentrado 1 vez ao dia. (■) Concentrado 4 vezes ao dia. ( $P = 0,55$  para o efeito de tratamento;  $P = 0,07$  para efeito de dia;  $P = 0,65$  para interação entre dia e tratamento).

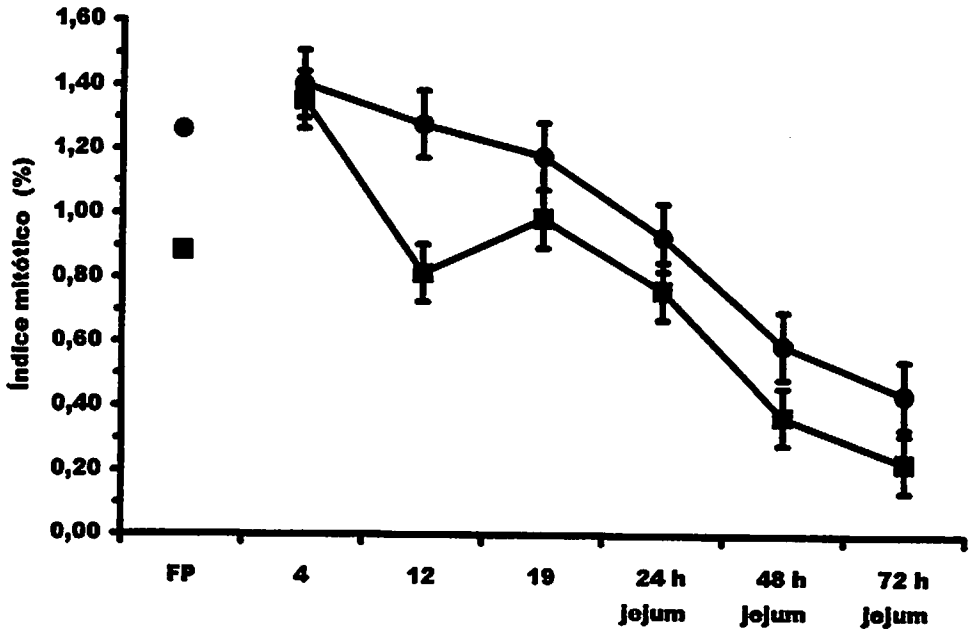


FIGURA 14: Índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes ao dia e feno de gramínea *ad libitum* por 19 dias, seguidos por 72 horas de jejum. Valores ajustados para a medida da mesma variável no final do período de padronização (FP). (●) Concentrado 1 vez ao dia. (■) Concentrado 4 vezes ao dia. ( $P = 0,03$  para o efeito de tratamento;  $P < 0,001$  para o efeito de dia;  $P = 0,49$  para a interação entre dia e tratamento).



necessária ao novo padrão de AGV, e uma vez alcançada esta massa epitelial, a taxa de divisão celular retornou aos valores iniciais necessários para manter a renovação celular normal do epitélio. Este perfil de variação no índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen foi observado em carneiros submetidos a infusão intraruminal de AGV (Sakata e Tamate, 1978; Sakata e Tamate, 1979) ou a mudança na alimentação de forragem para concentrados (Goodlad, 1981).

Os valores de índice mitótico (Figura 14) seguiram um padrão de variação negativamente associado ao pH ruminal (Figura 15) e positivamente associado aos valores de insulina plasmática [Figura 16] ( $P < 0,001$  para efeitos de dia,  $P > 0,80$  para as interações entre dia e tratamento). A correlação entre pH ruminal e concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen é negativa e alta (Pereira, 1997). Os ácidos graxos voláteis, especialmente butirato, e a insulina são prováveis mediadores de proliferação celular no epitélio ruminal (Sakata et al, 1980; Gálfi, Gäbel, Martens, 1993). Butirato é muito eficiente na estimulação de secreção de insulina (Sano et al, 1995a; Sano et al, 1995b) e foi proporcionalmente alto em cultura de microorganismos ruminais em baixo valor de pH (Strobel and Russell, 1986). Um declínio na proporção relativa de acetato e um aumento na proporção de propionato foi detectado no rúmen de carneiros que tiveram a dieta mudada de forragem para concentrados (Goodlad, 1981). Os ácidos graxos voláteis aparentemente induziram secreção sistêmica de insulina, que pode ter agido como mediadora indireta do índice mitótico no epitélio ruminal. A elucidação dos efeitos direto e indireto dos ácidos graxos voláteis sobre a proliferação e diferenciação celular no epitélio ruminal de vacas leiteiras pode propiciar maior compreensão dos mecanismos determinantes da capacidade de absorção e da ocorrência de acidose ruminal nestes animais.

O maior índice mitótico observado nos animais alimentados 1 vez ao dia (Tabela 3 e Figura 14) foi associado a variação nos valores de pH ruminal

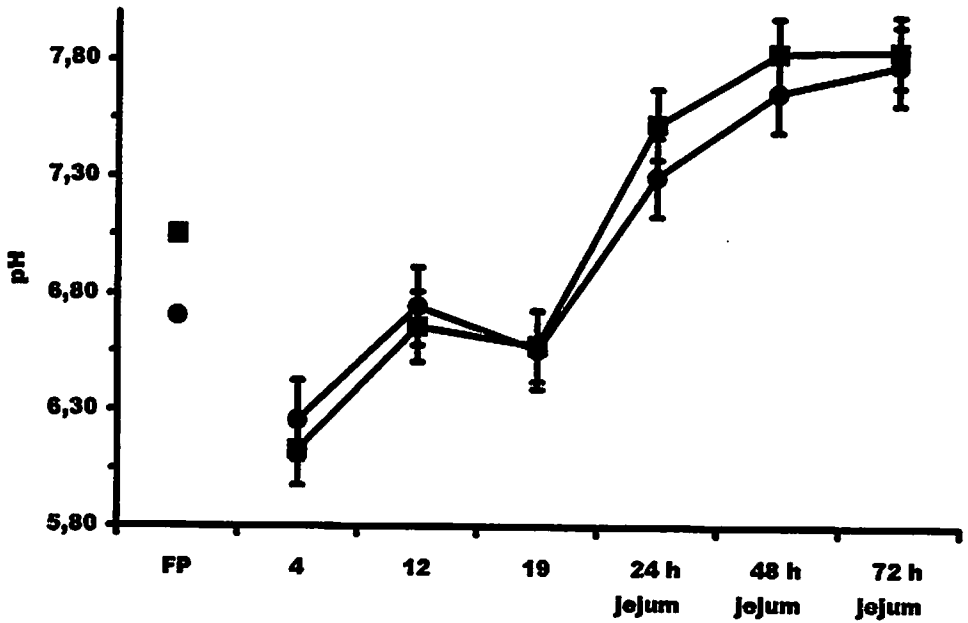


FIGURA 15: pH ruminal de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes ao dia e feno de gramínea *ad libitum* por 19 dias, seguidos por 72 horas de jejum. Valores médios ajustados para o valor da mesma variável no final do período de padronização (FP). (●) Concentrado 1 vez ao dia. (■) Concentrado 4 vezes ao dia. ( $P = 0,84$  para o efeito de tratamento;  $P < 0,001$  para efeito de dia;  $P = 0,80$  para interação entre dia e tratamento).

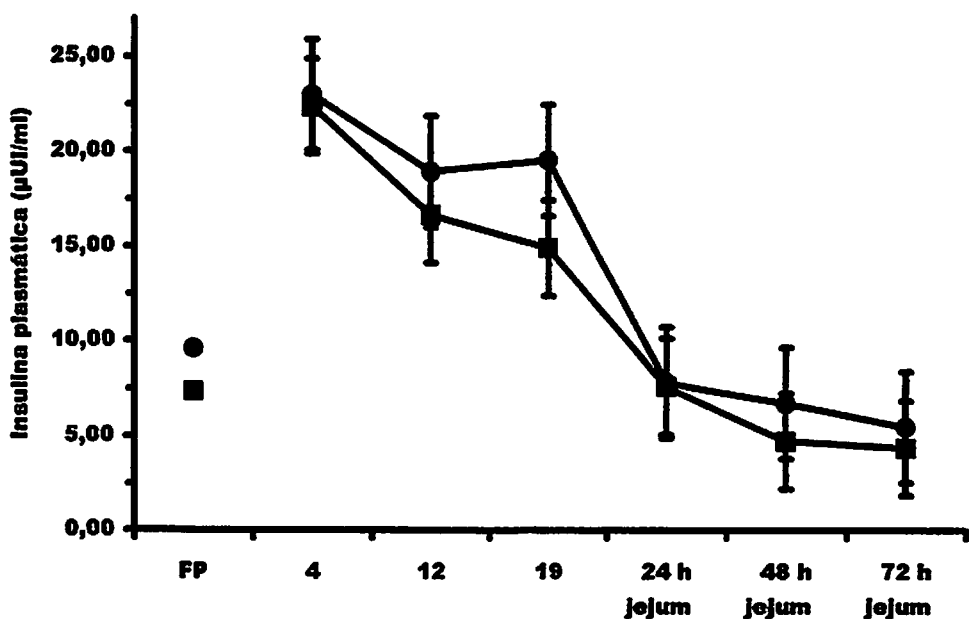


FIGURA 16: Insulina plasmática de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes ao dia e feno de gramínea *ad libitum* por 19 dias, seguidos por 72 horas de jejum. Valores médios ajustados para o valor da mesma variável no final do período de padronização (FP). (●) Concentrado 1 vez ao dia. (■) Concentrado 4 vezes ao dia. ( $P = 0,54$  para o efeito de tratamento;  $P < 0,001$  para efeito de dia;  $P = 0,86$  para interação entre dia e tratamento).

e insulina plasmática (Figuras 17 e 18) após a alimentação ( $P < 0,02$  para as interações entre tratamento e tempo,  $P > 0,79$  para as interações entre tratamento e dia), evidenciando a não obtenção de condições de constância metabólica em animais recebendo concentrado 1 vez por dia. O pH relativamente alto no tempo zero de alimentação (Figura 17) reflete provavelmente a baixa concentração de AGV, uma vez que já havia se passado quase 24 horas da última alimentação concentrada. O ligeiro aumento do pH nos primeiros 90 minutos após alimentação pode ter ocorrido porque no ato da mastigação e ingestão de alimentos há uma grande produção de saliva, com efeito tamponante sobre o pH ruminal. Por outro lado, uma queda na insulina plasmática observada neste tempo pode sugerir uma menor taxa de absorção de AGV devido ao pH relativamente mais alto (Dijkstra et al., 1993). A queda brusca e linear do pH, acompanhada em proporção inversa pela insulina plasmática, é observada nos tempos seguintes, provavelmente refletindo a alta concentração de AGV (Pereira, 1997) resultante da fermentação de maior quantidade de carboidratos prontamente fermentáveis ingeridos de uma só vez. O fornecimento de concentrado 4 vezes por dia foi aparentemente eficiente na manutenção de condições constantes de fermentação ruminal, associados a níveis constantes de insulina plasmática e menor divisão celular no epitélio ruminal (Tabela 3).

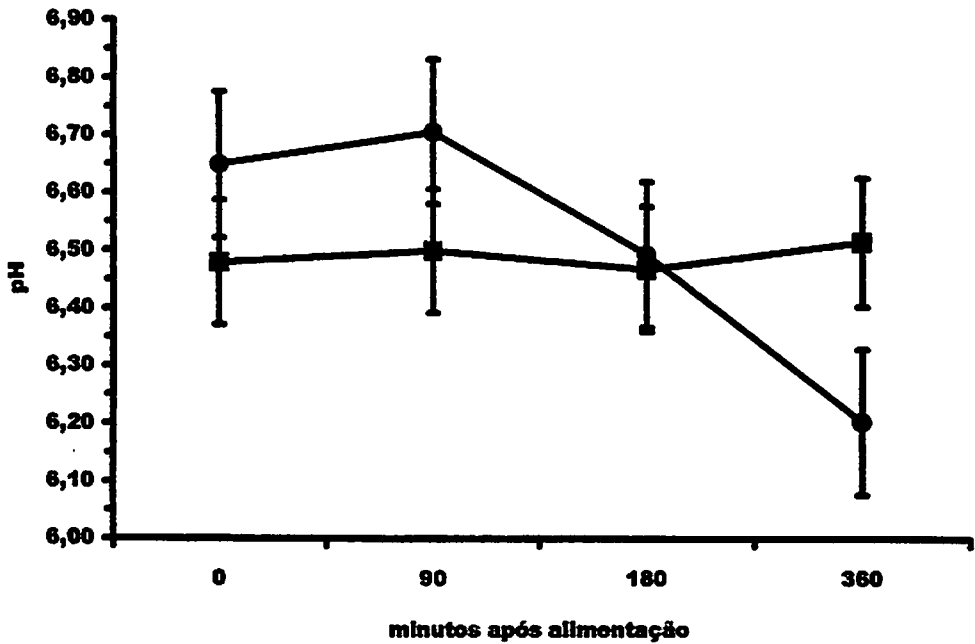


FIGURA 17: pH ruminal de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes ao dia e feno de gramínea *ad libitum* por 19 dias. Valor médio de cada tempo nos dias 4, 12 e 19 do período de comparação, ajustados para o valor da mesma variável em cada tempo no final do período de padronização. (●) Concentrado 1 vez ao dia. (■) Concentrado 4 vezes ao dia. ( $P < 0,001$  para a interação entre tratamento e tempo,  $P = 0,83$  para a interação entre tratamento e dia).

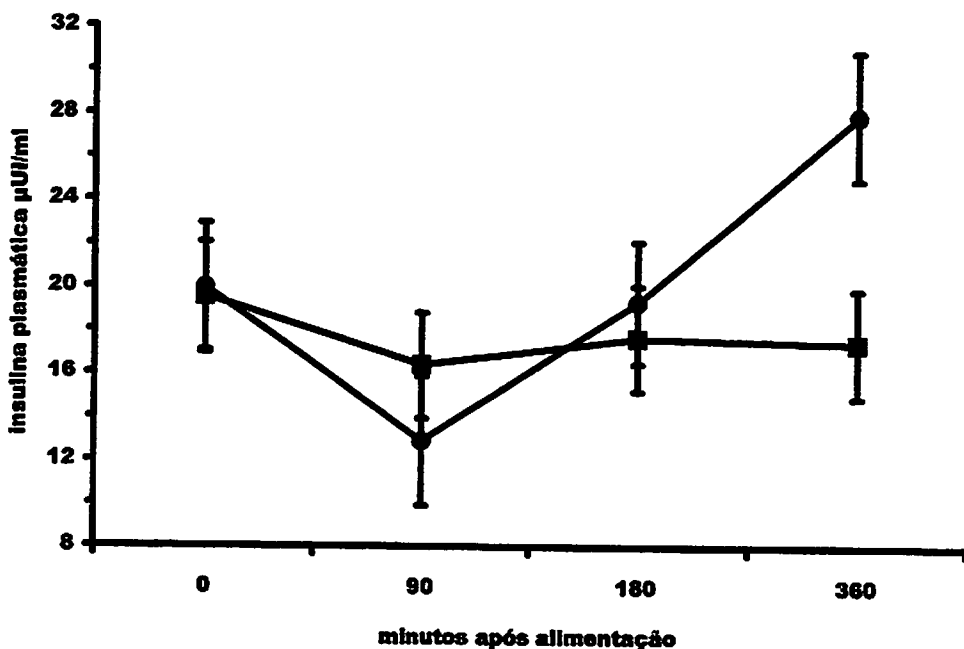


FIGURA 18: Insulina plasmática de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes ao dia e feno de gramínea *ad libitum* por 19 dias. Valor médio de cada tempo nos dias 4, 12 e 19 do período de comparação, ajustados para o valor da mesma variável em cada tempo no final do período de padronização. (●) Concentrado 1 vez ao dia. (■) Concentrado 4 vezes ao dia. ( $P < 0,02$  para a interação entre tratamento e tempo,  $P = 0,79$  para a interação entre tratamento e dia).

## 5 CONCLUSÃO

Apesar de baixa frequência de alimentação concentrada não ter induzido diferenças macroscópicas na morfologia das papilas do rúmen, as respostas em pH ruminal, insulina plasmática e índice mitótico do epitélio ruminal sugerem que o fornecimento de concentrado em baixa frequência diária, nas últimas semanas de gestação, pode ser uma estratégia de manejo capaz de induzir maior tamanho papilar, podendo reduzir a incidência de acidose no pós-parto de vacas leiteiras. O jejum acentuado, no entanto, pode ter efeitos deletérios sobre a morfologia das papilas do rúmen. Práticas alimentares que visem aumentar a capacidade de absorção da parede do rúmen e que evitem a queda no consumo de matéria seca observada no período peri-parto podem ser indicadas para maior eficácia dos programas alimentares de vacas leiteiras nas últimas semanas de gestação.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


- BOTTENSTEIN, J.M. ; HAYASHI, I. ; HUTCHINGS, S. ; MASUI, H. ; MATHER, J. ; MCCLURE, D.B. ; OHASA, S. ; RIZZINO, A. ; SATO, G. ; SRRERO, G. ; WOLFE, R. ; WU, R. **Methods in Enzymology**. London: Academic Press, 1979. Vol. LVIII, 94 p.
- BROWNLEE, A. **The development of rumen papillae in cattle fed on different diets**. *British Veterinary Journal*. v. 112, p. 369. 1956.
- BULLOUGH, Ws. **The control of epidermal thickness.2**. *British Journal of Dermatology*. v. 87, p. 87-347. 1972.
- CHRISTENSEN, J.O. ; GRUMMER, R.R. ; RASMUSSEN, F. ; BERTICS, S.J. **Propylene glycol delivery method influences plasma metabolites of feed restricted cattle**. *Journal of Dairy Science*. v. 80, p. 563. 1997.
- CRICHLow, E.C. ; CHAPLIN, R.K. **Ruminal lactic acidosis: Relationship of forestomach motility to nondissociated volatile fatty acids levels**. *American Journal Veterinary Research*. v. 46, p. 1908-11. Sept. 1985.
- DIJKSTRA, J.; BOER h.; VAN BRUCHEM J.; BRUINING M.; TAMMINGA S. **Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume**. *British Journal of Nutrition*. v.69, p. 385. Mar. 1993.
- DIRKSEN, G. ; LIEBICH, H.G. ; BROSI, G. ; HAGEMEISTER, H. ; MAYER, E. **Morphologie der pansenschleimhaut und fettsäureresorption beim rind - bedeutende faktoren für gesundheit und leistung**. *Zentralblatt für Veterinar Medizin*. v. 31, p. 414-30. July 1984.
- ELLIOTT, 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*. v. 78, p. 1512-25. July 1995.
- EMERY, R.S. ; BURG, N. ; BROWN, L.D. ; BLANK, G.N. **Detection, occurrence, and prophylactic treatment of borderline ketosis with propylene glycol feeding**. *Journal of Dairy Science*. v. 47, p. 1074. 1964.



- FLATT, W.P. ; WARNER, R.G. ; LOOSLI, J.K. **Influence of purified materials on the development of the ruminant stomach.** Journal of Dairy Science. v. 41, p. 1593. 1958.
- FRONK, T. J. **The effect of propylene glycol on milk fat depression.** Madison: University of Wisconsin, 1975. (M.S. Thesis)
- GÄBEL, G., MAREK, M. ; MARTENS, H. **Influence of food deprivation on SCFA and electrolyte transport across sheep reticulorumen.** Journal Veterinary Medicine. v. 40, p. 339-44. 1993.
- GAEBEL, G. ; MARTENS, H. ; SUENDERMANN, M. ; GÁLFI, P. **The effect of diet, intraruminal pH and osmolarity on sodium, chloride and magnesium absorption from the temporarily isolated and washed reticulorumen of sheep.** Quarterly Journal of Experimental Physiology. v. 72, p. 501-11. Oct. 1987.
- GÁLFI, P. ; GÄBEL, G. ; MARTENS, H. **Influence of extracellular matrix components on the growth and differentiation of ruminal epithelial cells in primary culture.** Research Veterinary Science. v. 54, p. 102-09. Jan. 1993.
- GÁLFI, P. ; NEOGRÁDY, S. ; KUTAS, F. **Dissimilar ruminal epithelial response to short-term and continuous intraruminal infusion of sodium n-butyrate.** Journal Veterinary Medicine, v. 33, p. 47-52. Jan. 1986.
- GÁLFI, P. ; VERESEGYHÁZY, T. ; NEOGRÁDY, S ; KUTAS, F. **Effect of sodium n-butyrate on primary ruminal epithelial cell culture.** Zentralblatt für Veterinar Medizin. v. 28, p. 259-61. 1981.
- GINSBURG, E. ; SALAMON, D. ; SREEVALSAN, T. ; FREESE, E. **Growth inhibition and morphological changes caused by lipophilic acids in mammalian cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. v. 70, p. 2457-61. Aug. 1973.
- GOODLAD, R. A. **Some effects of diet on the mitotic index and the cell cycle of the ruminal epithelium of sheep.** Quarterly Journal of Experimental Physiology. v. 66, p. 487-99. Oct. 1981.
- GRANT, R. J. ; MERTENS, D. R. **Influence of buffer pH and raw cornstarch addition on in vitro fiber digestion kinetics.** Journal Dairy Science. v. 75, p. 2762-68. Oct 1992.

- GREENWOOD, R. H. ; MORRIL, J. L. ; TITGEMEYER, E.C. ; KENNEDY, G.A. **A new method of measuring diet abrasion and its effect on the development of the forestomach.** *Journal of Dairy Science.* v. 80, p. 2534-41. Oct. 1997.
- HARRISON, K.B. ; WARNER, R.G. ; SANDER, E.G. ; LOOSLI, J.K. **Changes in the tissue and volume of the stomachs of calves following the removal of dry feed or consumption of inert bulk.** *Journal of Dairy Science.* v. 43, p. 1301. 1960.
- HENRIKSON, R.C. **Ultrastructure of ovine ruminal epithelium and localization of sodium in in the tissue.** *Journal Ultrastructure Research.* v. 34, p. 385-401. Feb. 1970.
- JORDAN, H. N. & PHILIPS, R. W. *American Journal of Physiology.* v 234 , p.162. 1978.
- KNOX, K.L. ; WARD, F.M. **Rumen concentrations of volatile fatty acids as affected by feeding frequency.** *Journal of Dairy Science.* v. 44, p. 1550. 1961.
- LANE, M.A.; JESSE, B.W. **Effect of volatile fatty acid infusion on development of the rumen epithelium in neonatal sheep.** *Journal of Dairy Science.* v. 80, p. 740-6. Apr. 1997.
- LAVKER, R ; GEDEON MATOLTSY, A. **Formation of horny cells: The fate of cell organelles and differentiation products in ruminal epithelium.** *Journal Cell Biology.* v. 44, p. 501-12. Mar. 1970.
- LAVKER, R. ; CHALUPA, W. ; DICKEY, J.F. **An electron microscopic investigation of rumen mucosae.** *Journal. Ultrastructure Research.* v. 28, p. 1-15. July 1969.
- LEEK, B. F. ; HARDING, R.H. **Sensory nervous receptors in the ruminant stomach and the reflex control of reticuloruminal motility.** In: *Proc. 4<sup>th</sup> Int. Sym. Rum. Phys., Digestion and metabolism in the ruminant.* I. W. McDonald and A. C. I. Warner, ed. Sydney, Australia, 1975. p 60.
- LITTELL, R.C. ; MILLIKEN, G.A. ; STROUP, W.W. ; WOLFINGER, R.D. **SAS<sup>®</sup> system for mixed models.** SAS Institute Inc, Cary, NC. 1996. 633 p.

- MANN, J.G. ; BODA, J.M. ; WILLES, R.F. **Probable role of propionate and butyrate in control of insulin secretion in sheep.** American Journal of Physiology. v. 212, p.756-64. Apr. 1967.
- MCGAVIN, M. D.; MORRIL, J. L. **Scanning electron microscopy of ruminal papillae in calves fed various amount and forms of roughage.** American Journal of Veterinary Research. v. 37, p. 497. May 1976.
- MINEO, H. ; KANAI, M. ; KATO, S. ; USHIJIMA, J. **Effects of intravenous injection of butyrate, valerate and their isomers on endocrine pancreatic responses in conscious sheep (*ovis aries*).** Comparative biochemistry and Physiology. v. 95, p. 411-16. 1990.
- MINOR, D.J.; TROWER, S. L.; STRANG, B. D.; SHAVER, R. D.; GRUMMER, R.R. **Effects of nonfiber carbohydrate and niacin on periparturient metabolic status and lactation of dairy cows.** Journal of Dairy Science. v. 81, p. 189-200. Jan. 1998.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle,** 6 ed. Natl. Acad. Sci., Washington : DC,1989.
- OHWADA, S. ; TAMATE, H. **Circadian rhythm of the mitotic index in the rumen epithelium of sheep.** Tohoku Journal of Agricultural Research. v. 33, p. 138-41. 1983.
- OHWADA, S. ; TAMATE, H. **DNA microphotometry on ruminal epithelial cells in the sheep.** Tohoku Journal of Agricultural Research. v. 30, p. 16-19. 1979.
- PEREIRA, M. N. **Responses of lactating cows to dietary fiber from alfalfa or cereal byproducts.** Madison: University of Wisconsin, 1997. 186 p. (Ph.D.-Thesis- Animal nutrition).
- PERRIER, R. ; FERCHAL, E. ; DURIER, C. ; DOREAU, M.. **Effect of undernutrition on the ability of the sheep rumen to absorb volatile fatty acids.** Reproduction Nutrition Development. v. 34, p. 341-47. 1994. The
- SANDER, E.G. ; WARNER, R.G. ; HARRISON, H.N. ; LOOSLI, J.K. **Stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosae in the young calf.** Journal of Dairy Science. v 42, p. 1600. 1959.

- 
- SAKATA, T. **Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fiber, gut microbes and luminal trophic factors.** British Journal of Nutrition. v. 58, p. 95-103. 1987.
- SAKATA, T. ; HIKOSAKA, K. ; SHIOMURA, Y. ; TAMATE, H. **Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep.** British Journal of Nutrition. v. 44, p. 325-31. Nov. 1980.
- SAKATA, T. ; TAMATE, H. **Rumen epithelium cell proliferation accelerated by propionate and acetate.** Journal of Dairy Science. v. 62, p. 49-52. Jan. 1979.
- SAKATA, T. ; TAMATE, H. **Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate.** Journal of Dairy Science. v. 61, p. 1109-13. Aug. 1978 a.
- SAKATA, T. ; TAMATE, H. **Presence of circadian rhythm in the mitotic index of the ruminal epithelium in sheep.** Research in Veterinary Science. v. 34, p. 1-3. Jan. 1978 b.
- 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. v. 27, p. 133-35. Dec. 1976.
- 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. v. 25, p. 156-63. 1974.
- SANDER, E.G. ; WARNER, R.G. ; HARRISON, H.N. ; LOOSLI J.K.. **The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosae in the young calf.** Journal of Dairy Science. v. 42, p. 1600. 1959.
- SANO, H. ; HAYAKAWA, S. ; TAKAHASHI, H. ; TERASHIMA, Y. **Plasma insulin and glucagon responses to propionate infusion into femoral and mesenteric veins in sheep.** Journal Animal Science. v. 73, p. 191-97. Jan. 1995.

SANO, H. ; TANO, S. ; TAKAHASHI, H. ; TERASHIMA, Y. Dose response of plasma insulin and glucagon to intravenous n-butyrate infusion in sheep. *Journal Animal Science*. v.73, p. 3038-43. 1995.

SCHNORR B. ; VOLLMERHAUS. The vascular system of the rumen of cattle and goats. *Zentralblatt für Veterinar Medizin*. v. 15, p. 799-828. Dec. 1968.

STROBEL, H.J. ; RUSSEL, J.B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *Journal of Dairy Science*. v. 69, p. 2941-47. Nov. 1986.

SUTTON, J.D. ; MCGILLIARD, A.D. ; JACOBSON, N.L. Functional development of rumen mucosae. I. Absorptive ability. *Journal of Dairy Science*. v. 46, p. 426-36. 1963. }

TAMATE H. ; FELL, B.F.. Cell deletion as a factor in the regulation of rumen epithelial populations. *Veterinary Science Communications*. v. 1, p. 359-64. 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*. v. 25, p. 142-55. 1974.

TAMATE, H. ; MCGILLIARD, A.D. ; JACOBSON, N.L. ; GETTY, R The effect of various diets on the anatomical development of the stomach in the calf. *Journal of Dairy Science*. v. 45, p. 408-20. 1962.

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

VAUGHN A.S., GRUMMER, R.R. ; BERTICS, S.J. Effect of Prepartum Propylene Glycol Administration on Periparturient Fatty Liver in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. v. 76, p. 293132. 1993.

VAZQUEZ-AÑON, M. ; BERTICS, S.J. ; LUCK, M. ; GRUMMER, R.R. ; PINHEIRO, J.C.. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v. 77, p. 1521-28. June 1994.