



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

MARIA VIVIANNE FREITAS GOMES DE MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO DOS PRÉ-ESTÔMAGOS DE BEZERROS MESTIÇOS
ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ**

MOSSORÓ

2017

MARIA VIVIANNE FREITAS GOMES DE MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO DOS PRÉ-ESTÔMAGOS DE BEZERROS MESTIÇOS
ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semiárido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Produção Animal

Orientador: Prof. Dra Patrícia de Oliveira Lima

Co-orientador: Prof. Dr. José Domingues Fontenele Neto

MOSSORÓ

2017

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

M672d Miranda, Maria Vivianne Freitas Gomes de .
Desenvolvimento dos pré-estômagos de bezerros mestiços aleitados com leite em pó associado ao soro de queijo em pó / Maria Vivianne Freitas Gomes de Miranda. - 2017.
80 f. : il.
Orientadora: Patrícia de Oliveira Lima.
Coorientador: José Domingues Fontenele Neto.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em -- Seleção um Curso ou Programa--, 2017.
1. abomaso. 2. poligástricos. 3. proliferação celular. 4. rúmen. I. Lima, Patrícia de Oliveira , orient. II. Neto, José Domingues Fontenele, coorient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

MARIA VIVIANNE FREITAS GOMES DE MIRANDA

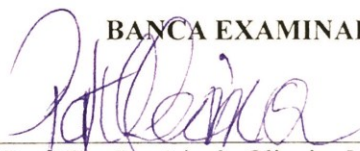
**DESENVOLVIMENTO DOS PRÉ-ESTOMAGOS DE BEZERROS MISTIÇOS
ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semiárido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Produção animal

Defendida em: 21/ 08 / 2017.

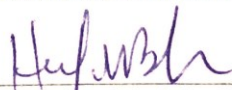
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Patrícia de Oliveira Lima (UFERSA)
Presidente



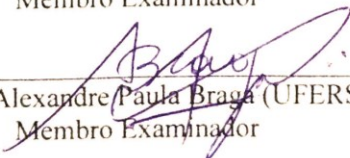
Prof. Dr. José Domingues Fontenele Neto (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dr. Hilton Felipe Marinho Barreto (IFRN)
Membro Examinador Externo



Prof. Dr. Liz Carolina da Silva Lagos Cortes Assis (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dr. Alexandre Paula Braga (UFERSA)
Membro Examinador

*Ao meu avô Francisco de Assis Gomes, se
pudesse te ver, te veria orgulhoso.*

Dedico

*A minha Família e a Patrícia de Oliveira
Lima.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pois somente com a sua mão sobre cada ato e decisão tomada por mim em minha vida pessoal e profissional é que foi possível minha chegada até aqui, e somente por sua vontade poderei crescer e chegar ainda mais longe.

Ao meu avô **FRANCISCO DE ASSIS GOMES** (*in memorian*), as frases que escrevo nesta folha são poucas para agradecer tudo o que fez por mim e meus irmãos. O senhor foi meu pai. Lembro-me que sempre perguntava como ia o doutorado, e hoje essa conquista não terá a mesma alegria sem a sua presença. Não vou poder te mostrar o diploma de doutora, assim como fiz no mestrado, ou conversar sobre os planos futuros como costumávamos fazer no caminho para faculdade. De fato, a vida perdeu um pouco do brilho sem a sua presença, mas sei que onde o senhor estiver, estará orgulhoso olhando por mim. Obrigada meu avô por ter dividido numa época do tempo alguns anos comigo. Só me resta dedicar e agradecer ao senhor essa conquista.

A minha mãe, **MARIA DO SOCORRO FREITAS GOMES** pelo exemplo de mulher que é, sempre me incentivando para, assim como ela, estudar e alcançar os meus objetivos. Ao meu pai **ANTÔNIO FERNANDO MARTINS DE MIRANDA** que embora longe sempre tentou se fazer presente nas horas em que precisei. Ao meu padrasto **JOSÉ BARBOSA DE ASSIS** sempre muito prestativo e pronto para ajudar. Aos meus irmãos **CAROL** e **SAULO** pelo apoio e amizade.

A minha avó **MARIA JOSEANA FREITAS GOMES** por ajudar na minha educação e, com a minha mãe, sempre mostrar o caminho certo a seguir modelando o meu caráter e me tornando uma pessoa melhor. A minha avó paterna **DONA LINDALVA** pelo amor e zelo sempre dedicados. A minha amada bisavó **ANTÔNIA LOPES DE FREITAS** (*in memorian*), a **VOVÓ TOINHA**, que sempre sonhou com minha formação. A senhora sempre estará em meu coração embora não mais presente em vida. A tio **JOSEAN** (*in memorian*). A todos os tios e tias (principalmente tia **JOSENITA** e **GORETI** que nos momentos mais difíceis sempre me deram palavras de sabedoria e apoio). Aos primos e primas pela amizade compartilhada em momentos de alegria e tristeza (especialmente a **BÁRBARA FREITAS**).

Ao meu companheiro **JOÃO PAULO MORAES DE AMORIM**, pela paciência e por abdicar do seu lazer para me fazer companhia nos dias em que passei estudando. Por todo o apoio e ajuda ao longo desses anos de convivência.

À minha orientadora e amiga **PATRÍCIA DE OLIVEIRA LIMA** pelos ensinamentos em todos os setores de minha vida, pelo conhecimento que acrescentou em minha formação, me servindo também como um exemplo a ser seguido. Pela confiança em mim depositada, serei sempre grata a você por todas às oportunidades tão preciosas que apareceram em minha vida e que me fizeram ser cada vez mais comprometida e orgulhosa para com a minha profissão. Obrigada por me mostrar o que é ser uma verdadeira profissional. Levarei para sempre a amizade, o aprendizado e o exemplo de todos esses anos de parceria.

Às minhas amigas **HÉLIA LEITE e ANA PAULA** por todas as histórias que compartilhamos, os conselhos, preocupação, carinho, amor e amizade. Por todas as vezes que se fizeram presente em momentos de alegria e tristeza. A **RENATA NAYHARA DE LIMA** pela força e apoio, sempre prestativa e pronta para ajudar no que fosse preciso.

Ao meu co-orientador **JOSÉ DOMINGUES FONTENELE NETO**, que apesar do pouco convívio pude notar ser uma pessoa extremamente comprometida e honesta, sempre se fazendo presente e ajudando em meu trabalho. Gostaria de agradecer, sobretudo a confiança em mim depositada, pois sei o quanto é difícil aceitar trabalhar com pessoas estranhas ao nosso convívio. Muito obrigada pela oportunidade.

Aos meus amigos do “lab.” **TIAGO TEÓFILO, VIVIANNE** (*in memorian*), **RAONY e SÉRVULO**, com muita paciência me ajudaram e aconselharam, sem vocês eu não teria conseguido finalizar esse trabalho. Ao amigo **TIAGO TEÓFILO** principalmente, que desde o começo se fez presente ajudando, dando força mesmo quando eu estava sem esperanças.

Ao pesquisador **ANDERS ANDRÉN** pelos anticorpos enviados. Sem sua ajuda esse trabalho não teria saído do papel, e apesar de nunca ter falado pessoalmente com o senhor o considero como amigo, talvez um dia eu possa agradecer pessoalmente a sua generosidade.

A todos os **PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL** da UFERSA por todos os conhecimentos transmitidos. À instituição financiadora **CAPES**, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento do trabalho.

A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Objetivou-se avaliar o desenvolvimento dos pré-estômagos, o crescimento e a taxa de proliferação celular das papilas ruminais, em bezerros aleitados com sucedâneos (leite em pó e soro de queijo em pó) durante os 60 primeiros dias de vida. Verificar se a dieta pode influenciar as células produtoras de quimosina e pepsinogênio. Para isso, 24 bezerros mestiços com uma semana de vida foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 4 (quatro) tratamentos e 6 (seis) repetições: LI: leite integral (Controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó. Para os cálculos de consumo de matéria seca (MS) foram feitas medições diárias de consumo de feno e concentrado pelo método de oferta/sobra. Os animais foram abatidos aos 60 dias de vida. Os órgãos cavitários foram pesados com conteúdo, e logo em seguida, esvaziados e novamente pesados, registrando-se, os pesos cheios e vazios, respectivamente. Foi determinado o peso dos estômagos e de seus compartimentos com valores absolutos (kg) e relativos (%) em função do peso de corpo vazio (% PCVZ) e em função do peso do estômago completo (% PE). Foram retirados fragmentos de aproximadamente um centímetro quadrado (1cm^2) de tecidos de 4 regiões do rúmen: átrio ruminal, saco dorsal, saco cego caudo-dorsal e saco ventral de onde foram medidas as alturas das papilas ruminais. A atividade proliferativa foi avaliada em amostras de tecidos retiradas do rúmen por meio da contagem de Regiões Organizadoras de Nucléolos Argirofílicos (AgNOR). Foram coletadas amostras teciduais de 1cm^2 do abomaso para a realização da imunohistoquímica. Não houve diferença significativa para o consumo de matéria seca ($P>0,05$). As médias obtidas para pesos absolutos e relativos em função do peso do corpo vazio dos compartimentos gástricos não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos. Quanto ao desenvolvimento de papilas no rúmen houve diferenças significativas ($P<0,05$) para a variável altura no saco ventral, onde os animais que receberam leite integral possuíram maiores médias. Não houve diferenças significativas ($P>0,05$) para a taxa de proliferação celular nas papilas ruminais. Os percentuais de ácidos contendo células imunorreativas aos anticorpos quimosina e pepsinogênio apresentaram diferença estatística ($P<0,05$), onde os bezerros que receberam a dieta 100% leite integral, apresentaram média percentual de marcação para quimosina superior (95,11%), aqueles animais que consumiram a dieta 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó (89,59%).

Palavras chaves: abomaso, poligástricos, proliferação celular, rúmen

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of whey powder associated with powdered milk as a substitute for whole milk without breastfeeding until 60 days of age on the development of pre-stomachs, growth and proliferation rate Cellular of the ruminal papillae, as well as an influence of the diets on as chymosin and pepsinogen producing cells of the calf abomasum through the immunohistochemical technique. To that end, 24 crossbred calves with one week of life were distributed in a completely randomized design with four treatments and six replicates: LI: whole milk (Control); LP: milk powder; LPS1: 80% milk powder + 20% whey powder; LPS2: 60% milk powder + 40% whey powder cheese. For the methods of dry matter (DM) consumption, measurements of hay consumption and concentrate are made by the supply / surplus method. The animals were slaughtered at 60 days of age. The cavity organs were weighed with contents, and soon thereafter emptied and newer, registering, full and empty weights, respectively. The weight of the stomach and its compartments were determined with absolute values (kg) and relative (%) as a function of the empty body weight (%PCVZ) and as a function of the weight of the whole stomach (%PE). Fragments of approximately one square centimeter (1cm²) of tissues were collected from 4 regions of the world: rumen atrium, dorsal sac, caudate-dorsal blind sac and ventral sac from where they are measured as heights of ruminal papillae. Proliferative activity was evaluated in tissue samples collected by counting Argiophilic Nucléole Organisms (AgNOR). Tissue samples of 1 cm² of the abomasum were collected for immunohistochemistry. There was no difference for dry matter intake ($P > 0.05$). As averages obtained for absolute and relative weights as a function of the empty body weight of the digital compartments did not present significant residues ($P > 0.05$) between the treatments. Regarding the development of non-rumen papillae There were significant ($P < 0.05$) for a height variable in the ventral sac, where animals receiving whole milk had higher averages. There were no significant differences ($P > 0.05$) for the rate of cell proliferation in ruminal papillae. The percentage of acini with immunoreactive cells to the chymosin and pepsinogen antibodies presented a statistical difference ($P < 0.05$), where the calves that received a 100% whole milk diet presented a mean percentage of marking for upper chymosin (95.11%), Animals that consumed 60% milk powder + 40% whey powder (89.59%).

Keywords: abomasum, polygastretrics, cell proliferation, rumen

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III: HISTOMORFOMETRIA DE PAPILAS RUMINAIS E ATIVIDADE PROLIFERATIVA DA MUCOSA RUMINAL DE BEZERROS MESTIÇOS ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ

- Figura 1 – Cortes histológicos longitudinais da região ventral do rúmen de bezerros corados em HE (40X). A) Papilas ventrais de bezerros recebendo a dieta (LI). B) Papilas ventrais de bezerros recebendo a dieta (LP). C) Papilas ventrais de bezerros recebendo a dieta (LPS1). D) Papilas ventrais de bezerros recebendo a dieta (LPS2) 57
- Figura 2 – Região ventral do rúmen de bezerros: técnica de coloração pela prata (AgNOR). Os pontos negros nos núcleos são as regiões organizadoras de nucléolo (NORs), magnitude (100x). Tecido conjuntivo (TC). Epitélio (Ep) 60

CAPÍTULO IV: IMUNOHISTOQUÍMICA PARA QUIMOSINA E PEPSINO GÊNIO NO ABOMASO DE BEZERROS RECEBENDO SORO DE QUEIJO EM PÓ ASSOCIADO AO LEITE EM PÓ

- Figura 1 – Imunohistoquímica para quimosina no abomaso de bezerros recebendo diferentes dietas (40X). A) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LI) B) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LP) C) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LPS1) D) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LPS2) 76
- Figura 2 – Imunohistoquímica para quimosina no abomaso de bezerros recebendo diferentes dietas (40X). A) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LI) B) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LP) C) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LPS1) D) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LPS2) 78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOHISTOLÓGICA DE BEZERROS ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ RECONSTITUIDOS

Tabela 1	–	Composição centesimal da dieta líquida fornecida aos bezerros.....	36
Tabela 2	–	Teores de proteína (P), gordura (G), lactose (LAC), extrato seco (ES) com base no extrato seco para as diferentes dietas líquidas.....	36
Tabela 3	–	Composição centesimal da ração concentrada fornecida aos bezerros.....	37
Tabela 4	–	Composição químico-bromatológica do concentrado e do feno de capim tifton-85 fornecido aos bezerros	37
Tabela 5	–	Peso absoluto (Kg) e coeficiente de variação dos compartimentos estomacais de bezerros recebendo dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó.....	39
Tabela 6	–	Peso relativo (%) média e coeficiente de variação em relação ao peso do corpo vazio de bezerros recebendo dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó.....	40
Tabela 7	–	Participação percentual e coeficiente de variação dos compartimentos gástricos vazios em relação ao peso total do estômago vazios de bezerros recebendo dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó.	40
Tabela 8	–	Peso absoluto e coeficiente de variação do conteúdo dos compartimentos gástricos de bezerros recebendo dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó.....	42

CAPÍTULO III: HISTOMORFOMETRIA DE PAPILAS RUMINAIS E ATIVIDADE PROLIFERATIVA DA MUCOSA RUMINAL DE BEZERROS MESTIÇOS ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ

Tabela 01	–	Consumo médio de matéria seca total de bezerros submetidos a dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó (g/bezerro/dia)	54
-----------	---	--	----

Tabela 02	– Médias de altura (mm) de papilas ruminais em bezerros submetidos a dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó	55
Tabela 03	– Contagem de AgNOR/núcleo nas células epiteliais das papilas da região ventral do rúmen de bezerros recebendo dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó	58

CAPÍTULO IV: IMUNOHISTOQUÍMICA PARA QUIMOSINA E PEPSINOGENO NO ABOMASO DE BEZERROS RECEBENDO SORO DE QUEIJO EM PÓ ASSOCIADO AO LEITE EM PÓ

Tabela 01	– Percentuais de ácinos contendo células imunorreativas a quimosina e ao pepsinogênio em bezerros alimentados com dietas contendo soro de queijo associado ao leite em pó.....	73
-----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias Produtoras de Queijo
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AgNOR	Regiões Organizadoras de Nucléolos Argirofílicos
AGV'S	Ácidos Graxos Voláteis
CMS	Consumo de Matéria Seca
CMMST	Consumo Médio de Matéria Seca Total
CV	Coeficiente de Variação
DAB	Diaminobenzidina
EE	Extrato Etéreo
EP	Epitélio
ES	Extrato Seco
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
G	Gordura
HCL	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LAC	Lactose
LI	Leite integral
LP	Leite em pó
LPS1	80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó
LPS2	60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó
MM	Matéria mineral
MS	Matéria seca
NORs	Regiões Organizadoras de Nucléolo
PCVZ	Peso do corpo vazio
PE	Peso do estômago completo
P	Proteína
PB	Proteína Bruta
PH	Potencial hidrogeniônico
TC	Tecido conjuntivo
TTBS	Solução salina de tampão tris com tween 20

LISTA DE SÍMBOLOS

@	Arroba
Kg	Kilograma
®	Marca registrada
mm	Milímetro
μm	Micrometro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
2.	OBJETIVOS	20
2.1.	Objetivo Geral	20
2.2.	Objetivos Específicos	20
 CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA		21
1.	UTILIZAÇÃO DE DIETAS ALTERNATIVAS PARA BEZERROS NO SISTEMA DE PRODUÇÃO LEITEIRO	22
2.	FISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL DE ANIMAIS RUMINANTES.....	23
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOHISTOLÓGICA DE BEZERROS ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ RECONSTITUIDOS.....		32
1.	INTRODUÇÃO	35
2.	MATERIAL E MÉTODO	36
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.	CONCLUSÕES	43
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
 CAPÍTULO III: HISTOMORFOMETRIA DE PAPILAS RUMINAIS E ATIVIDADE PROLIFERATIVA DA MUCOSA RUMINAL DE BEZERROS MESTIÇOS ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ.....		46
1.	INTRODUÇÃO	49
2.	MATERIAL E MÉTODO	51
2.1.	Práticas laboratoriais.....	51
2.1.1	Processamento histológico e histomorfometria.....	51

2.3.	Preparação de lâminas histológicas para técnica AgNORS.....	52
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
4.	CONCLUSÕES	62
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

**CAPÍTULO IV: IMUNOHISTOQUÍMICA PARA QUIMOSINA E
PEPSINOGENO NO ABOMASO DE BEZERROS RECEBENDO
SORO DE QUEIJO EM PÓ ASSOCIADO AO LEITE EM PÓ.....**

1.	INTRODUÇÃO	66
2.	MATERIAL E MÉTODO	69
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	71
4.	CONCLUSÕES	73
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

O avanço na pecuária leiteira nos últimos anos vem modificando o cenário da bovinocultura de leite, devido à intensificação da produção. Em 2014, a produção brasileira de leite foi de 35,2 bilhões de litros, um aumento de 2,7% sobre o ano anterior. O rebanho bovino do Brasil no ano de 2015 foi de aproximadamente, 215,2 milhões de animais (IBGE, 2016). Com isso, o Brasil ocupou a quinta posição no ranking mundial de produção de leite, atrás de União Europeia, Índia, Estados Unidos e China (IBGE, 2015). O alto valor pago pelo produto neste ano deve motivar os criadores de gado leiteiro a investirem na expansão dos mercados, ocorrendo o crescimento do rebanho, inclusive bezerros machos, que representam um problema na indústria de produção leiteira.

No Brasil, os machos provenientes de plantéis especializados com predominância de genética européia, principalmente da raça holandesa, usualmente são eliminados logo ao nascimento e representam grande desperdício para os produtores que trabalham com maiores custos de produção. O descarte desses animais decorre das dificuldades impostas à sua criação pelas suas elevadas exigências em nutrição, sanidade e conforto (Júnior et. al. 2008). De maneira geral, os produtores sacrificam ou vendem estes animais a preços muito baixos. Quando permanecem no rebanho, são criados sob condições precárias de manejo e alimentação, o que leva a altas taxas de mortalidade e morbidade, sendo os sobreviventes desmamados fracos e subdesenvolvidos, concorrendo ainda com as fêmeas por áreas, alimentação e manejo (Batista, 2011).

Na criação de bezerros o custo com leite integral representa até 80% e os índices de mortalidade e morbidade podem chegar a 20%, no entanto o controle da quantidade de leite fornecido aos animais, a substituição do leite por sucedâneos e o fornecimento de concentrados desde a idade precoce têm sido apontados como práticas eficientes na redução dos custos com a alimentação. A fase de criação do bezerro é considerada como sendo improdutiva, demorada e bastante onerosa no sistema de produção, uma vez que tira da comercialização grande parte do leite produzido na propriedade. A utilização de sucedâneos está se tornando prática comum em propriedades leiteiras, recomendando-se que o mesmo seja derivado do próprio leite integral (Coan, 2008). Como é o caso do soro de queijo e do leite em pó.

O soro de queijo representa boa alternativa na alimentação de bezerros, Montenegro et al. (1998) e Bezerra et al. (2003) asseguram que o soro de queijo de vaca pode ser utilizado em níveis de 20 a 60% de substituição ao leite integral na alimentação, pois não prejudica o desenvolvimento dos bezerros e permite reduzir os custos de produção desses animais. Além disso, a utilização do soro de queijo na alimentação animal contribui para redução dos efluentes líquidos lançados ao meio ambiente pelas indústrias de laticínios, já que este é tratado como refugo na indústria precisando, dessa forma, de destino adequado. O soro de queijo é uma excelente alternativa alimentar, pois além de ser rico em nutrientes, não contém fatores antinutricionais. Por estas razões, este produto apresenta amplas possibilidades na alimentação animal visando à redução de custos (Lima, 2008).

A substituição do leite integral por leite em pó e sua associação ao soro de queijo em pó apresentam-se como uma alternativa vantajosa, não só do ponto de vista nutricional por serem alimentos ricos em nutrientes, como também econômico (Moura, 2013).

Nesse contexto, a busca por alternativas que possam reduzir os custos na dieta dos bezerros e garantir maior retorno econômico para os produtores, sem prejudicar o desenvolvimento normal do epitélio absorvivo gastrintestinal e a eficiência da utilização dos alimentos pelo animal são fatores importantes para a sustentabilidade da atividade leiteira.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar, o desenvolvimento dos compartimentos gástricos e do epitélio ruminal quando utilizado um sucedâneo composto por soro de queijo em pó associado ao leite bovino em pó, em substituição ao leite integral no aleitamento de bezerros em fase de cria.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Determinar a eficiência de utilização do soro de queijo em pó e leite bovino em pó em substituição ao leite integral no desenvolvimento dos estômagos de bezerros;
- b) Analisar a influência das dietas testadas sobre o desenvolvimento das papilas do rúmen-retículo e o seu índice mitótico;
- c) Avaliar a distribuição das células produtoras de quimosina e pepsinogênio no epitélio do abomaso.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. UTILIZAÇÃO DE DIETAS ALTERNATIVAS PARA BEZERROS NO SISTEMA DE PRODUÇÃO LEITEIRO

A tradicionalidade dos sistemas de produção leiteira tem se mostrado pouco eficiente economicamente, fazendo com que os sistemas busquem alternativas que aumentem sua lucratividade (Missio et. al., 2009). O cenário econômico, principalmente enfrentado na nossa região, força o produtor a buscar formas de redução de custos, visto que o mercado não mais absorve as ineficiências da produção (Mancio, 2005). A fase de cria de bezerros em aleitamento artificial representa uma das etapas mais relevantes na produção leiteira e pode comprometer a vida futura do rebanho (Júnior et. al., 2016). O aleitamento convencional de bezerros leiteiros é caracterizado pelo fornecimento da dieta líquida em quantidade constante, equivalente a 10% do peso corporal do animal, dividido em duas refeições diárias (Azevedo et. al., 2014). O leite utilizado nessa etapa ocasiona desvio de recursos e reduz a lucratividade dos sistemas (Castro et. al., 2004).

Nesse contexto, a busca por alternativas que possam reduzir os custos com o fornecimento de leite aos animais e garantir maior retorno econômico para os produtores são fatores importantes (Oliveira et. al. 2010). A utilização de substitutos lácteos no aleitamento de animais devido ao seu baixo custo tem motivado pesquisas, o avanço de técnicas de alimentação e manejo na pecuária leiteira tem levado criadores à busca por alternativas economicamente viáveis para essa exploração (Castro et. al., 2004). Durante o aleitamento, os custos diários são maiores que durante qualquer outra fase da recria, e isso se deve, em parte, ao custo alto da dieta líquida, além dos gastos referentes ao manejo dos animais (Davis e Drackley, 1998).

Nos sistemas mais tecnificados de criação os animais em processo de desmame logo após a ingestão do colostro e aleitados artificialmente. Utilizar um sucedâneo vai além de simplesmente reduzir gastos, no caso do soro de queijo do leite bovino, é também uma forma de minimizar os impactos ambientais. De acordo com a ABIQ (Associação Brasileira das indústrias Produtoras de Queijo), a produção anual de queijo no Brasil é de 350.000 toneladas, gerando 3,5 milhões de toneladas de soro de queijo. Este resíduo é caracterizado principalmente pela elevada carga orgânica e principalmente a imensa quantidade de efluentes gerados. Atualmente, apenas 50% da produção mundial de soro de queijo gerado é tratado ou transformado em produtos

alimentícios. O restante é disposto em rios, lagos, ou outros corpos de água causando assim grave impacto ambiental (Fontes et.al., 2006).

A utilização de dietas líquidas alternativas vem sendo estudada visando à substituição parcial ou total do leite na dieta. O uso desses produtos permite aos produtores a venda de maior volume de leite, com consequente aumento da disponibilidade para a indústria e para a alimentação humana (Fontes et. al., 2006). Entretanto, a utilização de produtos desta natureza demonstra, em muitos casos, disparidades no desempenho dos animais, principalmente associados com alimentos de menor aproveitamento, gerando diminuição no ganho de peso e elevação do gasto com medicamentos, quando comparados ao leite integral (Vasconcelos, 1996). Estes problemas parecem estar relacionados ao excesso de fibra e amido, ao tipo e à inadequada incorporação de gordura além da utilização de fontes protéicas de baixo aproveitamento ou que provocam transtornos digestivos nos animais (Campos; Lizieire, 1995).

A fase de aleitamento é a mais crítica nutricionalmente falando, já que, devido a limitações enzimáticas e à baixa síntese microbiana, os animais apresentam exigências dietéticas mais complexas quanto aos aminoácidos e vitaminas e não utilizam com eficiência fontes protéicas e energéticas de origem não láctea (Orskov et. al., 1990). Dessa forma um programa de aleitamento na fase de cria deve proporcionar ao animal uma taxa de crescimento normal e um desenvolvimento fisiológico satisfatório.

2. FISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL DE ANIMAIS RUMINANTES

Ao nascer, os bezerros são considerados pré-ruminantes e apresentam seu trato digestivo anatomicamente semelhante ao de não-ruminantes. Por isso, a dieta líquida constitui-se a base para obtenção de nutrientes, uma vez que o rúmen, retículo e omaso se encontram em fase inicial de desenvolvimento (Mancio, 2005). O tamanho relativo e o desenvolvimento da digestão gástrica nos compartimentos modificam-se com a idade. Ao nascer os pré-estômagos são pequenos e não funcionais. Eles representam 39% do total dos estômagos com base no peso úmido, não contendo microorganismos e as papilas ruminorreticulares e folhas omasais são rudimentares (Leek, 1996). Durante o

aleitamento ocorre o desenvolvimento funcional dos compartimentos do trato digestivo (Mancio et. al. 2005) e as maiores mudanças acontecem no ruminorretículo, o qual será colonizado por microrganismos e desenvolverá sua musculatura e mucosa (Nussio et al. 2003).

O começo da atividade dos pré-estômagos depende da dieta ofertada aos animais. A rapidez do desenvolvimento dos pré-estômagos, inclusive em condições de pastejo, dependerá mais do que dos níveis de leite consumidos pelo recém-nascido com respeito a suas necessidades para crescimento, da disponibilidade e consumo de alimentos sólidos facilmente digestíveis (Church, 1974). Para promover desenvolvimento do rúmen, o fator chave é o consumo precoce de uma dieta que promova crescimento do epitélio ruminal (aumento da área de absorção) e a motilidade (para desenvolvimento da musculatura e do tamanho do rúmen e a manutenção da saúde do epitélio ruminal) (Coelho, 2005).

O abomaso é o estômago verdadeiro, glandular e com grande capacidade de digestão de nutrientes. Durante a lactação o abomaso é o compartimento do estômago com maior volume. Sendo que após a introdução da dieta sólida, em sua plenitude, os pré-estômagos apresentam desenvolvimento acentuado (Dirksen, 1993). As principais secreções do abomaso são o ácido clorídrico (HCl), a pró-pepsina e a pró-renina (Huber, 1969), este, porém, não secreta ácido nem pepsinogênio durante o primeiro dia, permitindo assim, a absorção de imunoglobulinas intactas (Furlan, Macari & Faria Filho, 2011).

O pH do conteúdo abomasal varia de 5,0 a 8,0 antes de o bezerro receber sua primeira refeição, mas cai para 3,0 até o segundo dia de vida. A origem e o processamento da proteína afetam, de maneira acentuada, a secreção de HCL no estômago (Thivend et al. 1980).

Ação coaguladora é observada na mucosa do abomaso de feto de ruminantes (Kirton et. al, 1971). A formação deste coágulo no abomaso resulta da coagulação da principal proteína do leite, a caseína, sob a ação de duas enzimas, denominadas quimosina e pepsina e também pela ação do ácido clorídrico (Wattiaux, 2003). A maior parte dessa ação é devida a renina, que tem atividade proteolítica menor que a pepsina. A atividade da renina diminui de acordo com o aumento da idade, enquanto a atividade da pepsina tende a crescer ligeiramente. Na época da desmama, a atividade da renina

diminui, ao passo que a atividade da pepsina permanece aproximadamente constante ou aumenta ligeiramente (Guilloteau et. al, 1993). Esses efeitos são parcialmente reversíveis. Assim, quando os animais recebem novamente alimento líquido contendo caseína, a atividade da renina aumenta, sem, contudo, atingir os níveis observados antes da desmama, ao passo que a atividade da pepsina não é afetada (Garnot et. al, 1977).

A pepsina é predominante após a desmama, mas alguma renina ainda é encontrada nessa época (Thivend et. al, 1980). Outros componentes do leite, principalmente proteínas do soro, lactose e a maioria dos minerais passam para o intestino delgado, sendo a lactose digerida rapidamente a fim de garantir energia imediata ao bezerro.

Durante a alimentação, o leite coagula rapidamente assim que atinge o abomaso. A acidez do abomaso é baixa (pH 6,0) imediatamente após a alimentação, mas aumenta com a secreção de HCL, provocando uma diminuição gradual no pH abomasal, e retorna a níveis compatíveis aos anteriores a alimentação em aproximadamente 5 horas (Porter, 1969). Nesse momento, a maior parte do soro do leite já deixou o abomaso, e o pH do conteúdo abomasal é suficientemente baixo para permitir a dissolução do coágulo de caseína pela pepsina. A proteína do leite coagula no abomaso pela ação da renina e pepsina, que separa o leite em coágulos de proteína e soro (Mylrea, 1966). A pepsina tem somente um terço da capacidade coaguladora da renina em pH neutro, porém mais de 20 vezes a atividade proteolítica em pH baixos. O pH ótimo para coagulação pela renina é de 6,5, enquanto o pH ótimo para atividade proteolítica é de 4,0 para renina e de 2,0 para pepsina (Raymond et. al, 1973).

O rúmen-retículo em conjunto permanece em colapso e sem funcionamento, enquanto a dieta for limitada por leite. Isso porque quando o leite passa pela faringe, estimula quimiorreceptores com vias aferentes do nervo glossofaríngeo. O impulso sensorial é integrado na medula oblongata e o impulso eferente vagal provoca o fechamento do sulco reticular e relaxamento do orifício retículo-omasal e canal-omasal. A contração do sulco reticular produz um tubo temporário que conecta os orifícios do cárdio e retículo-omasal, conhecido como goteira esofágica, desviando o leite do rúmen-retículo e terminado no abomaso onde sofrerá a digestão enzimática (Furlan, Macari & Faria Filho, 2011).

O rúmen é o maior dos três pré-estômagos, preenche quase todo o lado esquerdo da cavidade abdominal e é dividido em quatro áreas, ou sacos, por estruturas musculares chamadas de pilares ruminais. Há um saco dorsal, um ventral e dois sacos posteriores. Os pilares movem o alimento pelo rúmen em sentido rotatório, misturando o conteúdo sólido com o conteúdo líquido. Um rúmen saudável tem uma coloração escura, que é causada pelo aumento da massa de tecido e grandes vasos sanguíneos (vascularização). Quando completamente desenvolvido, apresenta vilosidades na face interna de sua parede, chamadas papilas ruminais, essas papilas variam em número e tamanho em função do tipo de alimento fornecido (Rehagro, 2003). As papilas em um rúmen saudável são numerosas e visíveis sem ampliação. O maior determinante da extensão da superfície absorptiva ruminal é o tamanho das papilas ruminais, podendo ser diretamente influenciado pela dieta (Daniel et al., 2007).

As papilas são estruturas filiformes que se projetam na superfície do epitélio ruminal em direção a luz do órgão, cuja função é aumentar a superfície de contato entre o epitélio e o conteúdo ruminal e, conseqüentemente, a capacidade de absorção dos produtos da fermentação. O desenvolvimento das papilas ruminais está diretamente relacionado com o aumento da capacidade do epitélio ruminal em metabolizar os produtos da fermentação e é estimulado pela presença de ácidos graxos voláteis no ambiente ruminal (Silva et al., 2009). Além de participarem do mecanismo de movimento da ingesta, são responsáveis pelo aumento da área absorptiva, pois a maior parte da absorção de ácidos graxos voláteis e outros metabólitos ocorre a nível das papilas ruminais (Reece, 2006). Sabendo que os ácidos graxos voláteis servem como estimuladores do desenvolvimento das papilas ruminais, isso explica o fato de que nas áreas de maior absorção, há um maior desenvolvimento das mesmas (Silva, 1979).

Durante o período de transição (3 a 8 semanas) os animais, além do leite, começam a ingerir maiores quantidades de alimentos fibrosos, os quais são responsáveis pelo início da secreção salivar e desenvolvimento ruminoreticular. Nessa fase o rúmen-retículo acelera a colonização de microorganismos, principalmente pelo contato com a saliva, eructação, bolo ruminal e fezes de animais mais velhos. A fermentação microbiana de vegetais produz ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), os quais são essenciais para o desenvolvimento das papilas do rúmen e retículo e das folhas omasais. Já o volume do material fibroso é responsável pelo tamanho e desenvolvimento

muscular do rúmen-retículo e efetivação da ruminação. Ao final desse período (8 semanas), o rúmen retículo terá as características, proporções, frequência e formas do ciclo de motilidade da vida adulta. Além disso o metabolismo intermediário é desviado da utilização de glicose para os AGCC (ácidos graxos voláteis de cadeia curta) (Furlan, Macari & Faria Filho, 2011).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, R.A.; RUFINO, S.R.A.; CRUZ, M.S.; COSTA, S.F.; OLIVEIRA N.J.F.; COELHO, S.G.; DUARTE E.R.; GERASEEV L.C.; Desenvolvimento de bezerros leiteiros alimentados com silagem de leite de transição. I - Trato digestivo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, n.2, p.489-496, 2014.

BAPTISTA, M. A. **Viabilidade e limitações da produção de vitelo tropical a partir da proposta de opção de renda para o produtor de leite** 2011. 46 f. Trabalho de conclusão de especialização (Especialização em Administração Pública para Gestores do Sistema Estadual de Agricultura) -Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

BEZERRA, F.J.; BEZERRA, L.C.N.M.; SILVA, E.M.C. et al. Efeito do aleitamento artificial à base de soro de queijo de leite cabra sobre as características da carcaça e da carne de cabritos "mamão" do tipo genético *three cross*. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.929-935, 2003.

CASTRO, A.L.M.; CAMPOS, W.E; MANCIO, A.B.; PEREIRA, J.C.; CACON, P.R.; Desempenho e rendimento de carcaça de bezerros alimentados com colostro fermentado, associado ao óleo de soja zenarol. **Arquivos brasileiros de medicina veterinária e zootecnia**. V.56, n.2,p.193-201,2004.

CHURCH, D. C. **Fisiologia Digestiva y Nutrition de los Rumiantes**. Zaragoza: Acribia, 1974.

COAN, R.M. **Sucedâneos na criação de bezerros – 2008**. Acesso em 05/03/2017.. Disponível em: <<http://www.coanconsultoria.com.br/noticias.aspid=11>>.

COELHO, S. G. Criação de bezerros. In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Associação de Buiatria de Minas Gerais, 2005.

DANIEL J. L. P.; RESENDE JÚNIOR J.C.; CRUZ F. J. Participação do ruminoretículo e omaso na superfície absorptiva total do proventrículo de bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Reserarch and Animal Science**. São Paulo. V 43, n 5, p. 688-694, 2007.

DAVIS, C. L.; DRACKLEY, J. K. **The development, nutrition and management of the young calf**. Iowa: Iowa University, 1998. 329p.

DIRKSEN, G. Sistema digestivo. In: DIRKSEN, G.; GRUNDER, H.; STOBBER, N. (Eds.). **Exame clínico dos bovinos**. 1993. p. 166-228.

FONTES, F. A.P.V.; COELHO, S.G.; LANA, A.M.Q., COSTA, T.C.; CARVALHO, A.U. Desempenho de bezerros alimentados com dietas líquidas a base de leite integral ou soro de leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n.2, p.212-219, 2006.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FILHO, F. **Nutrição de ruminantes**. 2. Ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 616.

GARNOT, P.; TOULLEC, R.; THAPON, J.L.; MARTIN, P.; HOANG, M.T.; MATHIEU, C.M. & DUMAS, B.R. Influence of age, dietary protein and weaning on calf abomasal enzymic secretion. *J. Dairy Res.*, 44:9-23, 1977.

GUJLLOTEAU, P.; CORRING, T.; GARNOT, P.; MARTIN, P.; TOULLEC, R. & DURAND, G. Effects of age and weaning on enzymes activities of abomasum and pancreas of the lamb. *J. Dairy Sci.*, 66:2373-85; 1993.

HUBER, J.T. Development of the digestive and metabolic apparatus of the calf. 1. *Dairy Sci.*, 52:1303-15, 1969.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Acesso em 05/03/2017. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/09/rebanho-bovino-alcanca-215-2-milhoes-de-cabecas-em-2015>>

JÚNIOR, G. A. A.; COSTA, C.; CARVALHO, S. M. R.; PANICHI, A.; JÚNIOR P. P.; Características de carcaças e dos componentes não-carcaça de bezerros holandeses alimentados após o desaleitamento com silagem de grãos úmidos ou grãos secos de milho ou sorgo. **R. Bras. Zootec.**, v.37, n.1, p.157-163, 2008

JÚNIOR, V. F. G.; AZEVEDO, R. A.; ORNELAS, L. T. C.; OLIVEIRA, N. J. F.; GERASEEV, L. C.; DUARTE E. R.; Caracterização físico-química e microbiológica do fluido ruminal e do conteúdo gastrointestinal de bezerros holandeses em aleitamento artificial convencional ou fracionado. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.10, n.4, p.305-313, 2016.

LEEK, B.F. Digestão no estômago dos ruminantes. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. (Eds.). **Dukes: Fisiologia dos animais domésticos**. 11^o edição, Guanabara – Koogan, RJ, 1996, p. 353-379.

LIMA, P. O. **Substituição parcial do leite por soro de queijo e ovo na dieta líquida de bezerros leiteiros**. 2008. 170p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará. 2008.

LIZIEIRE, R.S. e CAMPOS, O.F. **Soro de queijo "in natura" na alimentação do gado de leite**. In: PASTA DO PRODUTOR DE LEITE Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 19- não paginado (Embrapa Gado de Leite. Pasta do Produtor, 46), 2006.

MANCIO, A. B. Desempenho de produtivo de cabritos alimentados com diferentes dietas líquidas associados com um promotor de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, V. 34, p. 1305 – 1313, 2005.

MISSIO, R.L.; BRONDANI, I.L.; FREITAS, L.S.; SACHET, R.H.; SILVA, J.H.S.; RESTLE, J. Desempenho e avaliação econômica da terminação de tourinhos em confinamento alimentados com diferentes níveis de concentrado na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1309-1316, 2009.

MONTENEGRO, M.P.; AZEVEDO, A.R.; BARROS, N.N. et al. Uso do soro de queijo de cabra no aleitamento artificial de cabritos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.6, p.1212-1217, 1998.

MOURA, A. K. **Desempenho de bezerros mestiços recebendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó na fase de aleitamento**. 2013. 68 F. Dissertação (Mestrado em, Ciência Animal) – Universidade Federal de Rural do Semiárido, Mossoró, 2013.

MYLREA, P.J. Digestion of milk in young calves. II. The absoiption of nutrients from the srnall intestine. **Res. Vet. Sei.**, 7:394-406,1966 b.

NUSSIO C.M.B., SANTOS F.A.P., ZOPOLLATTO M., PIRES A.V., MORAIS J.B. & FERNANDES J.J.R. 2003. Parâmetros de fermentação e medidas morfométricas dos compartimentos ruminais de bezerros leiteiros suplementados com milho processado (Floculado vs. Laminado a vapor) e monensina. **R. Bras. Zootec.** 32:1021-1031.

OLIVEIRA, M. D. S. **Cria e recria de bovinos leiteiros**. Jaboticabal: FUNEP, 2010. 180 p.

ORSKOV, E. R. **Alimentación de los ruminantes**. Acríbia, Zaragoza, 1990. p.10.

PORTER, J.W.G. Digestion in the pre-natal animal. • Proc; Nutr. Soc., 28:115-21, 1969.

RAYMOND, M.N.; BRICAS, E.; SALASSE, R.; GARNIER, I.; GARNOT, P. & DUMAS, B.R. A proteolytic unit for chymosin (rennin) activity based on a reference synthetic peptide. J. Dairy Sci., 56:419-22, 1973.

REHAGRO. **Anatomia do sistema digestivo dos bovinos**. Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/printpublicacao.do?cdnoticia=432>>. Acesso em 16 outubro de 2014.

SILVA, J. C. P. M. da; OLIVEIRA, A. S. de; VELOSO, M. C. **Manejo e administração em bovinocultura leiteira**. Edição dos autores. Viçosa, 2009.

SILVA, J. F. C. da; LEÃO, M. I. **Fundamentos de Nutrição de Ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 1. Ed.

THIVEND, P.; TOULLEC, R. & GUILLOTEAU, P. Digestive adaptation in the pre-ruminant. In: Digestive physiology and metabolism in ruminants. Westpoint, AVI, 1980.

VASCONCELOS, M. A. **Desempenho de bezerros da raça holandesa nascidos durante o período outono/inverno submetidos a diferentes dietas líquidas e instalações**. 1996. 81 f. Dissertação (Mestrado em, Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1996.

WATTIAUX, M. A. **Criação de novilhas - do nascimento a desmama**. Instituto Babcock para pesquisa e desenvolvimento da Pecuária Leiteira internacional. University of Wisconsin-Madison, 2003.

CAPÍTULO II
CARACTERIZAÇÃO MORFOHISTOLÓGICA DE BEZERROS ALEITADOS COM
LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ RECONSTITUIDOS

CARACTERIZAÇÃO MORFOHISTOLÓGICA DE BEZERROS ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ RECONSTITUIDOS

RESUMO: Objetivou-se avaliar a utilização do soro de queijo em pó associado ao leite em pó como substituto do leite integral no aleitamento de bezerros até os 60 dias de vida sobre o desenvolvimento dos pré-estômagos. Para isso, 24 bezerros mestiços com uma semana de vida foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 4 (quatro) tratamentos e 6 (seis) repetições: LI: leite integral (Controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó. Para os cálculos de consumo de matéria seca (MS) foram feitas medições diárias de consumo de feno e concentrado pelo método de oferta/sobra. Os animais foram abatidos aos 60 dias de vida. Os órgãos cavitários foram pesados com conteúdo, e logo em seguida, esvaziados e novamente pesados, registrando-se, os pesos cheios e vazios, respectivamente. Foi determinado o peso dos estômagos e de seus compartimentos com valores absolutos (kg) e relativos (%) em função do peso de corpo vazio (% PCVZ) e em função do peso do estômago completo (% PE). As médias obtidas para pesos absolutos e relativos em função do peso do corpo vazio dos compartimentos gástricos não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos.

PALAVRAS-CHAVES: aleitamento, fase de cria, lactante, rúmen

MORPHOHISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF BREWERS WITH POTATO MILK ASSOCIATED WITH RECONSTITUTED POTATO CHEESE SERUM

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the use of whey powder associated with powdered milk as a substitute for whole milk in the suckling of calves up to 60 days of age on the development of pre-stomachs. To that end, 24 crossbred calves with one week of life were distributed in a completely randomized design with four treatments and six replicates: LI: whole milk (Control); LP: milk powder; LPS1: 80% milk powder + 20% whey powder; LPS2: 60% milk powder + 40% whey powder cheese. For the calculations of dry matter (DM) consumption, daily measurements of hay consumption and concentrate were made by the supply / surplus method. The animals were slaughtered at 60 days of age. The cavity organs were weighed with contents, and then emptied and again weighed, registering, full and empty weights, respectively. The weight of the stomachs and their compartments were determined with absolute values (kg) and relative (%) as a function of the empty body weight (% PCVZ) and as a function of the weight of the whole stomach (% PE). The averages obtained for absolute and relative weights as a function of the empty body weight of the gastric compartments did not present significant differences ($P > 0.05$) between the treatments.

KEYWORDS: pro-ventricle, ruminants, substitutes.

1. INTRODUÇÃO

Os ruminantes, ao nascerem, apresentam o trato gastrointestinal com pré-estômagos pequenos e não funcionais, sendo considerados não ruminantes. O rápido desenvolvimento desses compartimentos está associado ao tipo de manejo alimentar adotado na fase de cria (Khan et al., 2016).

A capacidade de todos os compartimentos estomacais se modificam de maneira distinta com o avanço da idade dos bezerros, com uma aceleração do crescimento ruminal e uma retração do crescimento abomasal. Ao nascer, a atividade digestiva no bezerro é exercida pelo abomaso. Esses animais apresentam o retículo-rúmen pouco desenvolvido e não funcional, representando apenas 30% do total dos quatro compartimentos. As maiores mudanças em termos de desenvolvimento vão ocorrer neste órgão, o qual será colonizado por diferentes tipos de microrganismos e terá sua musculatura e parede interna (papilas) desenvolvidas, como também enzimas funcionais na parede do rúmen (Carvalho et al. 2003).

Em bovinos jovens, recebendo alimento sólido até a nona semana de vida, estes já podem apresentar colonização de microrganismos anaeróbios ou anaeróbios facultativos em elevadas concentrações no interior do rúmen (Duarte et al. 2016), nessa idade o animal já está em processo de transição. A interação entre microrganismos e alimentos, associada às condições ruminais, favorece o estabelecimento dessas populações, além de suprir as exigências do animal, com a formação dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta, fornecendo o aporte de nutrientes necessários (Kamra, 2005). A dieta, a qualidade e a frequência da alimentação fornecida são fatores importantes para o bom desenvolvimento dos pré-estômagos (Rasmussen et al., 2006).

Sucedâneos como o soro de queijo e o leite em pó podem ser utilizados como substâncias alternativas ao leite integral, pois são produtos de descarte nas indústrias de queijo e nas fábricas de produção de leite em pó, que são vendidos a preços baixos, e possuem características similares as do leite integral. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a utilização do soro de queijo em pó associado ao leite em pó como substituto do leite integral no aleitamento de bezerros até os 60 dias de vida sobre o desenvolvimento dos pré-estômagos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na fazenda Flor da Serra localizada no município de Limoeiro do Norte-CE. Foram utilizados 24 bezerros machos com idade 5 ± 3 dias, mestiços de Holandês x SPRD, com peso médio inicial de 35 kg. Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com 4 (quatro) tratamentos e 6 (seis) repetições: LI: leite integral (controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó. O leite em pó e o soro de queijo em pó utilizados nesse experimento, foram obtidos de refugo de indústrias de laticínios da empresa Betânia. A composição centesimal da dieta líquida fornecida aos bezerros apresenta-se na Tabela 1.

Tabela 1- Composição percentual da dieta líquida fornecida aos bezerros

Alimentos	LI%	LP%	LPS1%	LPS2%
Leite integral	100	-	-	-
Leite em pó	-	100	80	60
Soro de queijo	-	-	20	40

Foram realizadas análises físico-química das dietas líquidas no laboratório Clínica do Leite ESALQ-USP, onde se determinaram os teores de proteína, gordura, lactose e extrato seco dos componentes da dieta (Tabela 2).

Tabela 2 - Teores de proteína (P), gordura (G), lactose (LAC), extrato seco (ES) com base no extrato seco para as diferentes dietas líquidas.

Físico-química	Soro de queijo em pó	Leite integral	Leite em pó
Proteína (%)	2,49	3,39	2,54
Gordura (%)	0,99	4,13	2,60
Lactose (%)	4,33	4,34	4,30
Extrato seco (%)	6,52	8,15	6,12

Os bezerros receberam colostro integral até o terceiro dia de vida. Posteriormente foram aleitados com leite integral na quantidade de quatro litros, fornecido duas vezes ao dia (manhã

e tarde) em um balde, até o décimo dia. A adaptação dos animais as dietas compreendeu os dez dias que antecederam ao início dos tratamentos, quando as dietas testadas foram fornecidas em substituição ao leite integral, gradativamente (10% a cada dia). O período experimental foi realizado durante as seis semanas após o período de adaptação, totalizando 60 dias.

Todos os animais foram vermífugados e receberam complexo vitamínico ADE injetável na segunda semana de vida. Os animais foram mantidos em sistema de confinamento em bezerreiros do tipo Argentino, composto por baias individuais cobertas com sombrite, onde tinham acesso ao concentrado farelado, feno de Tifton (*Cynodon sp.*) e água *ad libitum*, desde o nascimento até o desaleitamento. Os cálculos de consumo de matéria seca (MS) foram feitos pelo método de oferta/sobra, onde as medições diárias de consumo de feno e concentrado eram feitas, ajustando-se a quantidade fornecida de forma a atingir 10% de sobra em relação ao consumo do dia anterior.

Os animais tiveram à sua disposição concentrado farelado, cuja composição centesimal apresenta-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição percentual da ração concentrada fornecida aos bezerros

Ingredientes	Quantidades
Milho (moído)	60%
Soja (farelo)	20%
Premix	20%
Total	100%

Os alimentos sólidos foram analisados no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal Rural do Semiárido para determinação de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), apresentadas na Tabela 4, seguindo metodologia de Silva e Queiroz (2002).

Tabela 4 – Composição químico-bromatológica do concentrado e do feno de capim tifton-85 fornecido aos bezerros

Variáveis (% MS)	Concentrado	Feno
Matéria seca	93,92	95,38

Matéria mineral	8,64	7,91
Proteína bruta	18,54	7,94
Extrato etéreo	4,98	1,58
Fibra em detergente neutro	13,73	72,18
Fibra em detergente ácido	9,20	36,89

Aos 60 dias de idade, antes de serem abatidos, os bezerros foram pesados e submetidos a um jejum de aproximadamente 16 horas (período noturno), tendo acesso à água. Na manhã seguinte, foram pesados novamente e levados ao abatedouro sob fiscalização do Serviço de Inspeção Municipal.

Na sala de abate foram insensibilizados, suspensos pelas pernas traseiras e em seguida sangrados. Os bezerros foram esfolados e as patas foram retiradas, seguindo-se a evisceração, onde se recolheu todas as partes não-integrantes da carcaça, fazendo-se então a ligadura da porção caudal do esôfago com o cárdia, da cranial do duodeno com o esfíncter pilórico, do orifício retículo-omasal assim como também do orifício omaso-abomasal, para que se procede-se ao estudo biométrico.

As partes foram pesadas em balança digital. Os órgãos cavitários pesados com conteúdo e logo em seguida, esvaziados, lavados, escorridos e novamente pesados, registrando-se, portanto, os pesos cheios e vazios, respectivamente (Figura 1). O peso corporal vazio (PCVZ), utilizado para as comparações percentuais, foi obtido diretamente pelo somatório dos pesos de patas, cabeça, pele, sangue, órgãos, vísceras vazias, gordura interna e carcaça.

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias. Os efeitos dos diferentes tratamentos sobre cada variável foram comparados por meio do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade com o auxílio computacional do programa IBM (IBM Statistics 20), segundo o modelo estatístico a seguir: $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$; onde, Y_{ij} = observação de cada variável relativa ao jésimo bezerro, do iésimo tratamento; μ = média da população; T_i = efeito do iésimo tratamento; $i = 4,0$ L de Leite integral/bezerro x dia (LI), $4,0$ L de Leite em pó/bezerro x dia (LP); $3,2$ L de Leite em pó + $0,8$ L de Soro de queijo em pó/bezerro x dia (LPS1); $2,4$ L de Leite em pó + $1,6$ L de Soro de queijo em pó/bezerro x dia (LPS2); E_{ij} = efeito aleatório relativo ao jésimo bezerro, do iésimo tratamento; $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$, bezerros (unidade experimental).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias obtidas para pesos absolutos e relativos dos compartimentos gástricos, em função do peso do corpo vazio não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre as dietas testadas (Tabela 5).

Tabela 5 - Peso absoluto (Kg) e coeficiente de variação dos compartimentos estomacais de bezerros recebendo dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó.

Variável		LI	LP	LPS1	LPS2	MÉDIA	CV	P
Estômago total	Cheio	4,73 ^a	5,68 ^a	6,63 ^a	6,69 ^a	5,75	37,63	0,50
	Vazio	1,41 ^a	1,41 ^a	1,58 ^a	1,57 ^a	1,48	26,45	0,89
Rúmen-Retículo	Cheio	3,54 ^a	4,67 ^a	5,43 ^a	5,37 ^a	4,57	41,83	0,41
	Vazio	0,86 ^a	0,94 ^a	1,04 ^a	1,00 ^a	0,95	26,19	0,76
Omaso	Cheio	0,23 ^a	0,28 ^a	0,29 ^a	0,31 ^a	0,27	40,41	0,88
	Vazio	0,16 ^a	0,17 ^a	0,20 ^a	0,21 ^a	0,18	42,16	0,87
Abomaso	Cheio	0,96 ^a	0,74 ^a	0,91 ^a	1,01 ^a	0,91	35,62	0,70
	Vazio	0,38 ^a	0,30 ^a	0,35 ^a	0,36 ^a	0,35	30,28	0,74

Médias com letras diferentes nas linhas são significativas ($P<0,05$) pelo teste de Tukey; LI: Leite integral; LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó.

Azevedo et al. (2014), trabalhando com bezerros holandeses mantidos em diferentes sistemas de aleitamento, verificaram médias de 1,12 kg para o peso do rúmen-retículo vazio, 0,34 kg para peso de abomaso vazio e 0,24 kg para peso do omaso vazio, valores semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Já Hoffmann et al. (1993), encontraram valores para peso absoluto do rúmen-retículo, omaso e abomaso vazios de 0,77 kg, 0,16 kg e 0,25 kg na 8ª semana de vida de bezerros, respectivamente. Segundo Beharka et al. (1998), o peso omasal pode ser diretamente proporcional ao aumento do fluxo de partículas ruminais, estimulando o desenvolvimento desse órgão. Daniel et al. (2006) indicaram sua maior importância, pois a relação da superfície com a digesta tende a ser maior no mesmo em comparação ao ruminorretículo, possuindo área superficial 83,3% superior por unidade de digesta, mantendo-o como órgão relevante na absorção de AGV. Além disso, Daniel & Resende Júnior (2012), trabalhando *in vitro* com a mucosa de rúmen e omaso, encontraram taxa fracional de absorção no omaso 11 vezes maior do que no rúmen, por unidade de área.

Tabela 6 - Peso relativo (%) média e coeficiente de variação em relação ao peso do corpo vazio de bezerros recebendo dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó.

Variável		LI	LP	LPS1	LPS2	MÉDIA	CV	P
Estômago total	Vazio	2,82 ^a	3,19 ^a	3,31 ^a	3,43 ^a	3,13	18,94	0,46
Rúmen-Reticulo	Vazio	1,73 ^a	2,09 ^a	2,18 ^a	2,20 ^a	2,00	18,76	0,17
Omaso	Vazio	0,32 ^a	0,38 ^a	0,41 ^a	0,44 ^a	0,38	34,20	0,61
Abomaso	Vazio	0,76 ^a	0,71 ^a	0,72 ^a	0,80 ^a	0,75	28,76	0,10

Médias com letras diferentes nas linhas são significativas ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; LI: Leite integral; LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó.

Azevedo et al. (2013), encontraram percentuais de peso relativo em função do peso do corpo vazio de 1,6% para o rúmen-retículo, 0,3% para omaso e 0,5% para abomaso de bezerros em fase de aleitamento. Carvalho et al. (2003) ao abater bezerros holandeses aos 50 dias de idade apresentaram valores percentuais em função do peso do corpo vazio (PCVZ) de 2,12; 0,63 e 0,66% para rúmen-retículo, omaso e abomaso, respectivamente.

As médias obtidas para a participação percentual dos compartimentos gástricos vazios em relação ao peso total do estômago vazio não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Participação percentual e coeficiente de variação dos compartimentos gástricos vazios em relação ao peso total do estômago vazios de bezerros recebendo dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó.

Variável	LI	LP	LPS1	LPS2	MÉDIA	CV	P
Estômago Completo (kg)	1,41 ^a	1,41 ^a	1,58 ^a	1,57 ^a	1,48	26,45	0,89
Rúmen-Reticulo (%)	61,19 ^a	66,77 ^a	66,01 ^a	64,26 ^a	64,18	8,75	0,43
Omaso (%)	11,73 ^a	11,80 ^a	12,51 ^a	11,94 ^a	11,99	24,54	0,99
Abomaso (%)	27,08 ^a	21,35 ^a	21,48 ^a	23,80 ^a	23,84	21,75	0,26

Médias com letras diferentes nas linhas são significativas ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; LI: Leite integral; LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó.

Azevedo et al. (2013) relataram que a proporção do rúmen-retículo, omaso e abomaso de bezerros lactantes foram de 66%, 15% e 19% respectivamente. Silper et al (2012), estudando diferenças na proporção de cada estômago aos 30 e 60 dias de vida de bezerros, verificaram que o ruminorretículo correspondeu a maior parte do trato gastrointestinal nas duas idades. Resultados semelhantes foram encontrados neste experimento, onde o rúmen supera em peso e proporção o abomaso, caracterizando esses bezerros como ruminantes funcionais. Quando nascem os bezerros possuem o retículo-rúmen pouco desenvolvido, representando em torno de 30% do total dos quatro compartimentos, para que haja um rápido desenvolvimento desse órgão a dieta é o fator principal, a aceleração do desenvolvimento do retículo-rúmen se dá a medida que o animal consome alimentos sólidos (Costa et al., 2008).

Segundo Mancio et al. (2005), o tamanho do rúmen está relacionado à sua capacidade funcional, portanto, os elevados pesos deste órgão podem demonstrar uma transformação numa estrutura funcional. O maior desenvolvimento do rúmen ocorre devido à presença de alimentos sólidos, proporcionando maior motilidade ruminal, desenvolvimento epitelial, muscular, além da produção de ácidos graxos voláteis (Anderson et al., 1987). Esse crescimento dependerá da quantidade de leite consumida durante o aleitamento e do consumo de forragem, logo, possivelmente a semelhança observada no desenvolvimento dos compartimentos do estômago esteja relacionada ao consumo semelhante de alimentos sólidos, visto que, segundo Lucci (1989), o aumento do rúmen é extremamente influenciado pela ingestão de feno e concentrado, e no presente estudo os animais apresentaram o mesmo ritmo de consumo de matéria seca para todas as dietas testadas.

Com o avanço da idade e do consumo de alimento sólido, o rúmen começa a se desenvolver e as proporções dos quatro compartimentos gástricos em relação ao trato total sofrem mudanças (Nussio et al., 2003). Entretanto, as taxas de crescimento são diferenciadas entre os compartimentos, ocorre aceleração do crescimento ruminal e retração abomasal, sendo que em bezerros desaleitados precocemente a inversão nas proporções desses compartimentos estomacais ocorre antes dos 50 dias (Carvalho et al. 2003). Dessa forma, os valores encontrados nesse trabalho para o estômago total e os percentuais de cada estômago, obedecem a fisiologia de desenvolvimento e proporção condizentes com bezerros aos de 60 dias de vida.

Para o conteúdo do estômago ou de seus compartimentos isolados, também não houve observação de efeito das dietas líquidas ($P>0,05$).

Tabela 8 - Peso absoluto e coeficiente de variação do conteúdo dos compartimentos gástricos de bezerros recebendo dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó.

Conteúdo	LI	LP	LPS1	LPS2	MÉDIA	CV	P
Estômago Total (kg)	4,73 ^a	5,68 ^a	6,63 ^a	6,69 ^a	5,75	37,63	0,50
Rúmen-Reticulo	2,67 ^a	3,73 ^a	4,39 ^a	4,37 ^a	1,71	47,28	0,39
Omaso	0,07 ^a	0,10 ^a	0,10 ^a	0,10 ^a	0,06	69,71	0,86
Abomaso	0,58 ^a	0,44 ^a	0,56 ^a	0,66 ^a	0,30	54,00	0,83

Médias com letras diferentes nas linhas são significativas ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey;

LI: Leite integral; LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó.

Lima et al. (2013) avaliando o desenvolvimento dos estômagos de bezerros mestiços submetidos a diferentes dietas líquidas não verificaram efeito das dietas sobre os compartimentos gástricos, e obtiveram valores de 2,37; 2,0; 0,06 e 0,31kg para estômago total, rumén-retículo, omaso e abomaso, respectivamente. Nesse experimento Lima et al. (2013) afirmam ainda que a semelhança observada entre os tratamentos é particularmente interessante, por ser o objetivo proposto a substituição de uma dieta de custo mais elevado, leite integral, por outra menos onerosa, soro de queijo. Espera-se que substituição do leite integral por substitutos provenha aos animais um desenvolvimento satisfatório, que, em outros termos, se traduz como: mesmo não apresentando desempenho superior ao alcançado com o uso do leite integral, os animais não têm seu desenvolvimento prejudicado. Os bezerros do presente experimento apresentaram um desenvolvimento normal dos estômagos, já que não foram apresentadas diferenças estatisticamente significativas em relação aos pesos absolutos e percentuais, tanto em relação ao peso do corpo vazio quanto ao peso do estômago, nas dietas testadas.

4. CONCLUSÃO

O desenvolvimento do trato gastrointestinal dos bezerros não foi afetado com a utilização dos sucedâneos testados, desse modo, o mesmo pode ser utilizado na alimentação desde que os animais tenham acesso a alimentos sólidos na dieta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, K.L. *et al.* Ruminant metabolic development in calves weaned conventionally or early. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.70, n. 5, p.1000-1005, 1987.

AZEVEDO, R. A. *et al.* Desempenho de bezerros leiteiros em aleitamento artificial convencional ou fracionado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, p.237-247, 2014.

AZEVEDO, RAFAEL A. *et al.* Desenvolvimento do trato digestivo de bezerros leiteiros criados em sistema de aleitamento fracionado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 931-936, 2013.

BEHARKA A.A., NAGARAJA T.G., MORRILL J.L., KENNEDY G.A. & KLEMM R.D. 1998. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. **J. Dairy Sci.** 81:1946-1955.

CARVALHO, P.A.; SANCHEZ, L.M.B.; VIÉGAS, J. *et al.* Componentes do peso vivo e órgãos viscerais de bezerros machos de origem leiteira ao nascimento, 50 e 110 dias de vida. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1469-1475, 2003.

COSTA, S. F. *et al.* Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros: I Aspectos histológicos. **Arq. bras. med. vet. zootec**, p. 1-9, 2008.

DANIEL J.L.P. & RESENDE JÚNIOR J.C. 2012. Absorção e metabolismo de ácidos graxos voláteis pelo rúmen e omaso. **Ciênc. Agrotec.** 36:93-99.

DANIEL J.L.P., RESENDE JÚNIOR J.C. & CRUZ F.J. 2006. Participação do rumi-norretículo e omaso na superfície absorviva total do proventrículo de bovinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 43:688-694.

DE OLIVEIRA LIMA, Patrícia *et al.* Desenvolvimento dos estômagos de bezerros recebendo diferentes dietas líquidas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, 2013.

DUARTE, EDUARDO ROBSON *et al.* Caracterização físico-química e microbiológica do fluido ruminal e do conteúdo gastrointestinal de bezerros alimentados com silagem de leite de

transição-DOI: 10.5039/agraria. v11i2a5367. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 11, n. 2, p. 142-147, 2016.

HOFMANN, R.R. Anatomy of the gastro-intestinal tract. In: CHURCH, D.C. (Ed.). **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. New Jersey: Waveland, 1993. 564p.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, p. :124-135, 2005.

KHAN, M. A. et al. Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 2, p. 885-902, 2016.

LUCCI, C. S. **Bovinos leiteiros jovens: Nutrição, manejo, doenças**. São Paulo: Nobel, 1989.

MANCIO, A. B. Desempenho de produtivo de cabritos alimentados com diferentes dietas líquidas associados com um promotor de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, V. 34, p. 1305 – 1313, 2005.

NUSSIO C.M.B., SANTOS F.A.P., ZOPOLLATTO M., PIRES A.V., MORAIS J.B. & FERNANDES J.J.R. 2003. Parâmetros de fermentação e medidas morfométricas dos compartimentos ruminais de bezerros leiteiros suplementados com milho processado (Floculado vs. Laminado a vapor) e monensina. **R. Bras. Zootec.** 32:1021-1031.

QUEIROZ, AC de; SILVA, D. J. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, 2002.

RASMUSSEN, M.A., et al. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbial Letter**, v.114, p. 79-84, 2006.

SILPER B.F. 2012. Efeitos de três estratégias de aleitamento sobre ganho de peso, desenvolvimento ruminal e perfil metabólico e hormonal de bezerros Holandeses. **Dissertação de Mestrado em Zootecnia**, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 96p.

CAPÍTULO III

HISTOMORFOMETRIA DE PAPILAS RUMINAIS E ATIVIDADE

PROLIFERATIVA DA MUCOSA RUMINAL DE BEZERROS MESTIÇOS

ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ

**HISTOMORFOMETRIA DE PAPILAS RUMINAIS E ATIVIDADE
PROLIFERATIVA DA MUCOSA RUMINAL DE BEZERROS MESTIÇOS
ALEITADOS COM LEITE EM PÓ ASSOCIADO AO SORO DE QUEIJO EM PÓ**

RESUMO: Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a utilização do soro de queijo em pó associado ao leite em pó como substituto do leite integral no aleitamento de bezerros até os 60 dias de vida sobre o desenvolvimento e a taxa de proliferação celular das papilas ruminais. Para isso, 24 bezerros mestiços com uma semana de vida foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 4 (quatro) tratamentos e 6 (seis) repetições: LI: leite integral (Controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó. Para os cálculos de consumo de matéria seca (MS) foram feitas medições diárias de consumo de feno e concentrado pelo método de oferta/sobra. Os animais foram abatidos aos 60 dias de vida. Foram retirados fragmentos de aproximadamente um centímetro quadrado (1cm^2) de tecidos de 4 regiões do rúmen: átrio ruminal, saco dorsal, saco cego caudo-dorsal e saco ventral de onde foram medidas as alturas das papilas ruminais. A atividade proliferativa foi avaliada em amostras de tecidos retiradas do rúmen por meio da contagem de Regiões Organizadoras de Nucléolos Argirofílicos (AgNOR). Não houve diferença significativa para o consumo de matéria seca ($P>0,05$) pelos animais entre as dietas testadas. Quanto ao desenvolvimento de papilas no rúmen houve diferença significativa ($P<0,05$) para a variável altura no saco ventral, onde os animais que receberam leite integral possuíram as maiores médias. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) para a taxa de proliferação celular nas papilas ruminais. O soro de queijo em pó associado ao leite em pó não afetou o consumo de matéria seca nem a taxa de proliferação celular nas papilas ruminais, embora tenha afetado negativamente o tamanho das papilas na região ventral do rúmen.

Palavras-chaves: AgNOR, atividade proliferativa, desenvolvimento papilar, rúmen

HISTOMORPHOMETRY OF RUMINAL PAPILLAS AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF THE RUMINAL MUCOSA OF BEZERROS MIXTURES WITH MILK IN POW ASSOCIATED WITH THE POWDER CHEESE SERUM

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the use of powdered cheese whey associated with powdered milk as a substitute for whole milk in suckling calves up to 60 days of age on the development and rate of cell proliferation of ruminal papillae. To that end, 24 crossbred calves with one week of life were distributed in a completely randomized design with four treatments and six replicates: LI: whole milk (Control); LP: milk powder; LPS1: 80% milk powder + 20% whey powder; LPS2: 60% milk powder + 40% whey powder cheese. For the calculations of dry matter (DM) consumption, daily measurements of hay consumption and concentrate were made by the supply / surplus method. The animals were slaughtered at 60 days of age. Fragments of approximately one square centimeter (1 cm²) of tissues were collected from 4 regions of the rumen: rumen atrium, dorsal sac, caudate-dorsal blind sac and ventral sac from which the heights of rumen papillae were measured. The proliferative activity was evaluated in samples of tissues removed from the rumen by counting Organizing Regions of Argiophilic Nucléolos (AgNOR). There was no significant difference in dry matter intake ($P > 0.05$). Regarding the development of papillae in the rumen, there was a significant difference ($P < 0.05$) for the variable height in the ventral sac, where the animals that received whole milk had higher averages. There were no significant differences ($P > 0.05$) for the rate of cell proliferation in ruminal papillae. Whey powder associated with powdered milk did not affect the dry matter intake nor the rate of cell proliferation in the ruminal papillae, although it negatively affected the size of the papillae in the ventral region of the rumen.

Keywords: AgNOR, proliferative activity, papillary development, rumen

1. INTRODUÇÃO

O estomago dos ruminantes é constituído por quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso (Nickel et al., 1979). Os dois primeiros compartimentos, o rúmen e o retículo, são consideradas uma só câmara, denominada ruminoretículo, devido à ausência de barreira anatômica entre elas (Van Soest, 1994).

A superfície externa do ruminoretículo é marcada pela presença de sulcos, que estão representados internamente por espessamentos da túnica muscular, os pilares. Os sulcos externamente, e os pilares, internamente, delimitam os sacos cranial, dorsal, cego caudo-dorsal e ventral. Entre rúmen e retículo estão a prega ruminorreticular, internamente, e o sulco ruminorreticular, externamente. A extremidade do saco cranial é denominada recesso do rúmen (Nickel et al., 1979).

A superfície interna do rúmen é caracterizada pela presença de papilas. As papilas são estruturas filiformes que se projetam na superfície do epitélio ruminal em direção a luz do órgão, cuja função é aumentar a superfície de contato entre o epitélio e o conteúdo ruminal e, consequentemente, a capacidade de absorção dos produtos da fermentação (Banks, 1992).

O desenvolvimento das papilas ruminais está diretamente relacionado com o aumento da capacidade do epitélio ruminal em metabolizar os produtos da fermentação e é estimulado pela presença de ácidos graxos voláteis no ambiente ruminal (Silva et al., 2009). A região central da papila é composta de um sistema vascular (vênulas capilares) em paralelo, fluxo sanguíneo derivado de uma arteríola central, ou de uma ou duas arteríolas periféricas. Os ácidos graxos que atravessam a parede epitelial por difusão simples alcançam o sistema vascular, o qual desemboca no sistema porta-hepática até o fígado. O hábito alimentar dos ruminantes é que define seu número, distribuição e tamanho, pois essas estruturas estão na dependência da ação trófica dos alimentos sobre o desenvolvimento da mucosa (Furlan, Macari & Faria Filho, 2011). Para promover desenvolvimento do rúmen, o fator chave é o consumo precoce de uma dieta que promova crescimento do epitélio ruminal (aumento da área de absorção) e a motilidade (para desenvolvimento da musculatura e do tamanho do rúmen e a manutenção da saúde do epitélio ruminal) (Coelho, 2005).

O desenvolvimento das papilas ruminais é resultante entre a diferença das taxas de proliferação e morte celular. A proliferação celular é essencial para a manutenção da integridade da mucosa na mucosa gastrointestinal normal, com células constantemente entrando ciclos de replicação, maturação e apoptose. Diferentes metodologias podem ser empregadas para avaliar a resposta em morfologia papilar à mudança no plano nutricional. A

proliferação celular pode ser evidenciada por reações histoquímicas, como o método de AgNORs.

A impregnação pela prata das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) é caracterizada por marcar proteínas ligadas ao ácido ribonucleico ribossômico, avaliando a proliferação em células normais ou neoplásicas (Chacur et al., 2015). Estudos recentes enfocam o uso da técnica de coloração AgNOR em diversas áreas da ciência, como genética e biologia evolutiva de animais da fauna brasileira (Laguna et al. 2010). Sua contagem pode ser usada para avaliar a taxa de proliferação celular uma vez que essas proteínas tendem a se acumular em células mitoticamente ativas, enquanto que sua expressão em células em repouso é baixa (Sirri et al., 2000).

Objetivou-se com este trabalho, testar a influência da utilização do soro de queijo em pó e do leite em pó em substituição ao leite integral, no aleitamento de bezerros até os 60 dias de vida, sobre o desenvolvimento das papilas do rúmen, assim como sobre a taxa de proliferação das células nesta região.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na fazenda Flor da Serra localizada no município de Limoeiro do Norte-CE. Foram utilizados 24 bezerros machos com idade 5 ± 3 dias, mestiços de Holandês x SPRD, com peso médio inicial de 35 kg.

Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com 4 (quatro) tratamentos e 6 (seis) repetições: LI: leite integral (controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó. O leite em pó e o soro de queijo em pó utilizados nesse experimento, foram obtidos de refugo de indústrias de laticínios.

Os bezerros receberam colostro integral até o terceiro dia de vida. Posteriormente foram aleitados com leite integral na quantidade de quatro litros, fornecido duas vezes ao dia (manhã e tarde) até o décimo dia. A adaptação dos animais as dietas compreendeu os dez dias que antecederam ao início dos tratamentos, quando as dietas testadas foram fornecidas em substituição ao leite integral, gradativamente (10% a cada dia). O período experimental foi realizado durante as seis semanas após o período de adaptação, totalizando 60 dias. Todos os animais foram vermífugados e receberam complexo vitamínico ADE injetável na segunda semana de vida. Os animais foram mantidos no sistema de confinamento em baias individuais cobertas com sombrite, onde tinham acesso ao concentrado farelado, feno de Tifton (*Cynodon sp.*) e água *ad libitum*, desde o nascimento até o desaleitamento. Os cálculos de consumo de matéria seca (MS) foram feitos pelo método de oferta/sobra, onde as medições diárias de consumo de feno e concentrado eram feitas, ajustando-se a quantidade fornecida de forma a atingir 10% de sobra em relação ao consumo do dia anterior.

2.1 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E HISTOMORFOMETRIA

Foram retirados fragmentos de 1cm^2 (um centímetro quadrado) de quatro regiões do rúmen: átrio ruminal, saco dorsal, saco caudal e saco ventral, para medição da altura das papilas ruminais. Os fragmentos foram armazenados em formol por 24 horas e, após esse período, foram realizadas as práticas rotineiras laboratoriais para a montagem das lâminas histológicas.

Os fragmentos foram desidratados, em série crescente de etanol (70%, 95% e 100%), sendo 3 banhos nas diferentes concentrações, durante 1 hora cada. Em seguidas os tecidos foram diafanizados em xilol (2 banhos de 15 minutos), posteriormente impregnados durante 2

horas e incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram cortados em um micrótomo rotatório na espessura de 5µm. Os cortes obtidos foram submetidos a coloração de Hematoxilina-eosina, e as lâminas montadas com Bálsamo do Canadá.

As lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio (Olympus BX51®, Olympus Optical Co., Japan) equipado com câmera digital DP72 CCD. Posteriormente, foram analisadas no programa Image J Version 1.51k onde se procederam as medições das alturas das papilas das regiões do átrio ruminal, saco dorsal, saco caudal e saco ventral. Foram medidas aproximadamente 200 papilas por animal, resultando um total de 4.800 medições.

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias, utilizando-se o pacote estatístico IBM-SPSS (IBM Statistics 20). Os efeitos dos diferentes tratamentos sobre cada variável foram comparados por meio de ANAVA, seguida de um pós teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade.

2.2 PREPARAÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS PARA TÉCNICA AgNORS.

A atividade proliferativa nos tecidos retirados do rúmen foi avaliada por meio da contagem de Regiões Organizadoras de Nucléolos Argirofílicos (AgNOR).

Foram feitas secções de 5,0 µm de espessura dos tecidos das quatro regiões do rúmen, estas foram desparafinizadas em xilol e etanol (100%), pós-fixadas em solução de etanol absoluto: ácido acético (3:1) durante 30 min à temperatura ambiente e foram reidratadas. Para o procedimento de impregnação por prata para visualização dos AgNORs, duas soluções foram preparadas separadamente: 2% de gelatina em solução aquosa de ácido fórmico a 1% (solução A), e solução aquosa de nitrato de prata a 50% (solução B). A solução de coloração foi preparada imediatamente antes do procedimento, misturando a solução A com a solução B (1:2) em um tubo de ensaio protegido da luz. As secções foram coradas em um local escuro, à temperatura ambiente durante 30 minutos, em seguida, lavadas com água destilada e o bloqueio da reação foi feito com solução aquosa de tiosulfato de sódio a 5% durante 5 minutos à temperatura ambiente. As secções foram desidratadas numa série gradual de etanol ao xilol, e montadas com bálsamo do Canadá.

Para cada lâmina foram fotografados 20 campos aleatórios, e em cada campo foram observados 50 células, totalizando 1.000 células por animal. As AgNORs foram visualizados como pontos escuros intranucleares nas células epiteliais da mucosa ruminal. A contagem foi feita em microscópio de luz, sob aumento de 1000x, por um observador que desconhecia os

tratamentos aplicados, a fim de não tendenciar os resultados. Os dados foram agrupados de acordo com o tratamento, e analisados estatisticamente pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Observou-se consumo crescente de alimentos sólidos ao longo das semanas (Tabela 1). Para Costa et al. (2007) o consumo médio diário nas primeiras semanas de vida do bezerro é baixo, uma vez que ele consegue suprir todas as suas exigências nutricionais com o leite a ele fornecido, esse consumo ainda tende a aumentar com o passar das semanas visto que suas exigências também aumentam com o crescimento. Segundo Quigley e Bernard (1996), o consumo de concentrado aumenta rapidamente entre a terceira e a sexta semanas de vida, com diminuição do ritmo nas próximas quatro a seis semanas.

Tabela 1 – Consumo médio de matéria seca total de bezerros submetidos a dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó (g/bezerro/dia).

Semana	Dieta Líquida				Média	CV	P
	LI	LP	LPS1	LPS2			
1	643,48 ^a	577,28 ^a	603,83 ^a	671,68 ^a	623,55	12,28	0,37
2	688,08 ^a	696,01 ^a	658,07 ^a	732,80 ^a	690,80	17,22	0,90
3	768,42 ^a	800,23 ^a	741,73 ^a	768,25 ^a	769,59	17,46	0,96
4	922,77 ^a	978,38 ^a	878,58 ^a	912,13 ^a	923,58	25,13	0,96
5	1113,08 ^a	1171,23 ^a	1071,88 ^a	1166,88 ^a	1126,57	36,36	0,99
6	1266,40 ^a	1416,19 ^a	1415,28 ^a	1295,04 ^a	1341,72	33,64	0,95
CMMST	900,37 ^a	939,89 ^a	894,90 ^a	924,48 ^a	912,63	23,69	0,99

Médias com letras diferentes nas linhas são significativas ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; CMMST: Consumo médio de matéria seca total; LI: leite integral (controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó.

As médias obtidas para consumo de matéria seca no presente trabalho não diferiram estatisticamente entre as dietas testadas ($P > 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados por Lima et al. (2011) e Lima et al. (2013), utilizando dietas à base de soro de queijo e ovo integral em bezerros mestiços aos 60 dias, Lima et al. (2012) testando dietas contendo soro de queijo e colostro e Fontes et al. (2006), trabalhando com inclusão de fontes protéicas alternativas à base de soro de leite e leite em pó, em substituição ao leite integral, observaram que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais, entretanto, o consumo foi diferente entre as semanas, apresentando elevação crescente com o avançar da idade. Esse comportamento pode ser explicado devido ao crescimento do animal, aumentando as suas

exigências energéticas e protéicas. Junto à dieta líquida os animais estavam recebendo feno e concentrado, dessa forma tiveram acesso a um maior aporte de energia e proteína, estimulando a funcionalidade ruminal, a produção de ácidos graxos de cadeia curta e, conseqüentemente, o desenvolvimento das papilas ruminais. Segundo Lima et al. (2011) com dietas substitutivas, em geral, não se obtém desempenhos superiores aos conseguidos com o leite integral e ao se utilizar substitutos lácteos, o que se pretende é que os animais não tenham seu desenvolvimento prejudicado, pois o ganho em peso efetivo pode-se obter na fase seguinte, ou seja, após o desaleitamento.

Os bezerros apresentaram um consumo satisfatório de matéria seca, já que não foram apresentadas diferenças estatisticamente significativas em relação a ingestão de volumoso e concentrado nas dietas testadas. No entanto, é necessário garantir que as dietas não interfiram negativamente no metabolismo dos animais, sendo importante investigá-las a histologicamente.

Quanto ao desenvolvimento das papilas ruminais, nas regiões do átrio ruminal, saco dorsal e saco caudal os animais apresentaram os mesmos níveis de crescimento, não diferindo estatisticamente ($P>0,05$), em função das dietas testadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias de altura (mm) de papilas ruminais em bezerros submetidos a dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó

Medidas	Dietas Líquidas				P	CV
	LI	LP	LPS1	LPS2		
Átrio Ruminal	1,47 ^a	1,42 ^a	1,39 ^a	1,09 ^a	0,77	0,03
Saco dorsal	0,48 ^a	0,38 ^a	0,49 ^a	0,54 ^a	0,79	0,04
Saco caudal	1,56 ^a	1,25 ^a	1,28 ^a	1,38 ^a	0,92	0,05
Saco ventral	6,72 ^a	4,63 ^b	4,69 ^b	3,91 ^b	<0,001	0,02

Médias com letras diferentes nas linhas são significativas ($P<0,05$) pelo teste de Tukey; LI: leite integral (controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó.

Os animais que receberam a dieta controle (100% leite integral), obtiveram um maior desenvolvimento de papilas ($P<0,05$) no saco ventral. Ferreira et al. (2009) adicionando butirato de sódio a dieta de bezerros apresentaram médias de 3,73 mm para papilas ventrais aos 70 dias de vida em bezerros da raça holandesa. Em seus experimentos Huber et al. (1969)

e Lucci et al. (1989) preconizam que a altura normal das papilas de bezerros com 8 semanas de vida, aleitados com leite integral, deve estar na faixa de 5mm a 7mm de altura. Zitnam et al. (2005) encontraram valores de 1,89 mm para região do átrio ruminal e 1,25 mm para a região ventral de bezerros aos 40 dias de vida. Costa et al (2008) testaram com indução de butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal de bezerros abatidos aos 90 dias encontraram valores de 1,32 mm para altura de papilas caudais, valores próximos para a mesma região foram encontrados no presente experimento independente da dieta fornecida.

Silva et al. (2004), trabalhando com bezerros da raça holandesa aos 60 dias vida, fornecendo leite integral, e os sucedâneos Lactal® (sucedâneo a base de soro de leite e leite em pó) e Destetor®, observaram que ocorreu menor altura das papilas do rúmen para o grupo que consumiu sucedâneos em relação ao tratamento com leite integral. E apontam o menor consumo de concentrado nos tratamentos à base de sucedâneos, indicando que a maior parte da matéria seca ingerida é proveniente dos sucedâneos, logo, sucedâneos pobres em matéria seca, irão proporcionar um baixo desenvolvimento de papilas. Gesteira et al. (1999) citam que é o concentrado que propicia a formação das papilas do rúmen, as quais têm a propriedade de aumentar consideravelmente a superfície de absorção do órgão.

Na região ventral do rúmen ocorre um maior contato com a dieta, já que por densidade, à medida que ocorre a quebra das partículas estas tendem a buscar regiões mais profundas, estando em contato direto com a mucosa do saco ventral, ocorrendo nessa região maior produção de ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, butírico e propiônico) que são os principais responsáveis pelo desenvolvimento das papilas ruminais. Outro fato a ser considerado é que nem toda superfície absorviva do ruminoretículo está em contato com a digesta constantemente. A maior parte do saco dorsal do rúmen está preenchida por gás entrando em contato com os AGV incorporados ao fluido ruminal, apenas por ocasião dos movimentos ruminais (Pratti Daniel et al., 2006), isso explica o fato do saco dorsal possuir valores inferiores de desenvolvimento de papilas.

A morfologia das papilas ruminais ventrais pelo método de coloração HE (Hematoxilina-eosina) está representada na figura 1.

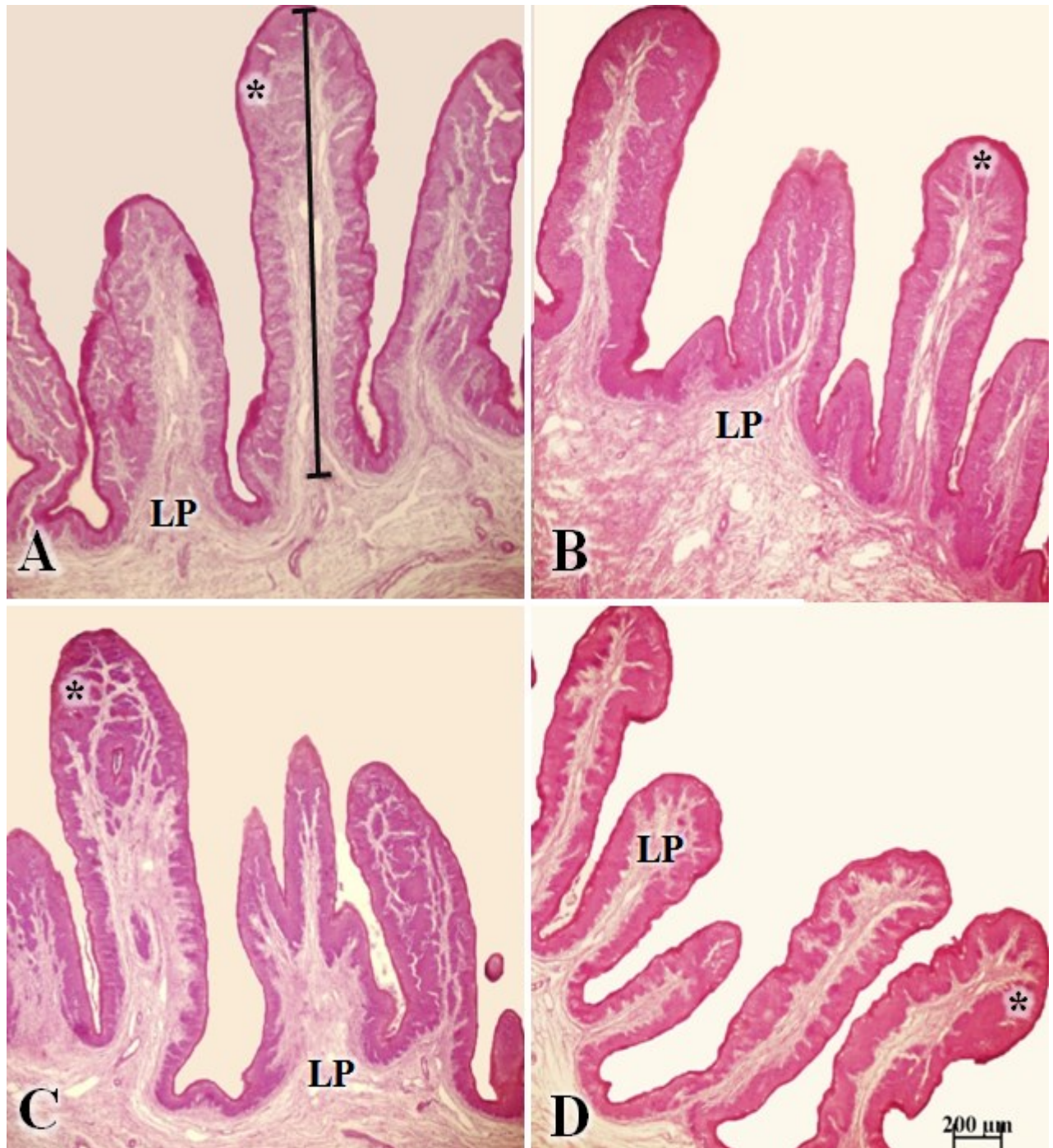


Figura 1. Cortes histológicos longitudinais de papilas localizadas na região ventral do rúmen de bezerros aos 60 dias de vida corados em HE (40X). *Epitélio. LP: Lâmina própria submucosa. A) Papilas ventrais de bezerros recebendo a dieta (LI); B) Papilas ventrais de bezerros recebendo a dieta (LP); C) Papilas ventrais de bezerros recebendo a dieta (LPS1); D) Papilas ventrais de bezerros recebendo a dieta (LPS2).

No presente experimento todos os animais alimentados com as dietas alternativas possuíram um desenvolvimento papilar inferior ao preconizado na literatura, e isso pode ter sido causado pela baixa quantidade de matéria seca na composição do soro de queijo, já que esse sucedâneo possui apenas 7% de matéria seca (parte sólida) (Liziere e Campos, 2006). Além disso, o soro de queijo possui uma completa ausência de caseína, e consequentemente, de coagulação no abomaso, por ser líquido, parte do soro pode escapar da fermentação ruminal, devido ao alto turnover líquido e ser digerido pós-ruminalmente (David, et al., 2006), e isso pode propiciar a rápida chegada de grande quantidade de nutrientes no intestino delgado após a alimentação, que talvez gere sobrecarga do sistema digestivo como um todo, levando à menor digestão e absorção dos nutrientes pelos animais. Segundo Church, (1993), a tensão da parede do abomaso e as altas concentrações de gordura, glicose e aminoácidos, que se observam quando se forma o coágulo, agem retardando o processo de esvaziamento gástrico. Com a substituição do leite integral por soro e a ausência de coagulação no abomaso, maior quantidade dessa proteína chegará ao sítio digestivo, podendo sobrecarregá-lo, e ocasionar menor aproveitamento da dieta líquida.

Por não haver diferença para consumo de matéria seca entre as dietas testadas pode-se sugerir que os animais que receberam dietas contendo soro de queijo em pó em sua composição tiveram acesso a uma quantidade menor de matéria seca, o que pode ter interferido no processo fermentativo, na produção de AVG e, consequentemente, no desenvolvimento das papilas do rúmen.

Tabela 3- Contagem de AgNOR/núcleo nas células epiteliais das papilas da região ventral do rúmen de bezerros recebendo dietas contendo soro de queijo em pó associado ao leite em pó

Variáveis	Dietas líquidas				CV%	P	EPM
	LI	LP	LPS1	LPS2			
Região Ventral							
Base	2,37 ^a	2,67 ^a	2,48 ^a	2,10 ^a	19,22	0,54	0,11
Topo	2,32 ^a	2,51 ^a	2,45 ^a	2,14 ^a	18,14	0,48	0,12

Médias com letras diferentes nas linhas são significativas ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; LI: leite integral (controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó.

Para avaliar o tamanho da superfície de absorção do epitélio do rúmen, além de mensurações macroscópicas, como medição de tamanhos de papilas ruminais, tem-se usado o índice mitótico para medir a capacidade proliferativa do epitélio ruminal. Houve um padrão

semelhante de atividade proliferativa celular nas papilas, independente da dieta líquida fornecida ($P>0,05$).

Os sucedâneos não causaram comprometimento na produção de proteínas argirófilas nas células observadas, independente da dieta ofertada aos animais. A proliferação celular é essencial para a manutenção da integridade da mucosa gastrointestinal normal, com células constantemente entrando ciclos de replicação, maturação e apoptose.

Resende Júnior et al. (2006), ao avaliarem a frequência de alimentação com concentrados, em um experimento com vacas, observaram que a menor frequência de alimentação concentrada resultou em maior índice mitótico da camada basal do epitélio ruminal. No entanto, a maior divisão celular não se refletiu em aumento nas dimensões macroscópicas das papilas do rúmen. No presente estudo, apesar dos animais que consumiram a dieta leite integral (LI) apresentarem maiores alturas de papilas ruminais na região ventral, ao analisarmos o índice mitótico observamos que este é semelhante para todas as dietas testadas, dessa forma, o índice mitótico do epitélio ruminal pode responder à mudanças alimentares, no entanto, este pode não ser o único elemento analisado para determinar o aumento macroscópicos das papila ruminais.

Além disso, a técnica empregada para avaliação do índice mitótico neste trabalho é uma forma indireta de estimar a divisão celular (mitose), já que as substâncias marcadas pela prata são proteínas argirófilas que, não necessariamente, devem ser destinadas a multiplicação celular, essas proteínas podem ser utilizadas para a manutenção de organelas citoplasmáticas dentro das células. Dessa forma, apesar dos mesmos índices de produção de proteínas argirófilas em todos os tratamentos, os animais alimentados com dietas à base soro de queijo em pó e leite em pó possivelmente não destinaram a síntese dessas proteínas para divisão celular, mas provavelmente para a manutenção de organelas citoplasmáticas, refletindo-se em papilas menos desenvolvidas na região ventral do rúmen desses animais.

A morfologia do rúmen pelo método histoquímico de coloração pela prata (AgNOR) está representada na Figura 2, na qual se observam as regiões organizadoras de nucléolo (NOR) em forma de grânulos escuros, distribuídos no núcleo das células do epitélio.

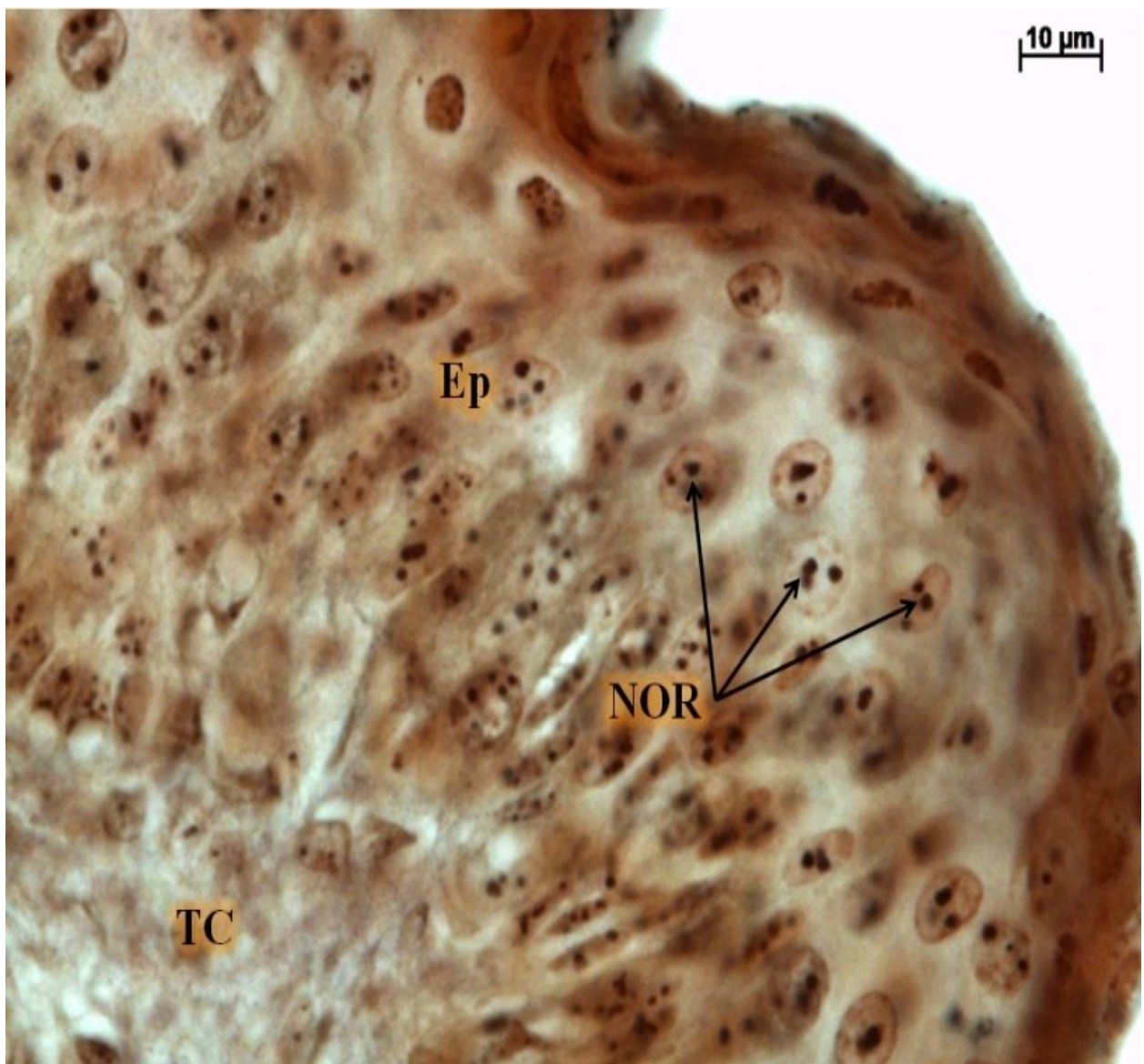


Figura 2. Região ventral do rúmen de bezerros: técnica de coloração pela prata (AgNOR). Os pontos negros nos núcleos são as regiões organizadoras de nucléolo (NORs), magnitude (100x). Tecido conjuntivo (TC). Epitélio (Ep).

Nos cortes histológicos, o número de proteínas argirófilas contadas nas células da região ventral do rúmen de bezerros apresentou uma distribuição homogênea no epitélio nos diferentes campos microscópicos.

Em virtude de a técnica de AgNOR, relacionada ao estudo da proliferação celular do tecido do rúmen, não trazer informações na literatura consultada, recomenda-se que novos estudos sejam realizados para fins de somatória de resultados com o uso da técnica de coloração e contagem de NORs utilizada. Vale salientar que o presente resultado e as

informações relatadas no respectivo estudo podem servir como base para futuros estudos na espécie bovina.

4. CONCLUSÃO

O soro de queijo associado ao leite em pó não afetou o consumo de matéria seca, nem a taxa de proliferação celular nas papilas ruminais, embora tenha afetado negativamente o tamanho das papilas na região ventral do rúmen.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANKS, W. J.; BANKS, W. J. Tecidos de sustentação: osso. **Histologia veterinária aplicada**, v. 2, p. 137-186, 1992.

CHACUR, MARCELO GEORGE MUNGAI et al. Avaliação da técnica de coloração AgNOR em testículos de ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 447-454, 2015.

CHURCH, D.C. Digestion, metabolism and nutrient needs in preruminantes. In: *The ruminant animal digestive physiology and nutrition*. Oregon: Metropolitan Printing, 1993. p.401-420.

COELHO, S. G. Criação de bezerros. In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Associação de Buiatria de Minas Gerais, 2005.

COSTA, S. F. et al. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros: I Aspectos histológicos. **Arq. bras. med. vet. zootec**, p. 1-9, 2008.

COSTA; T.C. et al. Consumo de mistura mineral e desempenho de bezerros alimentados com sucedâneos do leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.749-758, 2007.

DANIEL, JOÃO LUIZ PRATTI. "Avaliação morfofisiológica da absorção e metabolização de ácidos graxos voláteis pelo proventrículo de bovinos." (2007).

DAVID, FLÁVIA MARIA. Diferentes quantidades de soro de leite na alimentação de vacas secas. Diss. Universidade Federal de Lavras, 2006.

DE LIMA, Renata Nayhara et al. Avaliação econômica de dietas líquidas à base de soro de queijo in natura para bezerros. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 1, p. 14-21, 2011.

DE LIMA, Renata Nayhara et al. Desempenho de bezerros aleitados com soro de queijo em associação ao colostro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 47, n. 8, p. 1174-1180, 2012.

DE OLIVEIRA LIMA, Patrícia et al. Desenvolvimento dos estômagos de bezerros recebendo diferentes dietas líquidas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, 2013.

FERREIRA, Lucas Silveira et al. Efeito da adição de butirato de sódio, propionato de cálcio ou monensina sódica no concentrado inicial sobre parâmetros ruminais e de desenvolvimento do rúmen de bezerros leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 11, p. 2238-2246, 2009.

FONTES, F. A.P.V.; COELHO, S.G.; LANA, A.M.Q., COSTA, T.C.; CARVALHO, A.U. Desempenho de bezerros alimentados com dietas líquidas a base de leite integral ou soro de leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n.2, p.212-219, 2006.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FILHO, F. **Nutrição de ruminantes**. 2. Ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 616.

GESTEIRA, S. C. Ganho de peso e desenvolvimento do estômago de bezerros desaleitados aos trinta dias de idade e alimentados com concentrado e com ou sem feno. 1999. Tese (Doutorado).Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

HUBER, J.T. Development of the digestive and metabolic apparatus of the calf. 1. Dairy Sci., 52:1303-15, 1969.

LAGUNA, M.M.; AMARO, M.C.; MOTT, T. et al. Karyological study of *Amphisbaena ridley* (Squamata, Amphisbaenidae), an endemic species of the Archipelago of Fernando de Noronha, Pernambuco, Brazil. **Gen. Molec. Biol.**, v.33, p.57-61, 2010.

LIZIEIRE, R.S. e CAMPOS, O.F. **Soro de queijo "in natura" na alimentação do gado de leite**. In: PASTA DO PRODUTOR DE LEITE Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 19- não paginado (Embrapa Gado de Leite. Pasta do Produtor, 46), 2006.

LUCCI, C. S. **Bovinos leiteiros jovens: Nutrição, manejo, doenças**. São Paulo: Nobel, 1989.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. The viscera of the domestic mammals (2nd edn.) Parey. 1979.

QUIGLEY III, J.D.; BERNARD, J.K. Milk replacers with or without animal plasma for dairy calves. *J. Dairy Sci.*, v.79, p.1881-1884, 1996.

RESENDE JÚNIOR, J.C. et al. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.8, p.3096- 106, Aug. 2006.

SILVA, J. C. P. M. da; OLIVEIRA, A. S. de; VELOSO, M. C. **Manejo e administração em bovinocultura leiteira**. Edição dos autores. Viçosa, 2009.

SILVA, TIAGO MAXIMODA, et al. "Desenvolvimento alométrico do trato gastrintestinal de bezerros da raça holandesa alimentados com diferentes dietas líquidas durante o aleitamento." *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 26.4 (2004): 493-499.

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. **Micron**, v. 31, n. 2, p. 121-126, 2000.

VAN SOEST, Peter J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Cornell University Press, 1994.

ZITNAN, R. et al. Diet induced ruminal papillae development in neonatal calves not correlating with rumen butyrate. **Veterinarni Medicina-Praha-**, v. 50, n. 11, p. 472, 2005.

CAPÍTULO IV
IMUNOHISTOQUÍMICA PARA QUIMOSINA E PEPSINOGENO NO ABOMASO
DE BEZERROS RECEBENDO SORO DE QUEIJO EM PÓ ASSOCIADO AO LEITE
EM PÓ

IMUNOHISTOQUÍMICA PARA QUIMOSINA E PEPSINOGENO NO ABOMASO DE BEZERROS RECEBENDO SORO DE QUEIJO EM PÓ ASSOCIADO AO LEITE EM PÓ

RESUMO: O desempenho do animal depende intimamente de sua fisiologia, dessa forma, para entender os mecanismos que norteiam o desenvolvimento físico se faz necessário um estudo mais aprofundado nos sistemas que interagem na dinâmica celular. Objetivou-se neste estudo testar a influência da utilização do soro de queijo in natura associado ao leite em pó nas células produtoras de quimosina e pepsinogênio do abomaso de bezerros através da técnica imunohistoquímica. Para isso, foram utilizados 8 bezerros mestiços, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e 2 repetições: LI: leite integral (Controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó. Os animais tiveram à sua disposição concentrado farelado, feno e água *ad libitum*, aos 60 dias de idade os animais foram abatidos. Foram coletadas amostras teciduais de 1cm² do abomaso para a realização da Imunohistoquímica. A Imunohistoquímica para quimosina foi realizada em secções idênticas as utilizados para pepsinogênio, e os padrões de marcação nas células Zimogênicas (principais) foram semelhantes, mostrando que as mesmas células produzem simultaneamente as duas enzimas. A síntese de quimosina e pepsinogênio, ocorreu principalmente na região basal das glândulas abomasais. Os percentuais de ácinos contendo células imunorreativas aos anticorpos quimosina e pepsinogênio apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$), onde os bezerros que receberam a dieta 100% leite integral, apresentaram média percentual de marcação para quimosina superior (95,11%), aqueles animais que consumiram a dieta 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó (89,59%).

PALAVRAS-CHAVES: caseína, pepsina, renina

IMMUNOHISTOCHEMICAL FOR CHYMOSIN AND PEPSINOGEN WITHOUT ABOMASUM OF CALVES RECEIVING WHEY POWDER CHEESE ASSOCIATED WITH POWDERED MILK

ABSTRACT: The performance of the animal depends closely on its physiology, so to understand the mechanisms that guide physical development requires a more in-depth study of the systems that interact in the cellular dynamics. The objective of this study was to test the influence of the use of the cheese whey in natura associated with powdered milk in the cells producing chymosin and pepsinogen of calf abomasum through the immunohistochemical technique. For this, eight crossbred calves with were used, distributed in a completely randomized design with four treatments and two replicates: LI: whole milk (Control); LP: milk powder; LPS1: 80% milk powder + 20% whey powder; LPS2: 60% milk powder + 40% whey powder cheese. At 60 days of age the animals were slaughtered, hay and water ad libitum. Tissue samples of 1 cm² were collected from the abomasum for the accomplishment of Immunohistochemistry. Immunohistochemistry for chymosin was performed in sections identical to those used for pepsinogen, and the marking patterns in the (main) Zymogenic cells were similar, showing that the same cells produce both enzymes simultaneously. The synthesis of chymosin and pepsinogen occurred mainly in the basal region of the abomasal glands. The percentage of acini containing immunoreactive cells to the chymosin and pepsinogen antibodies presented a statistical difference ($P < 0.05$), where the calves that received the 100% whole milk diet had a mean percentage of marking for upper chymosin (95.11%), Those animals that consumed the diet 60% milk powder + 40% whey powder cheese (89.59%).

Keywords: casein, pepsin, renin

1. INTRODUÇÃO

Os principais sítios de digestão dos nutrientes contidos no sucedâneo ou leite consumido pelo bezerro no primeiro período de vida são o abomaso e o intestino delgado. O abomaso é o estômago verdadeiro, glandular e com grande capacidade de digestão enzimática de nutrientes, as secreções mais importantes do abomaso são o ácido clorídrico (HCl), a pró-pepsina e a pró-quimosina (Huber, 1969). As enzimas digestivas presentes no abomaso ao nascimento e durante a fase de lactação permitem uma digestão altamente eficiente de proteínas do leite.

A caseína, é a principal proteína do leite integral e possui a propriedade única de coagular-se no abomaso na presença da quimosina, a qual se ativa no ambiente ácido do recém-nascido separando o leite em coágulos de proteína e soro (Lopes et al., 2015). Essa enzima é a encarregada da formação do coágulo de caseína que será digerido lenta e parcialmente no abomaso pela enzima pepsina, a qual é secretada na sua forma inativa (pepsinogênio) e ativada em meio ácido (Drackley, 2008).

Quando o leite integral entra no abomaso, após um período, suas proteínas são desnaturadas pelas condições ácidas (pH 2.0) que resultam da secreção de HCl pelas células parietais da mucosa abomasal. A enzima inativa pró-quimosina é secretada no abomaso, e convertida na enzima ativa quimosina. A gordura que está presa dentro do coágulo, as proteínas do soro, a lactose e os minerais e vitaminas solúveis são excluídos na porção líquida (soro) à medida que o coágulo se contrai (Drackley, 2008). Os componentes solúveis entram no intestino delgado dentro de 2 a 3 horas após uma refeição, enquanto o coágulo de caseína é digerido mais devagar pela pepsina abomasal (Davis et al., 1998).

A acidez do abomaso é baixa (pH 6,0) imediatamente após a alimentação, e aumenta gradualmente pela síntese e secreção de HCL, nesse momento, a maior parte do soro do leite já deixou o abomaso, e o pH do conteúdo abomasal é suficientemente baixo para permitir a dissolução do coágulo de caseína pela pepsina, essa enzima tem somente um terço da capacidade coaguladora da quimosina em pH neutro, porém mais de 20 vezes a atividade proteolítica em pH baixos. O pH ótimo para coagulação pela quimosina é de 6,5, enquanto o pH ótimo para atividade proteolítica é de 4,0 para quimosina e de 2,0 para pepsina. A quimosina tem atividade proteolítica menor que a pepsina (Guilloteau et. al, 1993).

A secreção de quimosina (EC 3.4.23.4), também chamada renina, e pepsinogênio (EC 3.4.23.1) é originária das células zimogênicas (principais), presentes na mucosa gástrica do abomaso (Liebman & Samloff, 1979). As células zimogênicas predominam na região basal

das glândulas gástricas e possuem todas as características de células que sintetizam e exportam proteínas (Junqueira, 2008).

O desempenho do animal depende intimamente de sua fisiologia, dessa forma, para entender os mecanismos que norteiam o desenvolvimento físico se faz necessário um estudo mais aprofundando nos sistemas que interagem na dinâmica celular. Dessa forma objetivou-se com este trabalho testar a influência da utilização do soro de queijo in natura associado ao leite em pó nas células produtoras de quimosina (renina) e pepsina no abomaso de bezerros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na fazenda Flor da Serra localizada no município de Limoeiro do Norte-CE. Foram utilizados 24 bezerros machos com idade 5 ± 3 dias, mestiços de Holandês x SPRD, com peso médio inicial de 35 kg. Os bezerros receberam colostro integral até o terceiro dia de vida, e a partir do 4^a dia foram aleitados com leite integral na quantidade de quatro litros, fornecido duas vezes ao dia (manhã e tarde) até o décimo dia. Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com 4 (quatro) tratamentos e 6 (seis) repetições: LI: leite integral (controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó. Além disso, tinham acesso ao concentrado farelado, feno de Tifton (*Cynodon sp.*) e água *ad libitum*, desde o nascimento até o abate. O período experimental foi realizado durante as seis semanas após o período de adaptação, totalizando 60 dias.

Os anticorpos utilizados neste experimento foram doados pela Swedish University of Agricultural Sciences, provenientes do banco de anticorpos do laboratório Sveriges, Uppasala, Suíça.

Ao abate, foram retirados fragmentos de 1cm^2 (um centímetro quadrado) de abomaso dos bezerros, que foram armazenados em formol por 24 horas e, após esse período, foram realizadas as práticas rotineiras laboratoriais para montagem dos blocos de parafina.

As lâminas foram montadas com dois cortes sequenciais de $5,0\mu\text{m}$ de espessura, em seguida os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados por imersão em soluções decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%) e por fim em água destilada. Posteriormente, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica: as seções foram aquecidas a 96°C em tampão de citrato de sódio 0,1 M, pH 6,0 durante 30 minutos, e lavadas com solução salina de tampão Tris 0,1M e Triton X 0,3% (TTBS). A seguir, os cortes foram submetidos à reação de bloqueio da peroxidase endógena utilizando solução de peróxido de hidrogênio 3% a 25°C por 1 hora, lavados com TTBS, e incubados com o anticorpo primário anti-próquimosina e anti-pepsinogênio (1:40; Andrén, 1981) a 4°C em câmara úmida, durante 18 horas.

Os cortes foram lavados com TTBS, e incubados com anticorpo secundário biotinilado anti-IgG de coelho na diluição de 1:200 (Andrén, 1981), em câmara úmida a 25°C por 2 horas. Posteriormente, os cortes foram lavados com solução salina de tampão tris 0,1M pH 7,2 (TBS) e incubados com o kit ABC (estreptoavidina-biotina) em câmara úmida a 25°C por 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados com TBS e depois incubadas com solução de peróxido de hidrogênio 3% e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 5% por 5 minutos a 25°C , sob

proteção da luz, para revelação da reação imunohistoquímica. A seguir, as lâminas foram lavadas com TBS, desidratadas e montadas para análise.

Os ácinos marcados foram visualizados como pontos amarronzados, e sua contagem foi realizada em um microscópio óptico (Olympus BX51, Olympus optical Co., Alemanha) em 10 campos aleatórios sob aumento de 40x, por um observador que desconhecia os tratamentos aplicados, a fim de não tendenciar os resultados. Em cada campo foram contadas todas as células, não marcadas e marcadas, depois retirou-se a média percentual. Os dados foram agrupados por anticorpo, de acordo com o tratamento, e analisados estatisticamente pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os percentuais de ácidos contendo células imunorreativas aos anticorpos quimosina e pepsinogênio apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$) entre as dietas testadas (Tabela 1). Os bezerros que receberam a dieta 100% leite integral, apresentaram média percentual de marcação para quimosina superior, aqueles animais que consumiram a dieta 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó. Demonstrando que à medida que se reduz a participação do leite na dieta, reduz-se a síntese de quimosina pelas células zimogênicas nas glândulas gástricas do abomaso.

Tabela 1 – Percentuais de ácidos contendo células imunorreativas a quimosina e ao pepsinogênio em bezerros alimentados com dietas contendo soro de queijo associado ao leite em pó.

Variáveis	Dietas Líquidas				CV (%)	P
	LI	LP	LPS1	LPS2		
Quimosina (%)	95,11 ^a	89,59 ^{ab}	90,75 ^{ab}	88,25 ^b	6,94	0,03
Pepsinogênio (%)	72,17 ^a	65,17 ^a	80,02 ^a	85,21 ^a	23,98	0,26

Médias com letras diferentes nas linhas são significativas ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; LI: leite integral (controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó.

A secreção da quimosina na mucosa gástrica está altamente correlacionada com alimentação a base de leite e a idade dos animais (Garnot et al., 1977). Os bezerros do presente estudo foram abatidos aos 60 dias de vida, nessa faixa etária comportam-se fisiologicamente como animais monogástricos. No abomaso há a formação do coágulo resultante da coagulação da principal proteína do leite, a caseína, sob a ação das enzimas, renina (quimosina) e pepsina (Wattiaux, 2003). O soro de queijo possui apenas a parte aquosa do leite que permanece depois da extração da proteína caseína, logo os animais que recebiam a dieta 100% leite integral, tinham acesso a uma quantidade maior de caseína, comparado aqueles animais que recebiam a dieta LPS2 (60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó).

Os animais da dieta leite integral obtiveram um percentual de células produtoras de quimosina superior aos animais da dieta que possuía 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó, pois esses tinham acesso a uma maior quantidade de caseína na dieta, dessa forma, a presença da caseína provavelmente estimularia a maior síntese de quimosina pelas

células zimogênicas da base das glândulas gástricas, essa maior produção de quimosina pode ser justificada, segundo Andrén et al (1981), pelo fato de que a quimosina, em contraste com a pepsina, tem uma atividade proteolítica muito específica e cataliza, principalmente, a hidrólise de uma ligação peptídica específica em K-caseína, para que assim haja o processo de coagulação do leite.

A quimosina possui uma atividade ótima em pH de 4,2 e 3,8, ela age para iniciar a coagulação do leite pela clivagem de k-caseína entre a ligação Phe 105 e Met 106 (Foltman et al. 1987). O leite bovino contém dois grupos de proteínas diferentes, as paracaseínas (fosfoproteínas insolúveis a pH 4,6), e as proteínas do soro (não caseínicas) (Mohanty et al. 1999). Durante a ação da quimosina no sistema de caseinato, a principalmente fração atacada é a k-caseína enquanto as outras frações de caseína permanecem inalteradas, a ação da quimosina depende da adição de cálcio no sistema, quando os íons de cálcio estão presentes, a fração de caseinato sensível ao cálcio junto com a fração insolúvel de para-k-caseína formam um coágulo (Mathur et al. 1983). Logo, quanto maior o percentual de caseína na dieta, maior a produção de quimosina para hidrólise da K-caseína.

Garnot et al. (1974), trabalhando com a determinação da influência das proteínas dietéticas sobre os teores de renina e pepsina em vitela, testaram dietas a base de proteínas do leite, proteínas de soro do leite e uma mistura de 50:50 dessas duas dietas. As determinações enzimáticas nesse experimento indicaram uma tendência para atividade de renina em vitelos alimentados com dietas contendo as proteínas do leite integral (caseína), enquanto o nível de pepsina permaneceu aproximadamente constante, os autores afirmam ainda, que de fato a presença de caseína parece induzir a secreção da renina.

Guilloteau et al. (1984), trabalhando com bovinos em diferentes idades constataram que a quimosina tem uma atividade específica de coagulação do leite, é a enzima dominante em bezerros jovens lactantes, enquanto a pepsina se torna a enzima dominante em bezerros desmamados e bovinos adultos. Andrén et al (1990) trabalhando com imunohistoquímica em bovinos afirmam que o número de células que produziram quimosina estava intimamente relacionado com a alimentação do leite, enquanto a síntese da gástrina estava mais relacionado à idade do bezerro. O fator mais estável durante o desenvolvimento das células no abomaso foi o número de células zimogênicas produtoras de pepsina, onde a síntese de pepsina era observada independente da faixa etária dos animais.

A atividade da renina diminui de acordo com o aumento da idade, enquanto a atividade da pepsina tende a crescer (Guilloteau et. al, 1993). Pois, à medida que os animais crescem, diminuem o consumo de leite integral passando a consumir volumoso e concentrado,

eliminando dessa forma a presença da caseína na dieta, que é o principal estímulo para produção de renina.

Garnot et. al, (1977), utilizando bezerros fistulados, estudaram a influência da idade, o tipo de proteína dietética e o desmame na secreção de quimosina e pepsina pelo abomaso. O abomaso sintetizou tanto a quimosina quanto a pepsina quando os animais foram alimentados com leite, no entanto, a secreção de quimosina pareceu ser independente da idade dos animais, enquanto um aumento lento na secreção de pepsina foi observado à medida que os bezerros envelhecem. Nesse mesmo experimento, eles constataram que quando os animais recebem novamente alimento líquido contendo caseína, a atividade da quimosina aumenta. Porém, não apresentam os mesmos níveis encontrados em animais antes da desmama.

As células zimogênicas parecem sintetizar pró-quimosina ou pró-pepsinogênio de acordo com as proteínas que compõem o plano alimentar do animal, embora alguns autores afirmem que a idade pode interferir nesse processo de síntese, pesquisas científicas apontam que essa diferenciação está ligada a fatores inerentes a dieta administrada, o que pode ser comprovado pelo aumento da produção de quimosina em animais que haviam sido previamente desmamados e depois retomaram a produção dessa enzima com a inclusão do leite integral na dieta novamente.

A marcação das células do abomaso de bezerros aos 60 dias de vida, pelo método imunohistoquímico para o anticorpo quimosina está representada na figura 1, onde pode-se observar que as células Zimogênicas (principais) foram imunorreativas para todos os tratamentos.

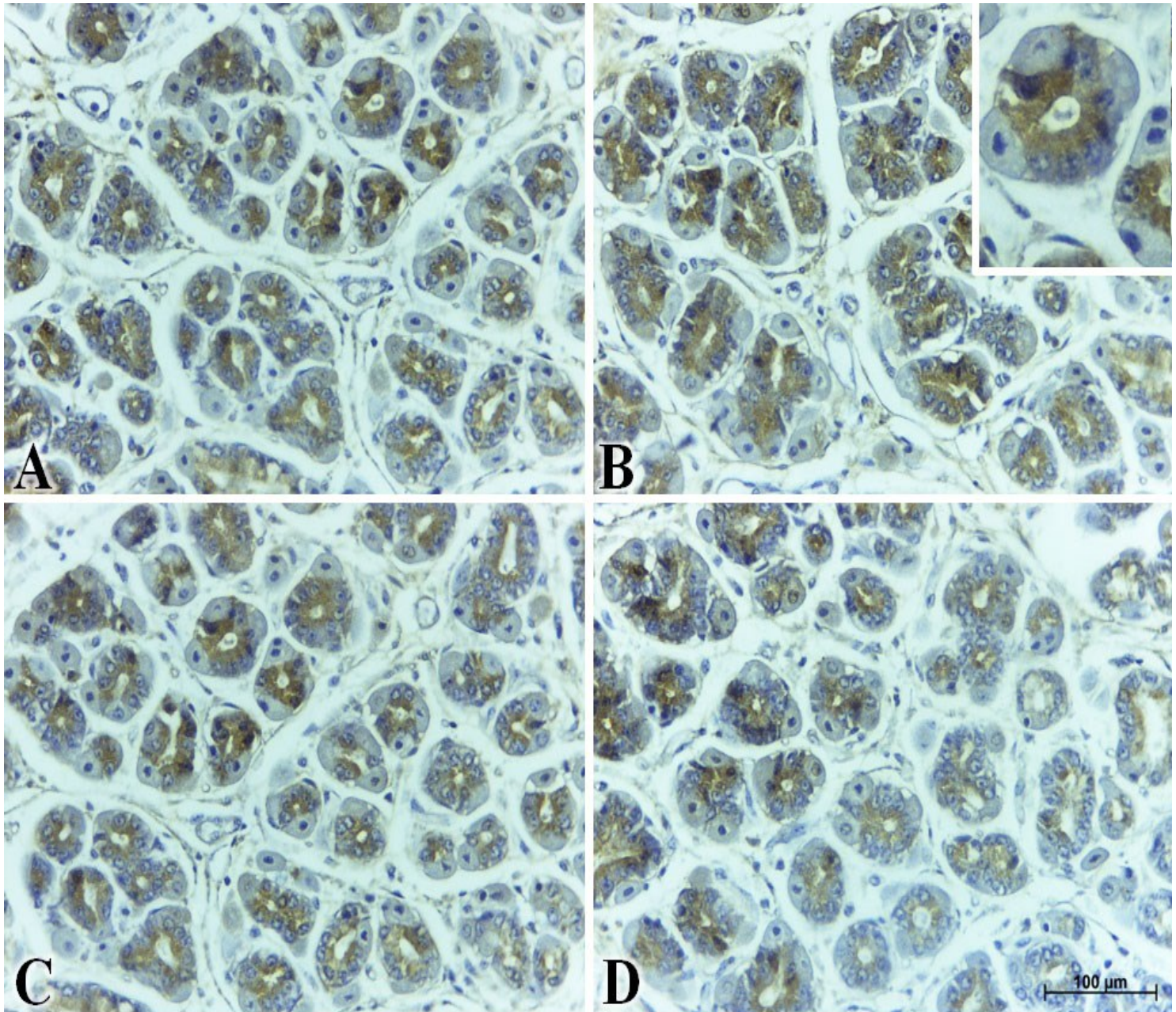


Figura 1. Imunohistoquímica para quimosina no abomaso de bezerros recebendo diferentes dietas líquidas (40X). A) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LI); B) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LP) – Inset com células parietais não marcadas e células principais imunorreativas ao anticorpo quimosina; C) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LPS1) D) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LPS2).

Ocorreu síntese de quimosina pelas células zimogênicas do abomaso de todos os animais neste experimento. No campo óptico, um número expressivo de células parietais (oxínticas), vistas nas imagens como mais arredondadas ou piramidais, com um núcleo bastante esférico ocupando uma posição central, essas células são responsáveis pela produção de ácido clorídrico (HCL) (Junqueira, 2008), e esse grupo de células não apresentaram marcação para os anticorpos incubados.

A Imunohistoquímica para pepsinogênio foi realizada em secções idênticas as utilizadas para quimosina, e os padrões de marcação nas células Zimogênicas (principais) foram iguais, como podemos visualizar na figura 2, mostrando que as mesmas células produzem simultaneamente as duas enzimas.

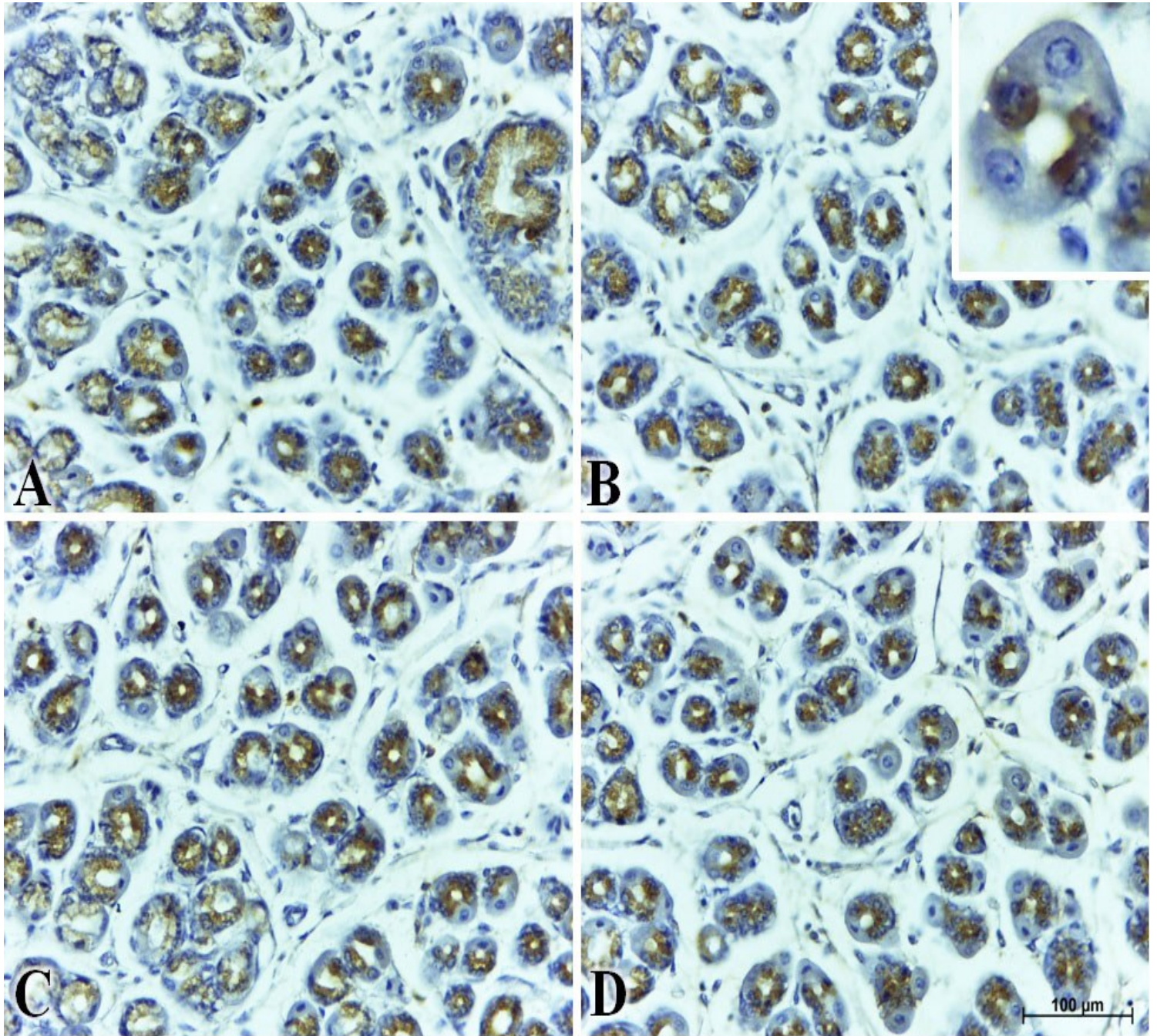


Figura 2. Imunohistoquímica para pepsinogênio do abomaso de bezerros recebendo diferentes dietas líquidas (40X). A) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LI); B) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LP) - Inset com células parietais não marcadas e células principais imunorreativas ao anticorpo pepsinogênio; C) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LPS1); D) Abomaso de bezerros recebendo dieta (LPS2).

Resultados semelhantes aos do presente experimento foram apresentados por Andrén et al. (1981), trabalhando com bovinos em diferentes faixas etárias. Esses autores observaram que no grupo de bezerros com um mês de vida, alimentados exclusivamente com leite integral, todas as células zimogênicas (principais) produziram quimosina e pepsinogênio simultaneamente.

A síntese de quimosina e pepsinogênio pelas células zimogênicas localizaram-se, principalmente, na região basal das glândulas gástricas (Figura 2 – Inset B), e essa característica foi semelhante para todos os tratamentos. Junqueira (2008), afirma que células Zimogênicas (principais) predominam na região basal das glândulas gástricas, e que os grânulos em seu citoplasma contém a enzima inativa pepsinogênio.

Andren et al., (1990) verificaram que em bovinos a pró-quimosina, o pró-pepsinogênio e a pró-gastrina foram sintetizados em diferentes idades e padrões nas regiões das glândulas do abomaso. E isso pode ser explicado, pelo desenvolvimento do animal de um bezerro alimentado com leite para um ruminante adulto. A quimosina, com alta atividade de coagulação do leite e baixa atividade proteolítica, é apropriada para bezerros jovens, pois a IgG no colostro não é degradada pela quimosina podendo ser absorvida no intestino. Quase todas as células nas glândulas fúndicas continuam a produzir pró-quimosina, sendo o bezerro alimentado com leite. Quando o bezerro é desmamado, apenas as células na parte média da glândula fúndica continuam a produzir quimosina. À medida que o pepsinogênio é produzido pelas mesmas células que a quimosina, pode-se esperar que a produção de pepsinogênio seja suprimida pela produção de quimosina, se o bezerro for alimentado com leite. No entanto, quando o bezerro é desmamado e começa a comer capim, feno e cereais, ele precisa de uma protease mais ácida com uma alta atividade proteolítica geral. O bezerro pode então aumentar rapidamente a produção de pepsinogênio em quase todas as células das glândulas fúndicas.

4. CONCLUSÃO

A produção de quimosina nos animais que receberam as dietas contendo soro de queijo em pó foi inferior aquelas encontradas nos animais submetidos a dieta controle (leite integral), no entanto, o desenvolvimento do animal não foi afetado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREN, A., BJÖRCK, L. & CLAESÖN, O. (1981). Effect of supplementary milk-feeding on content of chymosin in the abomasal mucosa of concentrate-fed calves. *Swed. J. agric. Res.* 11, 11-15.

CYBULSKI, WOJCIECH, AND ANDERS ANDRÉN. "Immunohistochemical studies on the development of cells containing progastricsin (minor pepsinogen) in comparison to prochymosin and pepsinogen in bovine abomasal mucosa." *The Anatomical Record* 227.4 (1990): 458-463.

DAVIS, Carl L. et al. **The development, nutrition, and management of the young calf.** Iowa State University Press, 1998.

DRACKLEY, James K. Calf nutrition from birth to breeding. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 55-86, 2008.

FOLTMAN B. General and molecular aspects of rennets. In: Fox PF, editor. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1. London: Elsevier, 1987. pp. 37–68.

GARNOT, P., et al. "Influence of age, dietary protein and weaning on calf abomasal enzymic secretion." *Journal of Dairy Research* 44.01 (1977): 9-23.

GARNOT, PASCALINE, et al. "Influence of dietary proteins on rennin and pepsin content of preruminant calf vell." *Journal of Dairy Research* 41.01 (1974): 19-23.

GUJLLOTEAU, P.; CORRING, T.; GARNOT, P.; MARTIN, P; TOULLEC, R. & DURAND, G. Effects of age and weaning on enzymes activities of abomasum and pancreas of the lamb. *J. Dairy Sci.*, 66:2373-85; 1993.

GUJLLOTEAU, P.; CORRING, T.; GARNOT, P.; MARTIN, P; TOULLEC, R. & DURAND, G. Effects of age and weaning on enzymes activities of abomasum and pancreas of the lamb. *J. Dairy Sci.*, 66:2373-85; 1984.

HUBER, J.T. Development of the digestive and metabolic apparatus of the calf. 1. Dairy Sci., 52:1303-15, 1969.

JUNQUEIRA, L. C. U., AND J. CARNEIRO. "Tecido muscular." Histologia básica-texto e atlas. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan (2008).

KÁTIA, T. de L. et al. Perfil bioquímico sérico de bezerros de origem leiteira aleitados com dietas líquidas alternativas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 27-32, 2015.

LIEBMAN, W. M. & SAMLOFF, I. M. (1979). Cellular localization of hog pepsinogens. J. Histochem. Cytochem. 27, 1112-1113.

MATHUR MP, DUTTA RD. Rennet from living calves. Dairy Guide 1983;5(12):39-47.

MOHANTY, A. K., et al. "Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture." *Biotechnology Advances* 17.2 (1999): 205-217.

THIVEND, P.; TOULLEC, R. & GUILLOTEAU, P. Digestive adaptation in the pre - ruminant. In: Digestive physiology and metabolism in ruminants. Westpoint, AVI, 1980.

WATTIAUX, M. A. **Criação de novilhas - do nascimento a desmama**. Instituto Babcock para pesquisa e desenvolvimento da Pecuária Leiteira internacional. University of Wisconsin-Madison, 2003.