

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**CARACTERIZAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
HISTOLÓGICOS DO RÚMEN DE BEZERROS HOLANDESES MESTIÇOS
PRÉ E PÓS-DESMAME**

Déborah Romaskevis Gomes Lopes

Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L864c
2014
Lopes, Déborah Romaskevis Gomes, 1989-
Caracterização de parâmetros bioquímicos e histológicos do
rúmen de bezerros holandeses mestiços pré e pós-desmame /
Déborah Romaskevis Gomes Lopes. – Viçosa, MG, 2014.
xv, 60f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Bezerro - Alimentação. 2. Rúmen. 3. Fermentação
ruminal. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 636.207

DÉBORAH ROMASKEVIS GOMES LOPES

**CARACTERIZAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
HISTOLÓGICOS DO RÚMEN DE BEZERROS HOLANDESES MESTIÇOS
PRÉ E PÓS-DESMAME**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

DÉBORAH ROMASKEVIS GOMES LOPES

**CARACTERIZAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
HISTOLÓGICOS DO RÚMEN DE BEZERROS HOLANDESES MESTIÇOS
PRÉ E PÓS-DESMAME**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2014.

Prof. Clovis Andrade Neves

Prof^a. Cynthia Canedo da Silva

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Orientador)

*A Deus,
Ao meu porto seguro:
meus pais e minha irmã!*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser infinito com seu amor e presença constante em minha vida, me dando forças e proporcionando muitas bênçãos e vitórias.

Aos meus pais, Geraldo e Auxiliadora, meus exemplos de vida, e minha irmã, Daniela, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais, pela confiança e união, por sempre me mostrarem que nossas conquistas são consequências dos nossos atos. Enfim por serem PERFEITOS! Se posso sonhar alto, é porque tenho certeza que tenho uma base firme para me sustentar!

Aos meus avôs, tios, primos e familiares pelo suporte, orações e carinho. Em especial, ao meu Tio Evaristo pela confiança e apoio, por me ensinar a acreditar em um sonho, mesmo que esse pareça muito distante.

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Departamento de Zootecnia e Departamento de Biologia Geral por tornarem possível a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto.

Ao meu orientador, Professor Hilário, pela paciência, atenção e dedicação. Por sempre estar, literalmente, de portas abertas, se mostrando disposto a discutir, sugerir e aconselhar. Serei sempre grata pelos ensinamentos e excelente orientação!

À minha querida amiga Cláudia pela paciência, atenção, apoio, conselhos, ensinamentos e, sobretudo, pela amizade e companheirismo.

Ao Professor Marcos pelas sugestões, ensinamentos, atenção e por disponibilizar os animais utilizados neste trabalho.

Ao Professor Clovis pela disponibilidade e aconselhamento para o processamento das amostras histológicas.

À Professora Cynthia pela disponibilidade em participar deste trabalho.

Aos Professores Serrão, Gustavo e Sílvia por disponibilizarem os equipamentos para as análises histológicas

Aos professores do Departamento de Microbiologia pelos ensinamentos e pela agradável convivência.

Aos queridos amigos que tive ou tenho a oportunidade de conviver no laboratório de Microbiologia de Anaeróbios: Alexandra, Aline, Ana Andréa, Analice, Anna Gabriella, Bianca, Cláudia, Elsa, Fábila, Fernanda, Henrique, Isabela, Janaína, Juliana, Marcelo, Mônica, Samira, Sofia, Wemerson e William pela amizade, sugestões, aprendizado, ajuda e boa convivência.

À minha grande amiga Aline pelo amor, carinho e incentivo e pelos conselhos e apoio no início do delineamento deste trabalho.

Ao João Paulo, Jessika e demais estudantes da Zootecnia pela disponibilidade, manejo dos animais, abates e coleta das amostras. Vocês são um grande exemplo de trabalho em equipe!

Ao Kenner pela paciência, atenção e aprendizado durante a condução dos procedimentos e análises histológicas.

À funcionária Renata, estudantes Stéphanie e Mariana e demais alunos dos Laboratórios de Biologia Estrutural pela disponibilidade e “dicas histológicas”.

Aos colegas de turma do Mestrado e dos demais laboratórios do Departamento de Microbiologia, em especial meu querido amigo Felipe, minha “chaperona”, pelo companheirismo, carinho e paciência.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial à querida Nilceia pela atenção e torcida e à Sandra e Letícia por sempre me receberem tão bem na secretaria, seja para resolver alguma pendência ou mesmo para apenas tomar um cafezinho do Sr. Custódio.

Aos grandes e eternos amigos que conquistei em Viçosa durante a graduação: André, Broa, Brow, Carol, Dani, Dri, Felipe, Francisquinho, Gabizinha, Gui, Léo, Lolozona, Malú, May e Rafa pelo amor, carinho, apoio e companheirismo.

Às minhas amigas pontenovenses “de sempre e para sempre”, Fabíola, Thaisa, Marina e Natália pela força, amor, carinho e orações.

Aos queridos amigos do intercâmbio, em especial à Nathy pelo grande carinho, torcida e por sempre se esforçar para estar por perto.

Aos professores e funcionários da UFV, em especial aos da “Biologia”, os quais colaboraram imensamente para minha formação.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para essa conquista,
MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

DÉBORAH ROMASKEVIS GOMES LOPES, filha de Geraldo Magela Lopes e Maria Auxiliadora Romaskevis Gomes Lopes, nasceu em 13 de abril de 1989, em Ponte Nova – Minas Gerais.

Iniciou o curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Viçosa, em Março de 2007, pelo qual se graduou Bacharel em Ciências Biológicas em Janeiro de 2012.

Em Março de 2012 ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em Fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 – Revisão de literatura	3
1.1 Pecuária leiteira no Brasil e a alimentação de bezerros durante a fase de cria	3
1.2 Desenvolvimento ruminal	5
1.3 Colonização e estabelecimento do ecossistema ruminal	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO 2 – Parâmetros bioquímicos e histológicos do rúmen de bezerros holandeses mestiços pré e pós–desmame	22
2.1 INTRODUÇÃO	22
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.2.1 Manejo dos animais e coleta das amostras	24
2.2.2 Análise de ácidos orgânicos	26
2.2.3 Análise de amônia e proteína microbiana	27
2.2.4 Análise morfométrica e histológica do rúmen	27
2.2.5 Análise estatística	28
2.3 RESULTADOS	29
2.4 DISCUSSÃO	47
2.5 CONCLUSÕES	54
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 – Revisão de Literatura

Figura 1 – Fotomicrografia de corte longitudinal do rúmen. O fragmento do tecido ruminal foi coletado e processado para análise por microscopia óptica. A barra preta indicada na imagem corresponde a escala de 200 μ m. Abreviações: TE: tecido epitelial; TC: tecido conjuntivo e TM: tecido muscular.

7

Capítulo 2 – Parâmetros bioquímicos e histológicos do rúmen de bezerros holandeses mestiços pré e pós-desmame

Figura 1 – Influência do consumo diário de massa seca total (CMSt) (Kg/d) sobre o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/d) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (\circ) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (\bullet).

29

Figura 2 – Influência do consumo diário de leite (L/d) sobre o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/L) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (\circ) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (\bullet).

30

Figura 3 – Influência do consumo diário de leite (L/d) sobre o consumo diário de massa seca do concentrado (CMSc) (Kg/L) dos bezerros abatidos ao desmame (A) e o consumo diário de massa seca total (CMSt) dos bezerros abatidos 30 dias após o desmame (Kg/L) (B). Para os animais mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame foi avaliado o CMSc, enquanto para os animais mantidos em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame foi avaliado o CMSt. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra dentro da idade não diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey.

31

- Figura 4 – Proporção de acetato, propionato, butirato (%) (A) e concentração total de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) (mmol/L) (B) no rúmen de bezerros de três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra dentro de cada AOV não diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. 33
- Figura 5 – Relação entre a concentração total de AOVs (mmol/L) no rúmen e o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/L) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●). 34
- Figura 6 – Relação entre a proporção de propionato (%) no rúmen e o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/L) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●). 34
- Figura 7 – Concentração de amônia (mmol/L) no rúmen de bezerros de três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. 35
- Figura 8 – Relação entre o consumo diário de massa seca total (CMSt) (Kg/L) e a concentração de amônia (mmol/L) no rúmen dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●). 36
- Figura 9 – Relação entre a concentração de amônia (mmol/L) e o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/L) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o

desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●). 36

Figura 10 – Espessura do tecido epitelial ventral (EV), tecido epitelial dorsal (ED), tecido conjuntivo ventral (CV), tecido conjuntivo dorsal (CD) (μm) do rúmen de bezerros de três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame. 37

Figura 11– Densidade ($\text{n}^\circ/\text{cm}^2$) (A) e altura das papilas (μm) (B) das regiões ventral e dorsal do rúmen de bezerros com três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra dentro da idade (três dias, desmame ou pós – desmame) não diferem entre si ao nível de 10 % de significância pelo teste de Tukey. 38

Figura 12 – Densidade de papilas na porção ventral do rúmen de animais abatidos com três dias de vida (A), ao desmame (B) e 30 dias após o desmame (C). As imagens dos fragmentos do tecido ruminal foram obtidas com câmera digital acoplada a lupa binocular. As barras brancas indicadas nas imagens correspondem a escala de 600 μm . 39

Figura 13 – Relação entre a altura das papilas (μm) e a densidade de papilas ($\text{n}^\circ/\text{cm}^2$) do rúmen dos bezerros. Foi avaliada a altura e densidade das papilas das porções ventral (A) e dorsal (B) do rúmen dos animais de três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame. 40

Figura 14 – Relação entre a densidade de papilas ($\text{n}^\circ/\text{cm}^2$) ventral (A) e dorsal (B) e o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/L) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●). 41

Figura 15 – Influência do consumo diário de massa seca (CMS) (Kg/L) sobre a altura das papilas (μm) e espessura do tecido muscular (μm) do rúmen dos bezerros. Para os animais mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (A e C) foi avaliado o efeito consumo de massa seca do concentrado (CMSc), enquanto para os animais mantidos em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (B e D) foi avaliado o consumo de massa seca total (CMSt). Foi avaliada a altura das papilas e a espessura do tecido muscular das porções ventral (●) e dorsal (○) do rúmen. 43

Figura 16 – Influência da concentração de propionato (mmol/L) sobre a altura das papilas (μm) do rúmen dos bezerros abatidos ao desmame (A) e 30 dias após o desmame (B). Foi avaliada a altura das papilas das porções ventral (●) e dorsal (○) do rúmen dos animais mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (A), bem como dos animais mantidos em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (B). 45

Figura 17 – Influência da concentração total de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) (mmol/L) sobre a altura das papilas (μm) do rúmen dos bezerros abatidos ao desmame (A) e 30 dias após o desmame (B). Foi avaliada a altura das papilas das porções ventral (●) e dorsal (○) do rúmen dos animais mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (A), bem como dos animais mantidos em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (B). 46

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 – Parâmetros bioquímicos e histológicos do rúmen de bezerros holandeses mestiços pré e pós-desmame

- Tabela 1 – Esquema de alimentação dos animais utilizados nos experimentos. Os animais foram alimentados com ração concentrada e as quantidades de leite indicadas até o desmame, quando passaram a receber feno *Coast cross (Cynodon dactylon) ad libitum* na dieta. 24
- Tabela 2 – Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDN_{cp}) e carboidratos totais (CHO_{Total}) do concentrado fornecido aos bezerros. 25
- Tabela 3 – Composição de ingredientes (% matéria natural) do concentrado fornecido aos bezerros. 25

RESUMO

LOPES, Déborah Romaskevis Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Caracterização de parâmetros bioquímicos e histológicos do rúmen de bezerros holandeses mestiços pré e pós-desmame.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Coorientador: Marcos Inácio Marcondes.

Ao nascer os animais ruminantes possuem o rúmen não-funcional. O desenvolvimento do rúmen envolve a colonização por micro-organismos, estabelecimento da fermentação ruminal, aumento do volume, fortalecimento da musculatura e crescimento das papilas (aumento da área absorptiva). Estudos sugerem que a introdução de alimentos sólidos na dieta auxilia no desenvolvimento anatômico e fisiológico do rúmen. Neste trabalho bezerros holandeses mestiços alimentados com diferentes níveis de leite (2, 4, 6 e 8 litros/dia) e concentrado *ad libitum* durante a fase de aleitamento foram utilizados para avaliar o ganho de peso, consumo de matéria seca, concentração de amônia e ácidos orgânicos no rúmen, bem como a espessura dos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular e a densidade e altura das papilas ruminais dos animais ao desmame e 30 dias após desmame. O aumento do ganho médio diário de peso (GMD) esteve associado ao aumento do consumo diário de massa seca total (CMSt). O consumo diário de massa seca do concentrado (CMSc) e o volume de leite diário dos animais abatidos ao desmame apresentaram alta correlação quadrática ($r = 0,83$), sendo que o ponto máximo de CMSc (0,27 Kg/d) foi observado nos animais que consumiram quatro litros de leite por dia. O CMSt após o desmame não variou ($P > 0,05$) para os animais que consumiram 4, 6 e 8 litros de leite/dia durante a fase de aleitamento. A concentração de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) no rúmen aumentou ($P < 0,05$) com a idade dos animais, no entanto a proporção de acetato, propionato e butirato (4,5 : 3 : 1) não variou ($P > 0,05$) ao desmame e 30 dias após o desmame. Animais com maiores GMD abatidos ao desmame apresentaram menores proporções de propionato no rúmen. A média das concentrações de amônia no rúmen dos animais abatidos ao desmame foi 2,5 vezes maior ($P < 0,05$) que o observado nos animais abatidos com três dias de idade e 30 dias após a introdução de feno na dieta. A concentração de amônia no rúmen foi maior com o aumento do CMSt e representou aumento do GMD dos animais. As espessuras dos tecidos epitelial e conjuntivo não variaram ($P > 0,1$) com a idade, enquanto a altura das papilas aumentou ($P < 0,1$) e a densidade das papilas reduziu (P

< 0,1). O GMD dos animais abatidos ao desmame aumentou com a redução da densidade de papilas (ampliação da superfície de absorção do epitélio ruminal). O aumento CMSc dos animais abatidos ao desmame não influenciou a espessura do tecido muscular, porém esteve relacionado com o aumento da altura das papilas. A concentração de propionato e a altura das papilas da porção ventral do rúmen dos animais abatidos ao desmame apresentaram alta correlação quadrática ($r = 0,82$), sendo que as maiores alturas foram observadas quando a concentração de propionato foi cerca de 30 mmol/L. Esses resultados demonstraram que a oferta de diferentes quantidades de leite durante a fase de aleitamento influencia o consumo de concentrado, o que refletiu no desenvolvimento das papilas do rúmen. Além disso, o aumento da capacidade de consumo de concentrado com a idade do animal representa um aumento da disponibilidade de substratos para a fermentação pela microbiota ruminal.

ABSTRACT

LOPES, Déborah Romaskevis Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Biochemical and histological characterization of the rumen of holstein crossbred calves at weaning and post-weaning.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-adviser: Marcos Inácio Marcondes.

At birth, ruminant animals have a non-functional rumen. The maturation of the forestomachs involves colonization by anaerobic microorganisms, establishment of ruminal fermentation, increase in volume, muscle strengthening and papillae growth (which increases absorptive area). Studies suggest that the introduction of solid feeds in the diet aids the anatomical and physiological development of the rumen. In this work, Holstein crossbred calves fed different levels of milk (2, 4, 6 and 8 liters/day) and concentrate *ad libitum* during the breast-feeding period were used to evaluate the weight gain, dry matter intake and ammonia and volatile fatty acids (VFA) concentration in the rumen. Additionally, the thickness of the epithelium, conjunctive, muscle tissues, and height and density of the rumen papillae at weaning and 30 days after weaning was also determined. The increase in average daily gain (ADG) was associated with increased daily intake of total dry matter (TDMI). The daily dry matter intake of concentrate (DMI_c) and the daily milk intake of animals sacrificed at weaning showed a high quadratic correlation ($r = 0.83$), whereas the maximum DMI_c (0.27 kg/d) was observed when the animals were fed four liters of milk daily. The TDMI after weaning did not differ ($P > 0.05$) for animals fed 4, 6 and 8 liters of milk/day during the breast-feeding period. The concentration of volatile fatty acids (VFAs) in the rumen increased ($P < 0.05$) with animal age, but the proportion of acetate, propionate and butyrate (4.5 : 3: 1) did not differ ($P > 0.05$) at weaning and 30 days after weaning. Animals with larger ADG sacrificed at weaning had lower proportions of propionate in the rumen. The mean ammonia concentration in the rumen of animals sacrificed at weaning was 2.5 times larger ($P < 0.05$) than that observed in animals sacrificed three days old and 30 days after the introduction of hay in the diet. The ammonia concentration in the rumen increased with TDMI and was related to a greater ADG of the animals. The thickness of the epithelial and conjunctive tissue did not differ ($P > 0.1$) with age, whereas the height of the papillae increased ($P < 0.1$) and the density of the papillae reduced ($P < 0.1$). The ADG of the animals sacrificed at weaning increased with the reduction of papillae density

(enlargement of the absorption surface of the rumen epithelium). The increase in DMIC of animals sacrificed at weaning did not influence the thickness of the muscle tissue. However, it was associated with increased papillae height. The propionate concentration and papillae height of the ventral sac of the rumen of animals sacrificed at weaning showed a quadratic correlation ($r = 0.82$), and higher papillae were observed when the propionate concentration was about 30 mmol/l. These results indicate that different levels of milk intake during the breast-feeding period influence the intake of concentrate, which reflected in the development of the rumen papillae. In addition, the ability to consume concentrate feeds increased with age, making more substrates available for rumen microbial fermentation.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil ocupa a quinta posição na produção mundial de leite, sendo que no ano de 2012 foram produzidos mais de 22 bilhões de litros de leite no país. Entretanto, as condições sanitárias do rebanho e a nutrição dos animais podem reduzir a produtividade de leite e causar prejuízos ao produtor. A fase de aleitamento dos bezerros representa o período de maior custo na criação e pode influenciar a produtividade dos rebanhos. Neste período, o leite constitui a base da alimentação dos animais. No Brasil, o sistema de manejo mais comum preconiza o fornecimento de quatro litros de leite/dia/animal e concentrado *ad libitum*.

Os ruminantes possuem o estômago multicavitário composto pelo rúmen, retículo, omaso e abomaso, sendo que os três primeiros compartimentos apresentam epitélio não-glandular, com capacidade absorptiva. Os micro-organismos ruminais (bactérias, fungos e protozoários) vivem em simbiose com o hospedeiro e são capazes de hidrolisar carboidratos solúveis, insolúveis, proteínas e lipídeos da dieta. Os ácidos orgânicos voláteis (AOV) resultantes da fermentação ruminal representam a principal fonte de energia para os animais ruminantes e são absorvidos através do epitélio ruminal.

Após o nascimento, os bezerros são considerados pré-ruminantes, uma vez que possuem o rúmen não funcional. Nesta fase, os processos de digestão e absorção ocorrem, principalmente, no abomaso. O desenvolvimento do rúmen envolve a colonização microbiana e o estabelecimento dos processos fermentativos, bem como o aumento do volume, fortalecimento da musculatura e crescimento das papilas (aumento da área absorptiva). Estudos sugerem que a introdução de alimentos sólidos na dieta estimula a secreção salivar e auxilia no desenvolvimento anatômico e fisiológico do rúmen.

Apesar de o leite atender a demanda de energia dos bezerros durante a fase de cria, o fornecimento exclusivo de dieta líquida limita o desenvolvimento ruminal. O atrito dos alimentos sólidos sobre a parede do rúmen é importante para estimular o crescimento das papilas e a contração das camadas musculares. Além disso, a disponibilidade e o consumo de diferentes substratos afetam a composição e atividade metabólica dos micro-organismos, com consequente alteração dos produtos

finais da fermentação. A absorção dos AOVs pelo epitélio ruminal também estimula a proliferação celular e crescimento das papilas. Dentre os AOVs, o butirato e o propionato são os que possuem maior efeito na proliferação celular possivelmente por serem metabolizados ao serem absorvidos pelo epitélio ruminal.

A colonização e estabelecimento da fermentação ruminal, bem como o amadurecimento anatômico do rúmen são essenciais para o desenvolvimento e crescimento dos bezerros. A compreensão da influência da dieta no desenvolvimento ruminal de bezerros representa um passo importante para a formulação de estratégias de aleitamento e desmame visando o aumento da eficiência alimentar e produtividade dos animais ruminantes. Desta forma, neste trabalho parâmetros histológicos e bioquímicos do rúmen foram utilizados para a caracterização do desenvolvimento ruminal de bezerros holandeses mestiços, alimentados com diferentes níveis de leite e concentrado *ad libitum*, durante a fase de aleitamento, e com feno e concentrado após o desmame.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Pecuária leiteira no Brasil e a alimentação de bezerros durante a fase de cria

A pecuária leiteira é um importante segmento da economia brasileira, representando cerca de 20 % do valor bruto da produção agropecuária (IBGE, 2010). No ano de 2012, a produção de leite no Brasil foi de 22,3 bilhões de litros (IBGE, 2013), sendo a região sudeste é responsável por aproximadamente 35 % da produção nacional. Neste contexto, o Estado de Minas Gerais responde por 76 % do volume de leite produzido da região sudeste. Apesar de a pecuária leiteira ocupar posição de destaque no cenário mundial, a produtividade de leite nas propriedades brasileiras ainda é baixa quando comparada aos países desenvolvidos (FAO, 2012). Vários fatores, tais como a alimentação dos animais, as condições de manejo, clima, instalações, mão-de-obra, potencial genético, políticas comerciais (taxas de importação e normas de qualificação de leite importado) e a sanidade dos animais frequentemente contribuem para reduzir a produtividade e aumentar os custos da pecuária leiteira no Brasil (Coelho, 1999; Coelho, 2009).

A fase de cria ou fase de aleitamento compreende o período do nascimento até o desmame dos bezerros. Apesar de representar a fase de menor rentabilidade na pecuária leiteira, o manejo e desempenho dos animais nesse período influenciam os índices de produtividade do animal adulto (Silva, 2010). Nesta fase, o manejo dos animais representa 15 a 20 % dos custos totais de uma propriedade, sendo que 50 a 60 % destes gastos estão relacionados com a alimentação. Durante o aleitamento, os custos diários com os animais são tipicamente maiores em relação às outras fases da recria. Além disso, a taxa de mortalidade de animais nesta fase é elevada, representando perdas econômicas expressivas para o produtor (Davis e Drackley, 1998).

A taxa de mortalidade elevada tem sido relacionada com diversos fatores, incluindo tamanho do rebanho, instalações inadequadas, época de nascimento, quantidade e qualidade do colostro e diarreia (Diaz *et al.*, 2001). Este último fator se

destaca entre as causas de óbito de animais nos rebanhos durante a fase de cria e está relacionado, na maioria dos casos, com a baixa qualidade sanitária do leite fornecido aos animais, contrariando a ideia de que esse fato se deve apenas à ingestão excessiva do alimento (Heinrichs *et al.*, 1995; Davis e Drackley, 1998; Diaz *et al.*, 2001). Assim, as práticas de manejo dos animais na fase de cria devem considerar o alojamento adequado dos bezerros, a prevenção de doenças infecciosas e, principalmente, a adoção de um sistema de nutrição adequado e de qualidade (Wattiaux, 1997).

A nutrição nas primeiras semanas de vida dos bezerros afeta o desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico e influencia o desenvolvimento da glândula mamária e a produção futura de leite (Anderson 1987; Drackley, 2005; Khan *et al.*, 2007). Além disso, o fornecimento de dietas balanceadas para os bezerros é importante para o desenvolvimento adequado do sistema endócrino e para maior deposição de tecidos magros (Blum e Hammon, 2000).

No Brasil, o aleitamento dos bezerros é baseado nas necessidades nutricionais dos animais e no peso ao nascimento, sendo recomendado o fornecimento de leite na base de 10 % do peso do animal e desmame aos 60 dias de idade (Coelho, 1999; Coelho, 2009). Em média, os bezerros mestiços nascem com cerca de 40 quilos, logo são alimentados com 4 quilos de leite ao dia, fornecida em uma ou duas refeições. No entanto, alguns trabalhos evidenciam que o fornecimento de leite em quantidades maiores possibilita taxas de ganho de peso mais elevadas, sem causar diarreia ou comprometer a ingestão futura de alimentos sólidos (Diaz *et al.*, 2001; Jasper e Weary, 2002; Drackely, 2008). Desta forma, embora seja mais oneroso, esse sistema poderia ser vantajoso para o produtor já que taxas de ganho de peso mais elevadas possibilitariam antecipar a primeira gestação, diminuindo o ciclo do animal para produção, aumentando a eficiência do sistema. Apesar disso, a maioria dos produtores é resistente a essa prática, prevalecendo como prática de manejo o fornecimento de quantidades fixas de leite (4 litros de leite ao dia) e concentrado *ad libitum* (Coelho, 1999; Coelho, 2009).

A oferta de alimentos concentrados aos bezerros está relacionada tanto com o fornecimento adicional de nutrientes, quanto como desenvolvimento ruminal (Coverdale *et al.*, 2004). A restrição no volume de leite oferecido é importante já que

esta prática estimula o consumo de alimentos sólidos pelo animal (Drackely, 2008). Entretanto, alguns estudos sugerem que a redução drástica da oferta de leite (quantidades menores que 10 % do peso do animal ao nascimento) aos bezerros nas primeiras semanas de vida não é compensada pela oferta de alimentos sólidos, comprometendo o desenvolvimento do animal (Baker *et al.*, 1976; Abdelsamei *et al.*, 2005; Kristensen *et al.*, 2007).

A capacidade de consumo de concentrado pelos bezerros é um dos parâmetros a serem considerados na escolha da época de desaleitamento dos animais. A adoção de um sistema de alimentação adequado é essencial para o estabelecimento do ecossistema ruminal, que é determinante para o sucesso da transição dos animais para a dieta essencialmente sólida (alimentos volumosos) após o desmame (Quigley, 1996; Khan *et al.*, 2011).

1.2 Desenvolvimento ruminal

Os ruminantes caracterizam-se por possuírem estômago multicavitário composto pelo rúmen, retículo, omaso e abomaso e por regurgitarem o alimento parcialmente digerido (Russell, 2000). Do nascimento até cerca de três semanas de idade, os bovinos são considerados pré-ruminantes por possuírem o rúmen não funcional, cujo desenvolvimento envolve mudanças anatômicas e fisiológicas (Warner, 1956; Bryant *et al.*, 1958; Tamate *et al.*, 1962; Beharka *et al.*, 1998). Nas primeiras semanas de vida, os processos de digestão e metabolismo dos bezerros são similares ao estômago dos animais monogástricos. Nesse período, reflexos estimulados pelo ato de sucção do leite e condicionados pelo nervo glossofaríngeo e nervo vago induzem a contração de uma dobra tecidual da base do esôfago ao orifício retículo-omasal formando um tubo, denominado goteira esofágica, que desvia o alimento do rúmen-retículo (Rodrigues *et al.*, 2002). Desta forma, a maior parte alimento ingerido, flui diretamente para o omaso e abomaso, no qual ocorre parte do processo de digestão e absorção dos nutrientes provenientes, basicamente, de fontes lácteas (Huber, 1969; Church, 1988). Wise e Anderson (1939) observaram que 40 % do leite e 95 % da água ingerida por bezerros até 20 dias fluem para o rúmen. Consequentemente, o leite seria o primeiro substrato para fermentação ruminal.

A transição do sistema digestivo de bovinos da condição de pré-ruminante para o ruminante adulto está relacionada com o tipo de alimento ingerido. Assim, a nutrição é um dos principais fatores neste processo, o qual é amplamente influenciado pelo consumo de alimentos sólidos (Anderson *et al.*, 1987; Baldwin *et al.*, 2004). O fornecimento exclusivo de dieta líquida limita o desenvolvimento anatômico e fisiológico do rúmen, bem como retarda a atividade oral, como a mastigação e ruminação, normalmente exibidas por bezerros que recebem alimentos concentrados (Tamate *et al.*, 1962, Cozzi *et al.*, 2002; Sweeney *et al.*, 2010). Estudos demonstram a perda de peso, após o desmame, de bezerros alimentados exclusivamente com leite *ad libitum*, devido o comprometimento do funcionamento ruminal desses animais (volume e capacidade metabólica) (Khan *et al.*, 2007; Sweeney *et al.*, 2010). Além disso, o fornecimento de maiores volumes de leite ou sucedâneos (dieta preferencial nesta etapa da vida) reduz o consumo de concentrado pelos bezerros, quando este é oferecido na dieta (Drackley, 2005). Segundo Huber (1969), bezerros que consomem concentrado desde o nascimento apresentam rúmen qualitativamente similar ao animal adulto por volta da sexta semana de vida.

Anatomicamente, o desenvolvimento do rúmen envolve aumento de tamanho, fortalecimento da musculatura, desenvolvimento das papilas (aumento da área absorptiva) e queratinização do epitélio (Huber, 1969; Church, 1983; Li *et al.*, 2012). O rúmen dos bezerros recém nascidos representa 29 % do volume total dos compartimentos do estômago, enquanto nos animais adultos essa proporção é de 55 % (Li *et al.*, 2012).

O atrito dos alimentos sobre a parede do rúmen é importante para estimular o desenvolvimento e a contração das camadas musculares, bem como manter a integridade epitelial e estimular sua proliferação (Greenwood *et al.*, 1997; Bannink 2008). O epitélio ruminal é estratificado, não glandular e organizado em quatro camadas bem definidas: estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo (Lavker *et al.*, 1969). A proliferação e crescimento das células epiteliais promovem o aumento do comprimento, largura e espessura das papilas ruminais (Church, 1988; Kristensen *et al.*, 2007). As papilas são estruturas cônicas, formadas de tecido conjuntivo e cobertas por epitélio, que se projetam para o lúmen e estão relacionadas com o aumento da superfície de absorção do rúmen (Dobson *et al.*, 1956; Banks, 1991) (Figura 1).

O comprimento médio das papilas do rúmen de um bezerro recém-nascido é inferior a um milímetro. No entanto, as papilas crescem rapidamente com a idade e ingestão de alimentos sólidos e atingem aproximadamente sete milímetros até o sexto mês de vida do animal (Warner *et al.*, 1956; Tamate *et al.*, 1962). A distribuição, número, tamanho e o formato das papilas são dinâmicos e sujeitos às mudanças da dieta (Kristensen *et al.*, 2007).

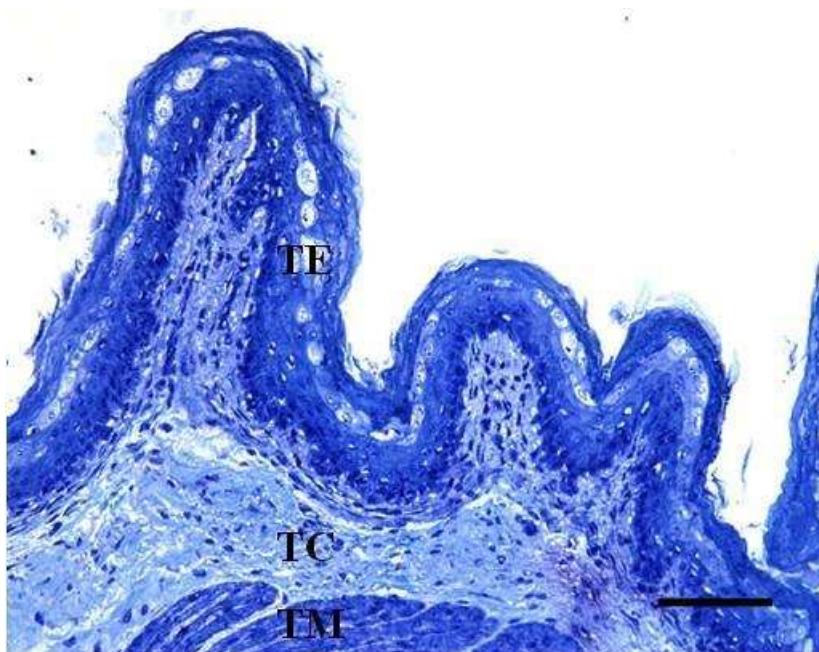


Figura 1 – Fotomicrografia de corte longitudinal do rúmen. O fragmento do tecido ruminal foi coletado e processado para análise por microscopia óptica. A barra preta indicada na imagem corresponde a escala de 200 µm. Abreviações: TE: tecido epitelial; TC: tecido conjuntivo e TM: tecido muscular.

Enquanto a fibra da dieta estimula a musculatura ruminal e o aumento da capacidade do rúmen, os ácidos orgânicos voláteis (AOVs), resultantes dos processos fermentativos catalisados pelos micro-organismos ruminais, estimulam o desenvolvimento da mucosa (Feel *et al.*, 1968; Weigand *et al.*, 1975; Lesmeister e Heinrichs, 2004). Os AOVs são absorvidos pelo epitélio ruminal e representam a principal fonte de energia para o animal. O propionato, por meio da gliconeogênese, é convertido em glicose, a maior fonte de energia para o ruminante (Huntington, 1990; Allen *et al.*, 2005). O acetato e o butirato são utilizados como fontes primárias de energia, sendo o acetato o principal substrato para a lipogênese (Bergman, 1990).

Os AOVs não dissociados são permeáveis à bicamada lipídica das células epiteliais, assim são transportados via difusão passiva (López *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2007). Esse mecanismo apresenta taxas de absorção baixas, uma vez que devido ao pH (5,5 – 7) e às condições de osmolaridade do rúmen cerca de 90 % dos AOVs está dissociado (Krause e Oetzel, 2006; Penner e Oba, 2009). Assim, o transporte de AOVs dissociados mediado por proteínas é uma alternativa para a difusão passiva (Bugaut, 1987; Bergman, 1990; Dijkstra, 1994; Kirat *et al.*, 2006). Kirat e colaboradores (2006) demonstraram a absorção de AOVs dissociados pelo epitélio ruminal via transportadores de monocarboxilatos.

Dentre os AOVs, o butirato é relatado como o mais importante no desenvolvimento das papilas, seguido pelo propionato, sendo o acetato menos relevante neste processo (Sander *et al.*, 1959; Tamate *et al.*, 1962; Lesmeister e Heinrichs, 2004). Estudos demonstram que a infusão intra - ruminal de butirato e/ou propionato induz a proliferação de células epiteliais ruminais (Sander *et al.*, 1959; Sakata e Tamate, 1978; Sakata *et al.*, 1980; Nozière *et al.*, 2000). Gorka e colaboradores (2009) demonstraram que bezerros alimentados com sucedâneos de leite acrescidos de butirato apresentaram aumento no tamanho das papilas ruminais quando comparados com os animais que foram alimentados apenas com o sucedâneo. Em contraste com os estudos *in vivo*, o efeito inibitório do butirato sobre culturas de células epiteliais ruminais tem sido reportado (Neogrády *et al.*, 1989; Gálfi *et al.*, 1993; Baldwin, 1999). Esses resultados suportam o conceito que os AOVs não promovem diretamente a proliferação das células epiteliais (Zhao e Sun, 2010). Acredita-se que o processo de absorção poderia causar uma leve reação inflamatória no tecido epitelial estimulando a liberação de fatores de crescimento pelas células (Hamada, 1975, Baldwin, 1999; Zhao e Sun, 2010). Além disso, estudos sugerem que o efeito estimulatório dos AOVs sobre o desenvolvimento papilar seria devido à indução do maior fluxo sanguíneo no tecido, provendo maior suprimento energético às células epiteliais (Hinders e Owen, 1965; Barnes, 1983; Zhao e Sun, 2010).

1.3 Colonização e estabelecimento do ecossistema ruminal

Os ruminantes são mamíferos herbívoros e não sintetizam enzimas responsáveis pela degradação dos componentes fibrosos (celulose, hemicelulose e lignina) da dieta. No entanto, são capazes de estabelecer relações simbióticas com micro-organismos anaeróbios capazes de fermentar alimentos de diferentes origens, como carboidratos solúveis e insolúveis, proteínas e lipídeos. Os ruminantes fornecem ambiente adequado para o desenvolvimento dos micro-organismos anaeróbios, enquanto estes, por meio da fermentação dos componentes da dieta, disponibilizam amônia, aminoácidos, vitaminas e ácidos orgânicos para o hospedeiro (Hungate, 1966; Russell, 2002; Krause *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2008).

Ao nascer, os ruminantes são rapidamente colonizados por uma comunidade microbiana abundante e diversificada. O primeiro contato dos animais com micro-organismos ocorre durante a passagem do bezerro pelo canal do parto, no qual são expostos a espécies colonizadoras pioneiras, como as bactérias do gênero *Lactobacillus*. O contato do recém-nascido com outros animais (ato da vaca lamber sua cria, por exemplo) e com a vegetação da cama (contaminada por fezes e matéria orgânica em decomposição), bem como a ingestão do colostro, leite e o próprio contato com o úbere da vaca durante a amamentação também são fatores que contribuem para a colonização microbiana dos animais (Hobson, 1997; Curtis e Sloan, 2004; Rey *et al.*, 2013).

A dieta possui grande influência no estabelecimento da microbiota ruminal, já que a ingestão de alimentos proporciona um inóculo contínuo de micro-organismos que colonizam o rúmen dos animais jovens, contribuindo para o estabelecimento do ecossistema microbiano ruminal (Fonty *et al.*, 1987; Van Soest, 1994). Inicialmente, o rúmen dos bezerros recém-nascidos é colonizado por um número elevado de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, entretanto, a introdução de alimentos sólidos na dieta proporciona substratos e condições adequados para o estabelecimento dos micro-organismos anaeróbios, que compõe a microbiota ruminal dos animais adultos (Bryant *et al.*, 1958; Fonty *et al.*, 1987; Minato *et al.*, 1992). Rey e colaboradores (2013) relataram, a partir da utilização da técnica de pirosequenciamento metagenômico do gene rRNA 16S, que a comunidade bacteriana do rúmen de bezerros de dois dias de idade é composta principalmente por bactérias

dos filos Proteobacteria (70%) e Bacteroidetes (14%), sendo que os membros da família Pasteurellaceae são predominantes (58%). Este mesmo estudo demonstrou que a comunidade bacteriana ruminal muda entre o segundo e o terceiro dia de vida, sendo que no décimo segundo dia de idade o filo Bacteroidetes já representa mais de 55 % da composição da comunidade bacteriana ruminal, enquanto o filo Proteobacteria corresponde a apenas 17 % da população total. Tanto estudos baseados em métodos clássicos e dependentes de cultivo para a enumeração de micro-organismos (Fonty *et al.*, 1987; Minato *et al.*, 1992), quanto estudos mais recentes, baseados em técnicas metagenômicas (Li *et al.*, 2012; Jami *et al.*, 2013; Rey *et al.*, 2013), demonstram a presença de bactérias celulolíticas no rúmen a partir do terceiro dia de vida dos animais. Nos bezerros alimentados com leite e concentrado as espécies de bactérias do gênero *Prevotella*, que é o grupo predominante nos animais adultos (Stevenson e Weimer, 2007), tornam-se as populações mais abundantes no rúmen após duas semanas de idade (Li *et al.*, 2012; Jami *et al.*, 2013; Rey *et al.*, 2013). Adicionalmente, Li e colaboradores (2012) relataram a presença de micro-organismos representativos dos principais grupos funcionais de animais adultos no rúmen de bezerros com 42 dias de idade.

A composição da comunidade microbiana do rúmen é influenciada tanto pela dieta quanto pela idade do animal. A diversidade e homogeneidade da comunidade microbiana ruminal aumentam com a idade (Jami *et al.*, 2013) e estudos relatam que quanto mais cedo os bezerros começam a ingerir alimentos sólidos, mais rápido a composição e funcionalidade ruminal tornam-se semelhantes ao observado em animais adultos (Pitta *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

O ecossistema ruminal é composto por microbiota densa e geneticamente complexa, representada por diversas espécies de bactérias, protozoários, fungos, Archaea e vírus (Miron *et al.*, 2001).

As bactérias representam o grupo de micro-organismos mais abundante e diverso no ecossistema ruminal, tanto em termos de número de espécies quanto em capacidade metabólica (Krause e Russell, 1996). Segundo Wu e colaboradores (2012) a microbiota ruminal compreende 8 filos, 11 classes, 15 famílias e 17 gêneros de bactérias. A enumeração de bactérias do rúmen indicou populações maiores do que 10^{10} UFC/mL de conteúdo ruminal, sendo que a maioria das espécies são anaeróbias estritas (Hungate *et al.*, 1964; Kamra, 2005; Deng *et al.*, 2008).

As bactérias ruminais podem ser classificadas de acordo com o tipo de substrato utilizado na fermentação. As espécies fermentadoras de carboidratos estruturais hidrolisam a celulose ou hemicelulose por meio de complexos enzimáticos (celulases e hemicelulases) e produzem principalmente, acetato, propionato, butirato, succinato, formato, CO₂ e H₂ (Krause *et al.*, 2003). Algumas espécies deste grupo são frequentemente isoladas do ambiente ruminal incluindo *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, *Clostridium cellobioparum* e *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kamra, 2005). De acordo com Wu e colaboradores (2012), o aumento da concentração de fibra na dieta aumenta a proporção deste grupo de micro-organismos no rúmen.

Outro grupo importante de bactérias do ecossistema ruminal são as espécies que realizam a fermentação dos carboidratos não estruturais. Neste grupo se destacam as espécies fermentadoras de amido pertencentes ao gênero *Bacteroides* e linhagens de *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium*, as quais fermentam amido e outros carboidratos solúveis. Dentre os principais fermentadores de pectina se destacam a *Lachnospira multiparus* e *Streptococcus bovis*, além de algumas espécies celulolíticas (Hamlin e Hungate, 1956; Lantham *et al.*, 1979; Kamra, 2005).

A degradação de proteínas envolve espécies de bactérias que utilizam esse substrato como principal ou exclusiva fonte energética. As espécies proteolíticas do gênero *Prevotella* e *Bacteroides* produzem succinato, acetato, formato e propionato (Allison, 1978; Teixeira, 1991; Wallace *et al.*, 1999). As bactérias gram-positivas *Peptostreptococcus anaerobius* C, *Clostridium sticklandii* SR e *Clostridium aminophilum* F não utilizam carboidratos como fonte de energia e são fermentadoras obrigatórias de aminoácidos, sendo encontradas em pequeno número no rúmen. Além disso, apresentam alta atividade específica de desaminação de aminoácidos (Russell, *et al.*, 1988; Chen e Russell, 1989).

Existem ainda outros grupos bacterianos, incluindo espécies lipolíticas e anaeróbias facultativas que exercem papel fundamental no balanço da fermentação ruminal (Kamra, 2005). Além disso, as arqueas metanogênicas, representadas principalmente por *Methanobrevibacter ruminantium*, são organismos capazes de produzir metano e atuam na remoção contínua de moléculas de H₂ gerados durante o catabolismo dos substratos (Miller *et al.*, 1986; Berchielli *et al.*, 2006).

Os protozoários representam de 40 % a 60 % da biomassa microbiana do rúmen e estão relacionados com a degradação de amido e carboidratos estruturais, bem como manutenção do pH ruminal (efeito tamponante) (Santra *et al.*, 1995). Os protozoários da classe Ciliata são os mais representativos no rúmen, sendo que as espécies dos gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Buetschlia* e *Charonina* são amplamente distribuídas (Shimizu *et al.*, 1983; Kamra, 2005).

Os fungos anaeróbios encontrados no rúmen exercem importantes funções na degradação da fibra da dieta dos animais ruminantes (Paul *et al.*, 2003). As espécies *Neocallimastix frontalis*, *Shaeromonas communis* e *Piromonas communis* degradam carboidratos estruturais e são capazes de degradar tecidos vasculares lignificados por meio da produção de enzimas hidrolíticas no rúmen (Akin e Rigsby, 1987). Existem evidências de que os fungos participam ativamente na separação das fibras, a partir da formação de rizóides durante o processo de colonização das forragens (Theodorou *et al.*, 1996).

Os bacteriófagos estão presentes em grande número no ecossistema ruminal e infectam grupos bacterianos específicos. A lise bacteriana, consequência da infecção por bacteriófagos, representa um fator importante no *turnover* de massa microbiana no rúmen (Klieve e Swain, 1993). Além disso, a especificidade dos bacteriófagos pode ser explorada para a redução de bactérias indesejáveis no ecossistema ruminal, como *Streptococcus bovis* e arqueas metanogênicas (Swain *et al.*, 1996; Klieve *et al.*, 1999).

A composição da microbiota ruminal é influenciada pela dieta, pelo potencial genético do hospedeiro, e por fatores geográficos e ambientais. Entretanto, do ponto de vista funcional, o ecossistema ruminal é considerado estável, já que os microorganismos atuam de forma integrada e balanceada para o desempenho de suas funções durante a bioconversão dos componentes da dieta do animal (Kamra, 2005; Wu *et al.*, 2012).

A fermentação ruminal está relacionada com o desenvolvimento do rúmen e com a eficiência alimentar, influenciando diretamente a produtividade dos animais. A compreensão da dinâmica e potencialidades funcionais da comunidade microbiana do rúmen de bezerros representa um passo importante para a formulação das estratégias de aleitamento e desmame dos animais (Li *et al.*, 2012). Além disso, são importantes para identificação de oportunidades de manipulação do ecossistema

ruminal de bovinos jovens e desenvolvimento de novas tecnologias de gestão da pecuária leiteira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelsamei, A. H.; Fox, D. G.; Tedeschi, L. O.; Thonney, M. L.; Ketchen, D. J.; Stouffer, J. R. The effect of milk intake on forage intake and growth of nursing calves. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 940–947, 2005.

Akin, D. E.; Rigsby, L. L. Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1987–1995, 1987.

Allen, M. S.; Bradford, B. J.; Harvatine, K. J. The cow as a model to study food intake regulation. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, p. 523–547, 2005.

Allison, M. J., Production of branched chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, p. 872–877, 1978.

Anderson, K. L.; Nagaraja, T. G.; Morrill, J. L. Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1000–1005, 1987.

Baker, R. D.; Le Du Y. L. P.; Barker, J. M. Milk-fed calves: The effect of milk intake upon the herbage intake and performance of grazing calves. **Journal of Agricultural Science**, v. 87, p. 187–196, 1976.

Baldwin, R. L. The proliferative actions of insulin, insulin like growth factor-I, epidermal growth factor, butyrate and propionate on ruminal epithelial cells *in vitro*. **Small Ruminant Research**, v. 32, p. 261–268, 1999.

Baldwin, R. L.; McLeod, K. R.; Klotz, J. L.; Heitmann, R. N. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and post-weaning ruminant. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 55–65, 2004.

Banks, W. **Histologia Veterinária Aplicada**. São Paulo: Editora Manole, 1991. 629p.

Bannink, A.; France, J.; Lopez, S.; Gerrits, W. J. J.; Kebreab, E.; Tamminga, S.; Dijkstra, J. Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. **Animal Feed Science & Technology**, v. 143, p. 3–26, 2008.

Barnes, R. J.; Comline, R. S.; Dobson, A. Changes in the blood flow to the digestive organs of sheep induced by feeding. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 68, p. 77–88, 1983.

Beharka, A. A.; Nagaraja, T. G.; Morrill, J. L. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1946–1955, 1998.

Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.

Bergman, E. N. Energy contributions of volatile fatty acid from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, v. 70, p. 567–590, 1990.

Blum, J. W.; Hammon, H. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. **Livestock Production Science**, v. 66, p.151–159, 2000.

Bryant, M. P.; Small, N.; Bouma, C., Robinson, I. Studies on the Composition of the Ruminal Flora and Fauna of Young Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 41, p. 1747–1767, 1958.

Bugaut, M. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 439–472, 1987.

Chen, G.; Russell, J. B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p.1052–1057, 1989.

Church, D. C. **Digestive physiology and nutrition of ruminants**. Covallis: Prentice-Hall, 1983. 316p.

Church, D. C. **The ruminant: animal digestive physiology and nutrition**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1988. 564p.

Coelho, S. G. **Ganho de peso e desenvolvimento do estômago de bezerros desaleitados aos trinta dias de idade e alimentados com concentrado e com ou sem feno**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 123p., 1999.

Coelho, S. G. **Desafios na criação e saúde de bezerros**. In: VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009, Belo Horizonte - MG. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira, 2009.

Coverdale, J. A.; Tyler, H. D.; Quigley, J. D.; Brumm, J. A. Effect of various levels of forage and form of diet on rumen development and growth in calves. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2554–2562, 2004.

Cozzi, G.; Gottardo, F.; Mattiello, S.; Canali, E.; Scanziani, E.; Verga, M.; Andrighetto, I. The provision of solid feeds to veal calves: I. Growth performance, forestomach development, and carcass and meat quality. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 357– 366, 2002.

Curtis, T. P.; Sloan, W. T. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, 221–226, 2004.

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

Deng, W.; Xi, D.; Mao, H.; Wanapat, M. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. **Molecular Biology Reports**, v. 35, p.265–274, 2008.

Diaz, M. C.; Van Amburgh, M. E.; Smith, J. M. Composition of growth of Holstein calves fed milk replacer from birth to 105 kilogram body weight. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 830–842, 2001.

Dijkstra, J. Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. **Livestock Production Science**, v. 39, p. 61–69, 1994.

Dobson, J.; Brown, W. C. B.; Dobson, A.; Phillipson, A. T. A. Histological study of the organization of the rumen epithelium of sheep. **Journal of Physiology**, v. 41, p. 247–253. 1956.

Drackley, J. K. Early growth effects on subsequent health and performance of dairy heifers. In: Garnsworthy, P.C. **Calf and heifer rearing: principles of rearing the modern dairy heifer from calf to calving.** Nottingham: Nottingham University Press, 2005. p. 213–235.

Drackley, J. K. Calf nutrition from birth to breeding. **Veterinary Clinics Food Animal**, v. 24, p. 55–86, 2008.

Edwards, J. E.; Huws, S. A.; Kim, E. J. M.; Lee, R. F.; Kingston-Smith, A. H.; Scollan, N. D. Advances in microbial ecosystem concepts and their consequences for ruminant agriculture. **Animal**, v. 5, p. 653–660, 2008.

FAO – 2012. **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Disponível em <www.fao.org.br/FAOpwipsa.asp> Acesso em: 15/12/2013.

Feel, B. F. Observations on the development of ruminal lesions in calves fed on barley. **Research in Veterinary Science**, v. 9, p.458–466, 1968.

Fonty, G.; Gouet, P.; Jouany, J. P.; Senaud, J. Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 1835–1843, 1987.

Galfi, P.; Gabel, Martens, G. H. Influences of extracellular matrix components on the growth and differentiation of ruminal epithelial cells in primary culture. **Research in Veterinary Science**, v. 54, p. 102–109, 1993.

Gorka, P.; Kowalski, Z. M.; Pietrzak, P.; Kotunia, A.; Kiljanczyk, R.; Flaga, J.; Holst, J.; Guilloteau, P.; Zabielski, R. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 47–53, 2009.

Graham, C.; Gatherar, I.; Haslam, I.; Glanville, M.; Simmons, N. L. Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, p. 997–1007, 2007.

Greenwood, R. H.; Morrill, J. L.; Titgemeyer, E. C. Using dry feed intake as a percentage of initial body weight as a weaning criterion. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2542–2546, 1997.

Hamada, T. Effects of 1,2 propanediol on the rumen mucosal growth of kids. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 1352–1359, 1975.

Hamlin, L. J.; Hungate, R. E., Culture and physiology of a starch digesting bacterium (*Bacteroides amylophilus*, nov. sp.) from the bovine rumen. **Journal of Bacteriology**, v. 46, p. 548–554, 1956.

Heinrichs, A. J.; Wells, S. J.; Losinger, W. C. A study of the use of Milk replacers for dairy calves in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2831–2837, 1995.

Hinders, R. G.; Owen, F. G. Relation of ruminal parakeratosis development to volatile fatty acid absorption. **Journal of Dairy Science**, v. 48, p. 1069–1074, 1965.

Hobson, P. N.; Stewart, C.S. **The rumen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 719p.

Huber, J. T. Development of the digestive and metabolic apparatus of the calf. **Journal of Dairy Science**, v. 52, p. 1303–1315, 1969.

Hungate, R. E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press, 1966. 533p.

Huntington, G. B. Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: influence of physiological state and nutrition. **Reproduction Nutrition Development**. v. 30, p.35–47, 1990.

IBGE – 2010. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em < http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2002&id_pagina=1 > Acesso em: 15/12/2013.

IBGE – 2013. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em < http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2107&id_pagina=1 > Acesso em: 15/12/2013.

Jami, E.; Israel, A.; Kotser, A.; Mizrahi, I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **The ISME journal**, v. 6, p. 1069–1079, 2013.

Jasper, J.; Weary, D. M. Effects of ad libitum intake on dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.3054–3058, 2002

Kamra, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, p.124–135, 2005.

Khan, M. A.; Lee, H. J.; Lee, W. S.; Kim, H. S.; Ki, K. S.; Hur, T. Y.; Suh, G. H.; Kang, S. J.; Choi, Y. J. Structural growth, rumen development, and metabolic and immune responses of holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.3376–3387, 2007.

Khan, M. A.; Weary, D. M.; Von Keyserlingk, M. A. G. Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3547–3553, 2011.

Kirat, D.; Masuoka, J.; Hayashi, H.; Iwano, H.; Yokota, H.; Taniyama, H.; Kato, S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. **The Journal of Physiology**, v. 576, p. 635–647, 2006.

Klieve, A. V.; Swain, R. A. Estimating ruminal bacteriophage numbers using pulsed field gel electrophoresis and laser densitometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2299–2303, 1993.

Klieve, A. V.; Heck, G. L.; Prance, M. A.; Shu, Q. Genetic homogeneity and phage susceptibility of ruminal strains of *Streptococcus bovis* isolated in Australia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 108–112, 1999.

Krause, D. O.; Denman, S. E.; Mackie, R. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 663–693, 2003.

Krause, D. O.; Russell, J. B. How many ruminal bacteria are there? **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1467–1475, 1996.

Krause, M. K.; Oetzel, G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, p. 215–236, 2006.

Kristensen, N. B.; Sehested, J.; Jensen, S. K.; Vestergaard, M. Effects of milk allowance on concentrate intake, ruminal environment, and ruminal development in milk-fed Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4346–4355, 2007.

Latham, M. J.; Sharpe, E.; Weiss, N. Anaerobic cocci from the bovine alimentary tract, the amino acids of their cell wall peptidoglycans and those of various species of anaerobic *Streptococcus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 47, p. 209–221, 1979.

Lavker, R.; Chalupa, W.; Dickey, J. F. An electron microscopic investigation of rumen mucosa. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 28, p. 1–15, 1969.

Lesmeister, K. E.; Heinrichs, A. J. Effects of corn processing on growth characteristics, rumen development, and rumen parameters in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3439–3450, 2004.

Li, R.W.; Connor, E. E.; Li, C.; Baldwin, V. R. L.; Sparks, M. E. Characterization of the rumen microbiota of preruminant calves using metagenomic tools. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 129–139, 2012.

López, S.; Hovell, F. D.; Dijkstra, J.; France, J. Effects of volatile fatty acid supply on their absorption and on water kinetics in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2609–2616, 2003.

Miller, T. L.; Wolin, M. J.; Zhao, H.; Bryant, M. P. Characteristics of methanogens isolated from bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 201–202, 1986.

Minato, H.; Otsuka, M.; Shirasaka, S.; Itabashi H.; Mitsumori, M. Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 38, p. 447–456, 1992.

Miron, J.; Ben-Ghedalia, D.; Morrison, M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p.1294–1309, 2001.

Neogrady, S.; Galfi, P.; Kutas, F.; Sakata, T. The effects of butyrate and glucagon on the proliferation of ruminal epithelial cell in culture. **Veterinary Research Communications**, v. 13, p. 27–29, 1989.

Nozière, P.; Martin, C. M.; Remond, D.; Kristensen, N. B.; Bernard, R.; Doreau, M. Effect of composition of ruminally infused short-chain fatty acids on net fluxes of nutrients across portal-drained viscera in underfed ewes. **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 521– 531. 2000.

Paul, S. S.; Kamra, D. N.; Sastry, V. R. B.; Sahu, N. P.; Kumar, A. Effect of phenolic monomers on growth and hydrolytic enzyme activities of an anaerobic fungus isolated from wild nilgai (*Boselaphus tragocamelus*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 377–381, 2003.

Penner, G. B.; Oba, M. Increasing dietary sugar concentration may improve dry matter intake, ruminal fermentation, and productivity of dairy cows in the postpartum phase of the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3341–3353, 2009.

Pitta, D. W.; Pinchak, W. E.; Dowd, S. E.; Osterstock, J.; Gontcharova, V.; Youn, E.; Dorton, K.; Yoon, I. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from Bermuda grass hay to grazed winter wheat diets. **Microbiology Ecology**, v. 59, p. 511–522, 2010.

Quigley, J. D. Influence of weaning method on growth intake and selected blood metabolites in Jersey calves. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 2255–2260, 1996.

Rey, M.; Enjalbert, F.; Monteils, V. Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1500–1512, 2012.

Rey, M.; Enjalbert, F.; Combes, S.; Cauquil, L.; Bouchez, O.; Monteils, V. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 245–257, 2013.

Rodrigues, R. R.; Lucci, C. S.; Rodrigues, P. H. M. Alimentação de bezerros ruminantes com dieta sólida ou líquida, via goteira esofageana: formação da goteira e escape ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 2364–2372, 2002.

Russell, J. B. Rumen fermentation. In: Lederberg, J.; Alexander, M.; Bloom, B. R. **Encyclopedia of Microbiology**. Waltham: Academic Press, 2000. p. 185-194.

Russell, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca: James B. Russell, 2002. p.121.

Russell, J. B.; Strobel, H. J.; Chen, G. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 872–877, 1988.

Sakata, T.; Hikosaka, K.; Shiomura, Y.; Tamate, H. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 44, p. 325–331, 1980.

Sakata, T.; Tamate, H. Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. **Journal of Dairy Science**. v. 61, p. 1109–1113, 1978.

Sander, E. G.; Warner, R. G.; Harrison, H. N.; Loosli, J. K. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosae in the young calf. **Journal of Dairy Science**, v. 42, p. 1600–1605, 1959.

Santra, A.; Kamra, D. N.; Pathak, N. N. Influence of ciliate protozoa on biochemical changes and hydrolytic enzymes in the rumen of buffalo (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Journal**, v. 12, p. 95–100, 1995.

Silva, J. T. S. **Desempenho e desenvolvimento ruminal de bezerros em sistema de desaleitamento precoce recebendo aditivos alternativos aos antibióticos**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 86p., 2010.

Shimizu, M.; Kinoshita, M.; Fujita, J.; Imai, S. Rumen ciliate protozoal fauna and composition of the Zebu cattle, *Bos indicus* and water buffalo, *Bubalus bubalis* in Philippines. **The Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College**, v. 32, p. 83–88, 1983.

Stevenson, D. M.; Weimer, P. J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p.165–174, 2007.

Swain, R. A., Nolan, J. V. and Klieve, A. V., Natural variability and diurnal fluctuations within the bacteriophage population of the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 994–997, 1996.

Sweeney, B. C.; Rushen, J. P.; Weary, D. M.; Passillé, A. M. B. Duration of weaning, starter intake, and weight gain of dairy calves fed large amounts of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 148–152, 2010.

Tamate, H.; Mcgilliard, A. D.; Jacobson, N. L.; Getty, R. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p.408–420, 1962.

Theodorou, M. K.; Mennim, G.; Davies, D.; Zhu, W-Y.; Trinci, A. P. J.; Brokman, J, L. Anaerobic fungi in the digestive tract of mammalian herbivores and their potential for exploitation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, p. 913–926, 1996.

Teixeira, J. C. **Nutrição de Ruminantes**, Lavras: ESAL/FAEPE, 1991. 267p.

Van Soest, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

Wallece, R. J.; Atasoglu, C.; Newbold, C. J. Role of peptides in rumen microbial metabolism – Review. **American journal of Applied Sciences**, v. 12, p. 139–147, 1999.

Warner, R. G.; Flatt, W. P.; Loosli, J. K. Ruminant nutrition, dietary factors influencing development of ruminant stomach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, p. 788–792, 1956.

Wattiaux, M. A. Observações gerais sobre algumas práticas de manejo. In: Wattiaux, M. A. **Essencias em gado de leite**. Madison:Instituto Babcock, 1997, p. 105-108.

Weigand, E.; Young, J.; W; Mcgilliard, A. D. Volatile fatty acid metabolism by rumen mucous from cattle fed hay or grain. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p.1294–1300, 1975.

Wu, S.; Baldwin, R.L.; Li, W.; Li, C.; Connor, E. E.; Li, R.W. The bacterial community composition of the bovine rumen detected using pyrosequencing of 16S rRNA genes. **Metagenomics**, v. 1, p. 1–11, 2012.

Wise, G. H., and G. W. Anderson. Factors affecting the passage of liquids into the rumen of the dairy calf. I. Method of administering liquids: Drinking from open pail versus sucking through a rubber nipple. **Journal of Dairy Science**, v. 22, p. 697–705, 1939.

Zhao, G.Y.; Sun, Y. B. Effects of volatile fatty acids on IGF-I, IGFBP-3, GH, insulin and glucagon in plasma, and IGF-I and IGFBP-3 in different tissues of growing sheep nourished by total intragastric infusions. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, p. 366–371, 2010.

CAPÍTULO 2

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICOS DO RÚMEN DE BEZERROS HOLANDESES MISTIÇOS PRÉ E PÓS-DESMAME

2.1 INTRODUÇÃO

Do nascimento até três semanas de idade, os bezerrros são descritos como pré – ruminantes, uma vez que o rúmen não é considerado anatomicamente e fisiologicamente maduro (Warner, 1956; Bryant *et al.*, 1958; Tamate *et al.*, 1962). Neste período, reflexos estimulados pelo ato de sucção do leite induzem a contração de uma dobra tecidual da base do esôfago ao orifício retículo-omasal formando um tubo, denominado goteira esofágica, que desvia o alimento do rúmen-retículo (Rodrigues *et al.*, 2002). Desta forma, a maior parte do alimento ingerido, flui diretamente para o omaso e abomaso, no qual ocorre o processo de digestão e absorção dos nutrientes provenientes, basicamente, de fontes lácteas (Huber, 1969; Church, 1988).

O estabelecimento das atividades digestivas no rúmen depende da colonização de micro-organismos, os quais utilizam os componentes da dieta como substrato para fermentação (Li *et al.*, 2012). O rúmen dos bezerrros recém-nascidos é colonizado por bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, sendo que o leite representa o primeiro substrato para a fermentação ruminal. A introdução de alimentos sólidos na dieta dos bezerrros proporciona substratos e condições para o estabelecimento dos micro-organismos anaeróbios, que compõe a microbiota e são responsáveis pela fermentação dos componentes da dieta nos animais adultos (Fonty *et al.*, 1987; Minato *et al.*, 1992, Li *et al.*, 2012; Jami *et al.*, 2013; Reyet *al.*, 2013). Os principais produtos da fermentação microbiana no rúmen são os ácidos orgânicos voláteis, cuja absorção representa a maior fonte de energia para os animais ruminantes (Allen *et al.*, 2005).

O rúmen dos bezerrros recém-nascidos representa 29 % do volume total dos compartimentos do estômago, enquanto nos animais adultos essa proporção aumenta consideravelmente, aproximadamente 55 % (Li *et al.*, 2012). Além do aumento do

volume, o desenvolvimento anatômico do rúmen envolve o fortalecimento da musculatura e o crescimento das papilas, os quais são estimulados pelo atrito dos alimentos sólidos sobre a parede do rúmen nos primeiros meses de vida (Feel *et al.*, 1968; Anderson *et al.*, 1987; Baldwin *et al.*, 2004; Kristensen *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2011). Adicionalmente, estudos relatam que a absorção de ácidos orgânicos voláteis (AOVs), principalmente propionato e butirato, estimulam a proliferação das células epiteliais e o crescimento das papilas ruminais (Sander *et al.*, 1959; Tamate *et al.*, 1962; Lesmeister e Heinrichs, 2004).

O maior consumo de leite durante a fase de aleitamento pode aumentar o ganho de peso dos bezerros haja vista a maior digestibilidade e aproveitamento dos nutrientes deste alimento pelos animais (Appleby *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2001; Jasper e Weary, 2002). No entanto, a oferta de maiores volumes de leite ou fornecimento *ad libitum* restringe o consumo de alimentos sólidos e, conseqüentemente, compromete o desenvolvimento ruminal dos animais (Drackley, 2008; Khan *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2011).

Assim, neste trabalho avaliou-se a hipótese de que a oferta de diferentes quantidades de leite durante a fase de aleitamento influencia o consumo de concentrado e o desenvolvimento ruminal de bezerros holandeses mestiços. Para isso, avaliou-se o ganho de peso, consumo de matéria seca, parâmetros bioquímicos e histológicos do rúmen de quinze bezerros holandeses mestiços, alimentados com diferentes níveis de leite e concentrado *ad libitum* durante a fase de aleitamento, ao desmame e 30 dias após desmame.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia, no Departamento de Zootecnia e no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa.

2.2.1 Manejo dos animais e coleta das amostras

Dezessete bezerros machos da raça Holandesa (mestiços) com peso médio inicial de $34,19 \pm 5,26$ kg foram adquiridos de rebanhos leiteiros de fazendas da região de Viçosa. Imediatamente após o nascimento, foi realizado o corte e a desinfecção do umbigo dos animais com solução de iodo a 5%, bem como o fornecimento de colostro na quantidade de dois litros pela manhã e dois litros pela tarde, até o terceiro dia de idade. Os bezerros foram mantidos na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite (UEPE-GL), do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, onde foram pesados, identificados e alojados em baias individuais, providas de cochos para leite ou feno, concentrado e água.

Dois animais foram aleatoriamente abatidos ao terceiro dia de vida e os demais foram distribuídos em quatro dietas, com fornecimento de diferentes volumes de leite (2, 4, 6 e 8 litros por dia) (Tabela 1).

Tabela 1 – Esquema de alimentação dos animais utilizados nos experimentos. Os animais foram alimentados com ração concentrada e as quantidades de leite indicadas até o desmame, quando passaram a receber feno *Coast cross* (*Cynodon dactylon*) *ad libitum* na dieta.

Número de animais	Dieta pré - desmame	Dieta pós - desmame
3	2 L de leite + concentrado	Feno + concentrado
4	4 L de leite + concentrado	Feno + concentrado
5	6 L de leite + concentrado	Feno + concentrado
3	8 L de leite + concentrado	Feno + concentrado

Dois animais de cada dieta foram desmamados (em média 53 dias de idade) e passaram a receber *ad libitum* feno *Coast cross* (*Cynodon dactylon*) (Tabela 2),

sendo abatidos após 30 dias, enquanto o restante dos animais foi abatido logo após o desmame. Tanto no período pré-desmame quanto no pós-desmame a ração concentrada (Tabelas 2 e 3), formulada segundo as recomendações do *National Research Council* (NRC, 2001) foi oferecida *ad libitum* aos animais.

Tabela 2 – Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) e carboidratos totais (CHO_{Total}) do concentrado fornecido aos bezerros.

Alimento	MS(%) ¹	PB ¹	EE ¹	FDN ¹ FDNcp ¹ CHO _{Total} ¹		
				(%MS)		
Feno	87,63	12,45	1,18	-	66,68	75,31
Concentrado	86,16	19,25	1,51	13,32	-	78,1

Tabela 3 – Composição de ingredientes (% matéria natural) do concentrado fornecido aos bezerros.

Ingredientes	%
Farelo de Soja	32,55
Fubá de Milho	62,76
Farelo de Trigo	3,100
Fosfato Bicálcico	0,270
Calcário	1,001
Sal comum	0,211
Mistura Vitamínica	0,090
Mistura Mineral ¹	0,018
Total	100,00

¹Conteúdo/Kg: Sulfato de Zinco – 180 g; Sulfato de Cobre – 150 g; Sulfato de Cobalto – 10 g; Selenito de Sódio – 10 g e Iodato de Potássio – 10 g.

Os animais receberam leite em mamadeiras durante os primeiros dias de vida, sendo estimulados para o posterior fornecimento de leite em baldes de plástico, devidamente higienizados. A água foi fornecida em baldes plásticos individuais, sendo retirada durante o aleitamento e recolocada duas horas depois, para evitar a diluição dos nutrientes e aumento da taxa de passagem, que poderiam provocar diarreia. O concentrado e o feno foram ofertados em cochos separados sempre pela

manhã. O consumo diário dos animais foi registrado a partir da coleta das sobras dos alimentos nos cochos.

Todos os procedimentos de manejo dos animais foram conduzidos conforme os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a legislação vigente, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (processo nº 10/2012). O abate foi realizado via concussão cerebral e secção da jugular para sangramento total do animal. O rúmen foi separado das vísceras e seu conteúdo, fração líquida, foi coletado e armazenado a -20 °C. Além disso, esse compartimento foi lavado com soro fisiológico e pesado. Fragmentos do tecido, aproximadamente três cm² das porções ventral e dorsal, foram coletados e fixadas por 24 horas em solução de Bouin (Lillie e Fullmer, 1968). Após o período de fixação as amostras do tecido foram mantidas em álcool 70 % até serem processadas e utilizadas para as análises morfológicas e histológicas.

2.2.2 Análise de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos voláteis (AOVs) do líquido ruminal dos animais submetidos aos diferentes tratamentos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras foram centrifugadas (12.000 x g, 10 min) para remoção das células e o sobrenadante foi tratado conforme descrito por Siegfried e colaboradores (1984). As amostras foram analisadas utilizando cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a um detector de índice de refração (IR) Shodex RI-101 mantido a 40 °C, e coluna de troca iônica Phenomenex Rezex ROA, 300 x 7,8 mm mantida a 40 °C. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM com fluxo de 0,7 mL/min.

Os ácidos orgânicos utilizados para calibração da curva padrão foram: ácido isovalérico, com concentração inicial de 5 mM; ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, com concentrações iniciais de 40 mM; ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido valérico e ácido isovalérico, com concentrações iniciais de 10 mM.

2.2.3 Análise de amônia e proteína microbiana

A concentração de amônia na digesta ruminal foi determinada pelo método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962). A absorvância foi medida a 630 nm em espectrofotômetro (1510, Thermo Fisher Scientific, Finlândia) e foi utilizado cloreto de amônio (NH₄Cl) como padrão.

A proteína microbiana das amostras coletadas do rúmen de bezerros foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976). A absorvância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro (1510, Thermo Fisher Scientific, Finlândia) e foi utilizada lisozima como padrão.

2.2.4 Análise morfométrica e histológica do rúmen

As amostras de tecido ruminal, ventral e dorsal, foram desidratadas e incluídas em resina (Historesin®, Leica) para as análises microscópicas. Secções longitudinais com 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM2155, Leica, Alemanha) utilizando-se navalhas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina e borato de sódio (1%) (Bancroft e Stevens, 1996) e imagens digitais foram capturadas utilizando o microscópio de luz (Olympus AX 60) acoplado à câmera digital (Q-Color 3, Olympus). A partir das imagens capturadas com a objetiva de 4X de secções histológicas diferentes foi mensurada a altura dos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular.

A densidade de papilas (papilas/cm²), altura e largura das papilas presentes no tecido ruminal, ventral e dorsal, foi mensurado a partir da visualização e obtenção de imagens digitais dos fragmentos utilizando a lupa binocular (Stemi2000C, Zeiss, Alemanha) acoplada à câmera digital (Axio CamERc5s, Zeiss, Alemanha). A largura das papilas foi calculada a partir da largura média das regiões apical, média e basal. Enquanto a altura foi obtida a partir de uma linha reta traçada do ápice até a base da papila.

Para todas as análises morfométricas foi utilizado o programa de análise *Image Pro Plus 4.0* para Windows (Media Cybernetics, USA).

2.2.5 Análise estatística

Os dados obtidos de consumo diário de massa seca total, concentração e proporção de AOVs do rúmen, bem como concentração ruminal de amônia para as diferentes idades e dietas avaliadas foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

A espessura dos tecidos epitelial e conjuntivo do rúmen, densidade e altura das papilas ruminais foram submetidas às mesmas análises, entretanto foi utilizado o nível de 10 % de probabilidade. O menor rigor utilizado é justificado pela diferença observada entre os dados morfométricos e histológicos dos animais avaliados.

A correlação entre os parâmetros foi avaliada utilizando o *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, USA).

2.3 RESULTADOS

O ganho médio diário de peso (GMD) e o consumo diário de massa seca total (CMSt) apresentaram alta correlação linear (coeficiente de correlação, r , maior ou igual a 0,8) tanto para os animais abatidos ao desmame ($r = 0,94$), quanto para aqueles abatidos 30 dias após o desmame ($r = 0,95$) (Figura 1). Esses resultados indicam que GMD mais elevados estão associados ao maior CMSt pelos animais. Considerando os animais abatidos ao desmame, o animal com maior CMSt (1,13 Kg/d) apresentou GMD 5,2 vezes maior que o animal com menor CMSt (0,5 Kg/d). Dentre os animais que receberam feno por 30 dias após o desmame, o animal com maior CMSt (1,52 Kg/d) apresentou GMD 4,5 vezes maior que o animal com menor CMSt (0,66 Kg/L).

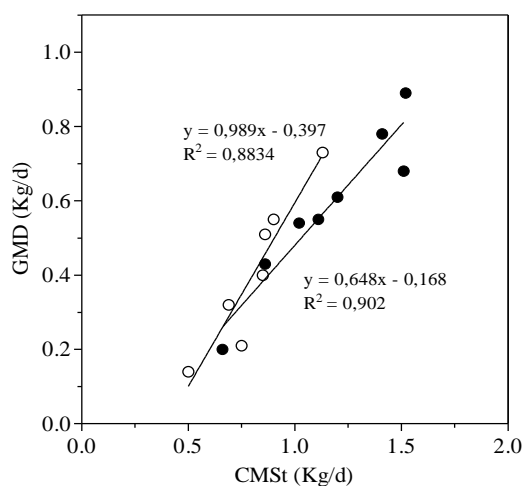


Figura 1 – Influência do consumo diário de massa seca total (CMSt) (Kg/d) sobre o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/d) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●).

O aumento do GMD esteve associado ao aumento do volume diário de leite consumido pelos animais durante a fase de aleitamento. A correlação linear entre o GMD e o volume diário de leite ofertado foi alta para os animais após a introdução de feno na dieta ($r = 0,84$) (Figura 2). Além disso, evidenciou-se que o GMD e o

volume diário de leite consumido durante a fase de aleitamento apresentaram moderada correlação ($0,5 \leq r < 0,8$) nos animais até o desmame.

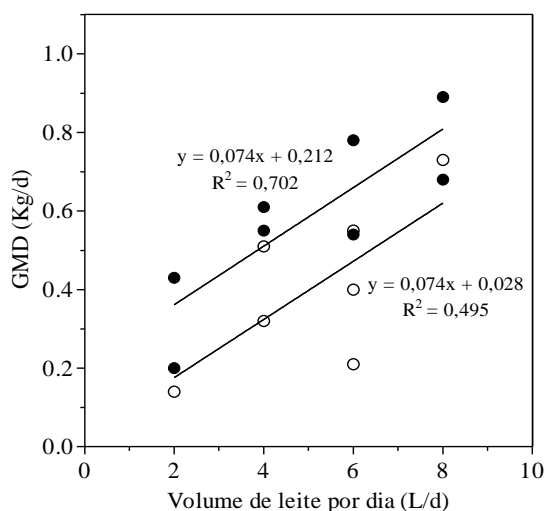


Figura 2 – Influência do consumo diário de leite (L/d) sobre o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/L) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●).

O consumo de massa seca do concentrado (CMSc) pelos animais durante a fase de aleitamento está relacionada com a oferta de leite neste período. Para os animais que foram ofertados dois e oito litros de leite por dia, o consumo de massa seca do concentrado (CMSc) foi de 0,11 e 0,08 Kg/d, respectivamente, até o desmame (Figura 3A). A média do CMSc dos animais que consumiram quatro litros de leite por dia foi de 0,27 Kg/d, enquanto a média daqueles que consumiram seis litros de leite por dia foi 0,14 Kg/d (Figura 3A). O CMSc e o volume de leite diário dos animais abatidos ao desmame apresentaram alta correlação quadrática ($r = 0,83$), sendo que o ponto máximo de CMSc (0,27 Kg/d) foi observado nos animais que consumiram quatro litros de leite por dia.

Estudos anteriores indicam que o consumo de feno após o desmame é influenciado pelo volume de leite consumido durante a fase de aleitamento. Considerando os animais abatidos 30 dias após a introdução de feno na dieta, a média do CMSt dos animais que consumiram dois litros de leite por dia antes do desmame foi duas vezes menor ($P < 0,05$) que a média dos animais que consumiram 8 litros de leite por dia (Figura 3B). Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) no

CMSt entre os animais que consumiram dois, quatro e seis litros de leite por dia, bem como entre os animais que consumiram quatro, seis e oito litro de leite (Figura 3B).

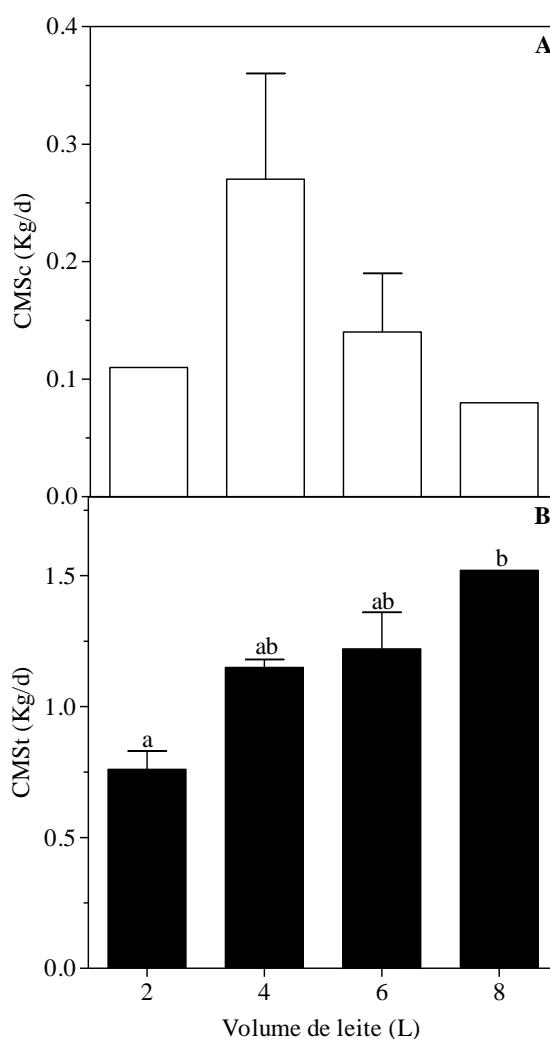


Figura 3 – Influência do consumo diário de leite (L/d) sobre o consumo diário de massa seca do concentrado (CMSc) (Kg/L) dos bezerros abatidos ao desmame (A) e o consumo diário de massa seca total (CMSt) dos bezerros abatidos 30 dias após o desmame (Kg/L) (B). Para os animais mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame foi avaliado o CMSc, enquanto para os animais mantidos em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame foi avaliado o CMSt. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra dentro da idade não diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey.

A produção de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) no rúmen é resultado dos processos fermentativos dos substratos da dieta pelos micro-organismos que compõe o ecossistema ruminal. Com o objetivo de avaliar a produção de AOVs em função da

idade dos bezerros e da dieta, bem como determinar a influência no GMD e no desenvolvimento ruminal dos animais, foram determinadas as concentração e proporções dos AOVs no rúmen dos bezerros.

As médias das proporções de propionato no rúmen não variaram ($P > 0,05$) com a idade e a dieta dos animais apesar de ter sido introduzido feno após o desmame (Figura 4A). As proporções de acetato e butirato foram diferentes ($P < 0,05$) para os animais abatidos ao terceiro dia de vida em relação aos animais abatidos ao desmame e após o desmame (Figura 4A). A média da proporção de acetato no rúmen dos animais de três dias de idade foi 1,7 vezes menor ($P < 0,05$) que nos animais no desmame e após o desmame. A proporção de butirato foi 2,6 vezes maior ($P < 0,05$) nos animais de três dias em relação aos animais no desmame e após o desmame (Figura 4A). Assim como o propionato, as proporções de acetato e butirato ao desmame e 30 dias após o desmame não variaram ($P > 0,05$) (Figura 4A). Proporção 4,5 acetato: 3 propionato: 1 butirato foram observadas no rúmen tanto dos animais ao desmame, quanto 30 dias após a inserção de feno na dieta (Figura 4A).

A concentração total de AOVs aumentou ($P < 0,05$) com idade e introdução de feno na dieta dos animais (Figura 4B). As concentrações médias de AOVs foram 29,9; 107,5 e 159,8 mmol/L para os animais com três dias de idade, ao desmame e 30 dias após a introdução de feno na dieta, respectivamente (Figura 4B).

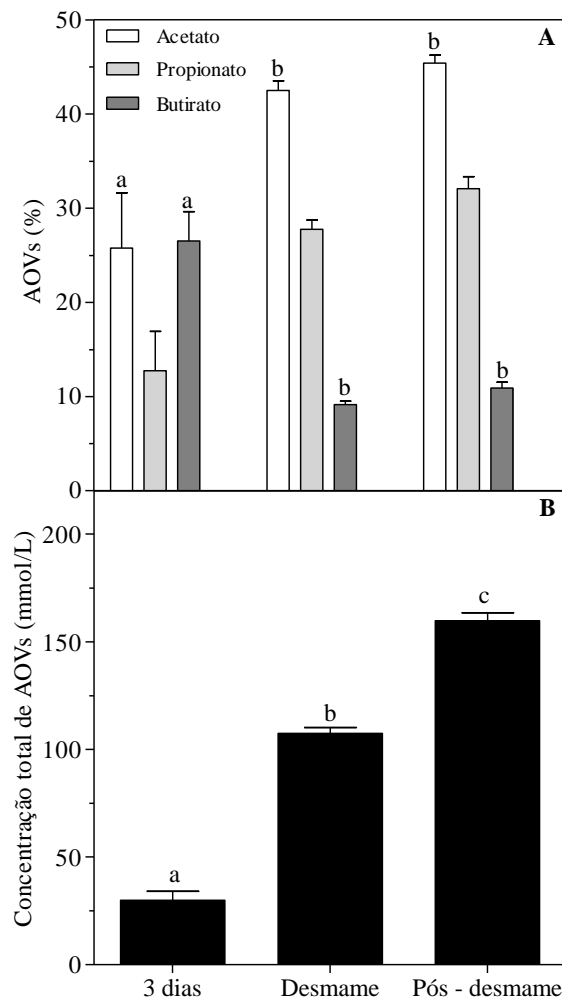


Figura 4 – Proporção de acetato, propionato, butirato (%) (A) e concentração total de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) (mmol/L) (B) no rúmen de bezerros de três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra dentro de cada AOV não diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey.

A maior parte da energia obtida pelos animais ruminantes é proveniente da absorção dos AOVs produzidos no rúmen. No presente trabalho, a concentração total de AOVs apresentou baixa influência sobre GMD dos animais. O coeficiente de correlação linear entre a concentração total de AOVs e o GMD foi -0,18 para os animais abatidos ao desmame e -0,23 para os animais abatidos 30 dias após o desmame, caracterizando baixa correlação negativa ($-0,5 < r \leq -0,1$) entre essas variáveis (Figura 5).

As regressões lineares do GMD dos animais em função das proporções de acetato ou butirato no rúmen indicaram ausência de correlação ($0 < r < 0,1$ ou $-0,1 < r < 1$) entre esses parâmetros. No entanto, a correlação entre a proporção de propionato no rúmen e o GMD dos animais abatidos ao desmame foi moderada negativa ($-0,8 < r \leq -0,5$) (Figura 6), sugerindo que maiores proporções de propionato no rúmen estão relacionados com menores GMD.

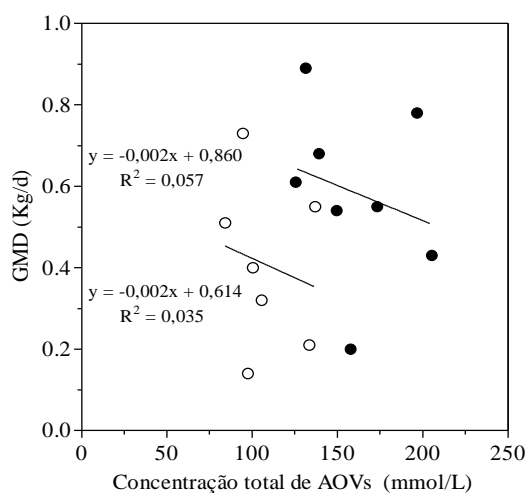


Figura 5 – Relação entre a concentração total de AOVs (mmol/L) no rúmen e o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/L) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●).

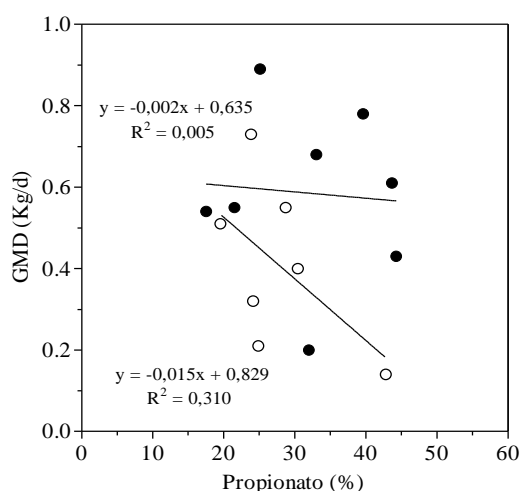


Figura 6 – Relação entre a proporção de propionato (%) no rúmen e o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/L) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●).

A concentração de amônia no rúmen está relacionada com a capacidade de desaminação de aminoácidos exibida por espécies bacterianas ruminais e varia de acordo com a disponibilidade de proteína degradável no rúmen na dieta dos animais.

A concentração média de amônia no rúmen dos animais abatidos ao desmame foi 2,5 vezes maior ($P < 0,05$) em relação às médias obtidas no rúmen de bezerros com três dias de idade e após o desmame (Figura 7). No entanto, as concentrações médias de amônia no rúmen não variaram ($P > 0,05$) entre os animais abatidos com três dias de idade, nos quais a dieta consistia apenas de leite, e aqueles abatidos 30 dias após o desmame, cuja dieta era à base de feno e concentrado (Figura 7).

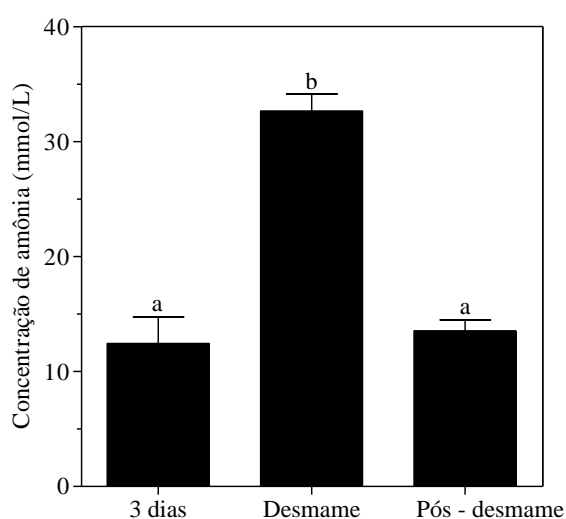


Figura 7 – Concentração de amônia (mmol/L) no rúmen de bezerros de três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey.

A concentração de amônia no rúmen dos bezerros foi influenciada pelo CMSt dos bezerros. A regressão linear da concentração de amônia no rúmen em função do CMSt dos animais indicou correlação moderada entre esses parâmetros tanto para os animais abatidos ao desmame ($r = 0,59$) quanto para aqueles abatidos 30 dias após o desmame ($r = 0,79$) (Figura 8).

A concentração de amônia no rúmen e o GMD apresentaram correlação linear moderada para os animais abatidos ao desmame ($r = 0,52$), bem como para os animais abatidos 30 dias após o desmame ($r = 0,68$) (Figura 9).

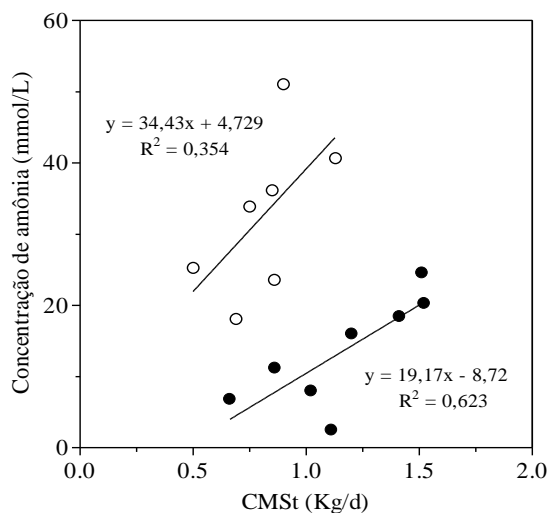


Figura 8 – Relação entre o consumo diário de massa seca total (CMSt) (Kg/L) e a concentração de amônia (mmol/L) no rúmen dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●).

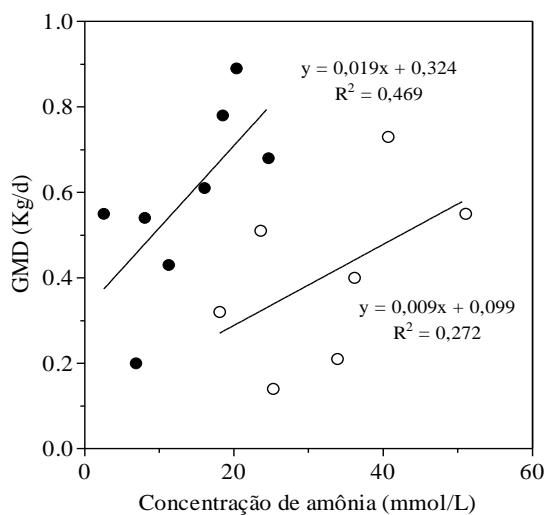


Figura 9 – Relação entre a concentração de amônia (mmol/L) e o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/L) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (○) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (●).

Com a finalidade avaliar a progressão do desenvolvimento ruminal em função da idade e a dieta e sua relação com o ganho de peso dos animais determinou-se a espessura dos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular, bem como a densidade e altura das papilas das porções ventral e dorsal do rúmen.

As espessuras dos tecidos epitelial e conjuntivo (porções ventral e dorsal) do rúmen não diferiram ($P > 0,05$) entre as três idades de abate (Figura 10).

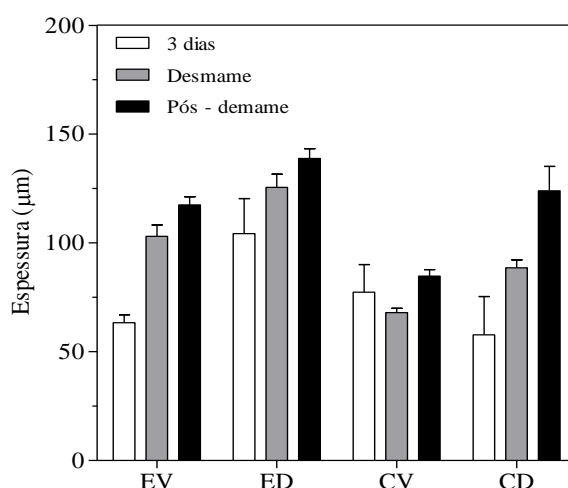


Figura 10 – Espessura do tecido epitelial ventral (EV), tecido epitelial dorsal (ED), tecido conjuntivo ventral (CV), tecido conjuntivo dorsal (CD) (μm) do rúmen de bezerros de três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame.

A densidade de papilas do rúmen reduziu ($P < 0,1$) com a idade dos animais (Figura 11A). Além disso, a densidade de papilas ventral dos animais abatidos com três dias de idade foi 2,8 vezes maior ($P < 0,1$) que os animais abatidos ao desmame e 6,3 vezes maior ($P < 0,1$) que os animais abatidos 30 dias após o desmame (Figura 11A). A redução da densidade de papilas com a idade dos animais pode ser ilustrada pela figura 12 (A, B e C). Na porção dorsal, a densidade média de papilas nos animais de três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame foi de 820, 345 e 179 papilas/ cm^2 , respectivamente (Figura 11A).

A altura das papilas na porção ventral foi maior ($P < 0,1$) em relação à porção dorsal do rúmen dos animais abatidos ao desmame e 30 dias após a introdução de feno na dieta. Apesar dessa diferença observada, a proporção do aumento ($P < 0,1$) da altura das papilas com a idade foi semelhante nas porções ventral e dorsal (Figura 11B). Animais com três dias de idade apresentaram, em média, papilas 3,5 vezes menores ($P < 0,1$) que os animais abatidos ao desmame (Figura 11B). Enquanto os

animais abatidos 30 dias após a introdução de feno na dieta, apresentaram papilas cerca de 1,5 vezes mais altas que os animais batidos ao desmame (Figura 11B).

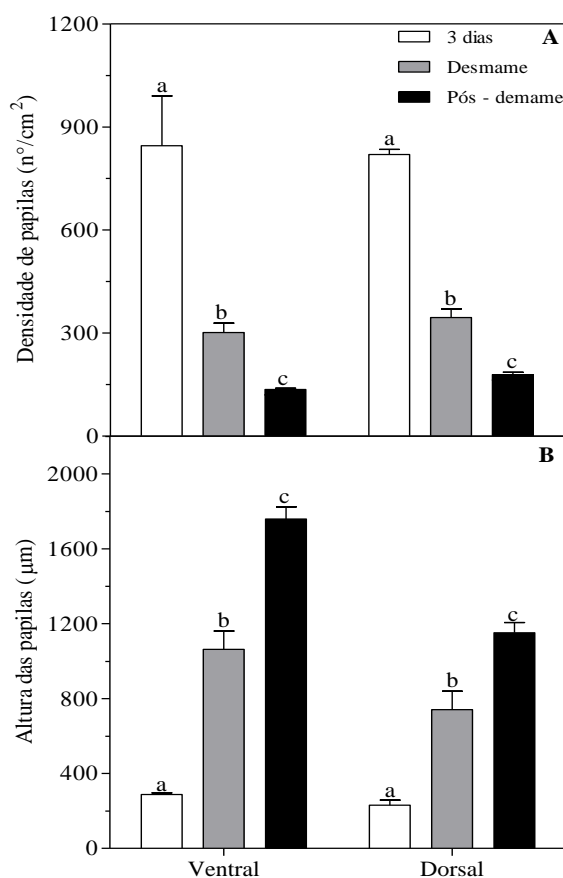


Figura 11– Densidade (n°/cm²) (A) e altura das papilas (µm) (B) das regiões ventral e dorsal do rúmen de bezerros com três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra dentro da idade (três dias, desmame ou pós – desmame) não diferem entre si ao nível de 10 % de significância pelo teste de Tukey.

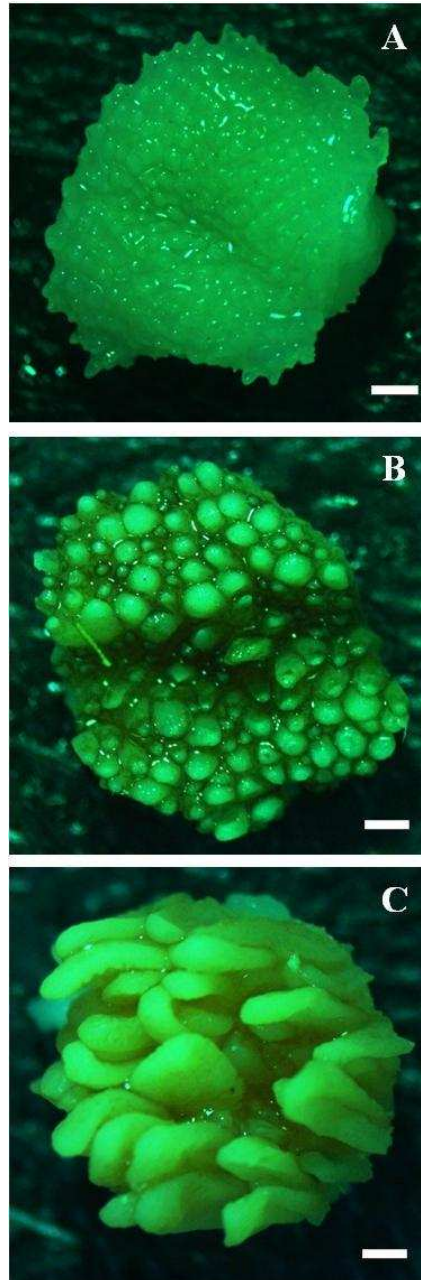


Figura 12 – Densidade de papilas na porção ventral do rúmen de animais abatidos com três dias de vida (A), ao desmame (B) e 30 dias após o desmame (C). As imagens dos fragmentos do tecido ruminal foram obtidas com câmera digital acoplada a lupa binocular. As barras brancas indicadas nas imagens correspondem a escala de 600 μm .

A altura e a densidade das papilas ruminais apresentaram alta correlação quadrática, sendo o r 0,85 para a porção ventral e 0,88 para a porção dorsal (Figura 13A e 13B). Assim, a densidade reduziu com o aumento da altura das papilas até atingir cerca de 130 papilas por cm^2 na porção ventral e 160 papilas por cm^2 na

porção dorsal. A partir desse ponto, o aumento da altura não alterou a densidade de papilas do rúmen.

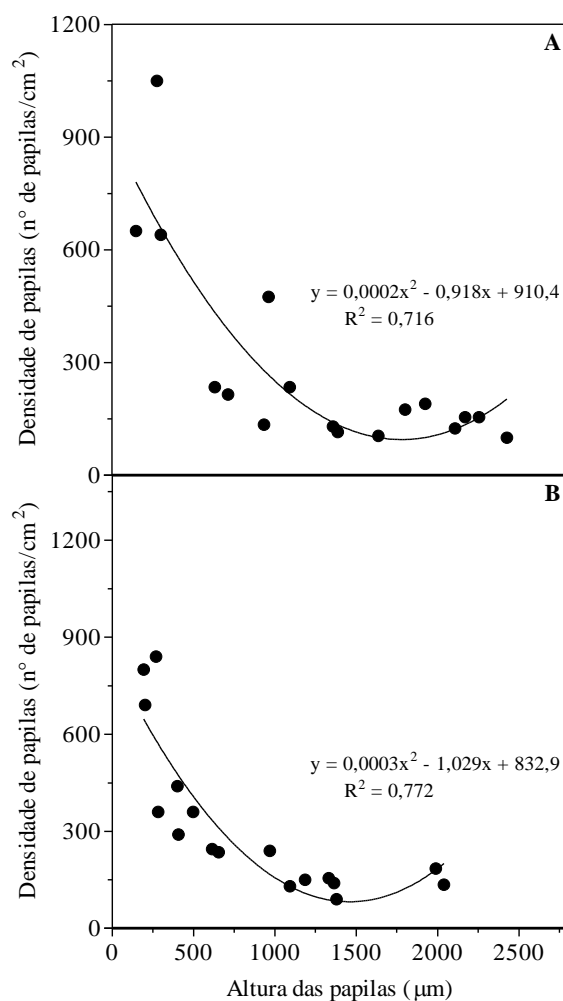


Figura 13 – Relação entre a altura das papilas (µm) e a densidade de papilas (nº/cm²) do rúmen dos bezerros. Foi avaliada a altura e densidade das papilas das porções ventral (A) e dorsal (B) do rúmen dos animais de três dias de idade, ao desmame e 30 dias após o desmame.

Como representado na Figura 13, a redução da densidade de papilas está relacionada com papilas maiores, conseqüentemente aumento da superfície de absorção do epitélio ruminal. A absorção dos AOVs, principal fonte de energia dos animais ruminantes, pelo epitélio ruminal é considerada essencial para o crescimento dos bezerros. Assim, o GMD dos animais pode estar relacionado com a ampliação da superfície de absorção do rúmen. Neste estudo, as densidades de papilas ventrais e

dorsais apresentaram correlação linear negativa moderada com o GMD dos animais abatidos ao desmame, sugerindo que a o GMD aumenta com a redução da densidade de papilas (ampliação da superfície de absorção) (Figura 14A e 14B). Nos animais abatidos 30 dias após o desmame a densidade de papilas não variou entre os bezerros, diferente do observado nos animais abatidos ao desmame. Assim, o estabelecimento da correlação entre a densidade de papilas e o GMD dos animais abatidos 30 dias após o desmame ficou comprometido (Figura 14A e 14B).

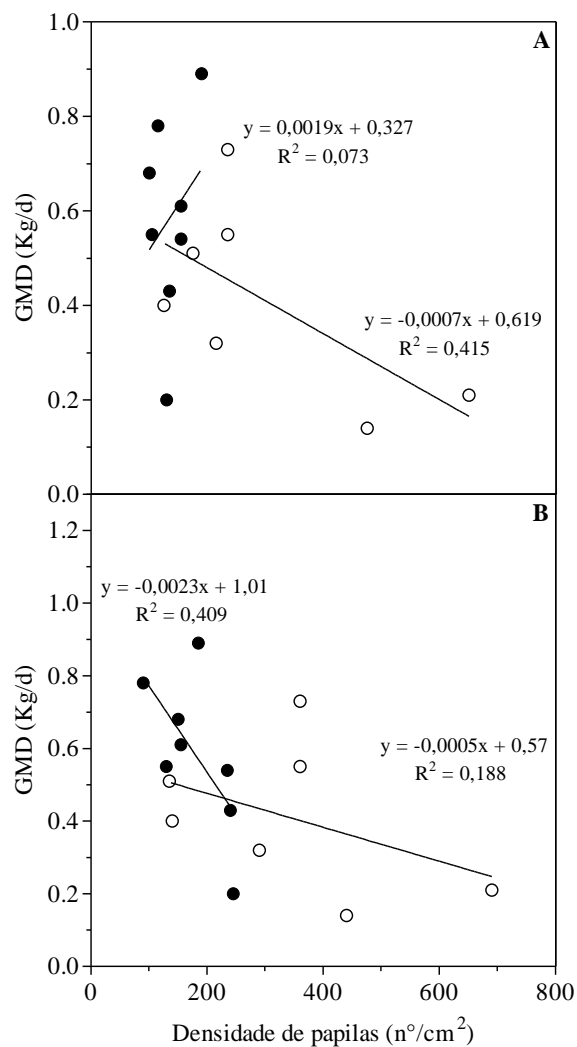


Figura 14 – Relação entre a densidade de papilas (n°/cm^2) ventral (A) e dorsal (B) e o ganho médio diário de peso (GMD) (Kg/L) dos bezerros. Os animais foram mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (\circ) e em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (\bullet).

A influência do consumo de alimentos sólidos sobre o tecido muscular do rúmen e o crescimento das papilas tem sido relatada em alguns estudos. Essa

hipótese foi avaliada neste estudo comparando-se o desenvolvimento das papilas e do tecido muscular de animais que consumiram diferentes quantidades de alimentos sólidos até o desmame ou após o desmame.

A regressão linear da espessura do tecido muscular do rúmen (ventral e dorsal) em função do CMSc dos animais até o desmame e em função do CMSt dos animais após a introdução de feno na dieta indicou baixa correlação entre esses parâmetros (Figura 15C e 15D).

A correlação linear entre a altura das papilas e o CMSc dos animais abatidos ao desmame foi alta ($r_{\text{ventral}} = 0,88$ e $r_{\text{dorsal}} = 0,97$) (Figura 15A). Nos animais abatidos após o desmame, o CMSt apresentou alta correlação linear ($r = 0,81$) com a altura das papilas dorsais e moderada correlação ($r = 0,54$) com a altura das papilas ventrais (Figura 15B). Esses resultados indicam que o aumento do consumo de alimentos sólidos pelo animal pode estar relacionado com o aumento do tamanho das papilas do rúmen.

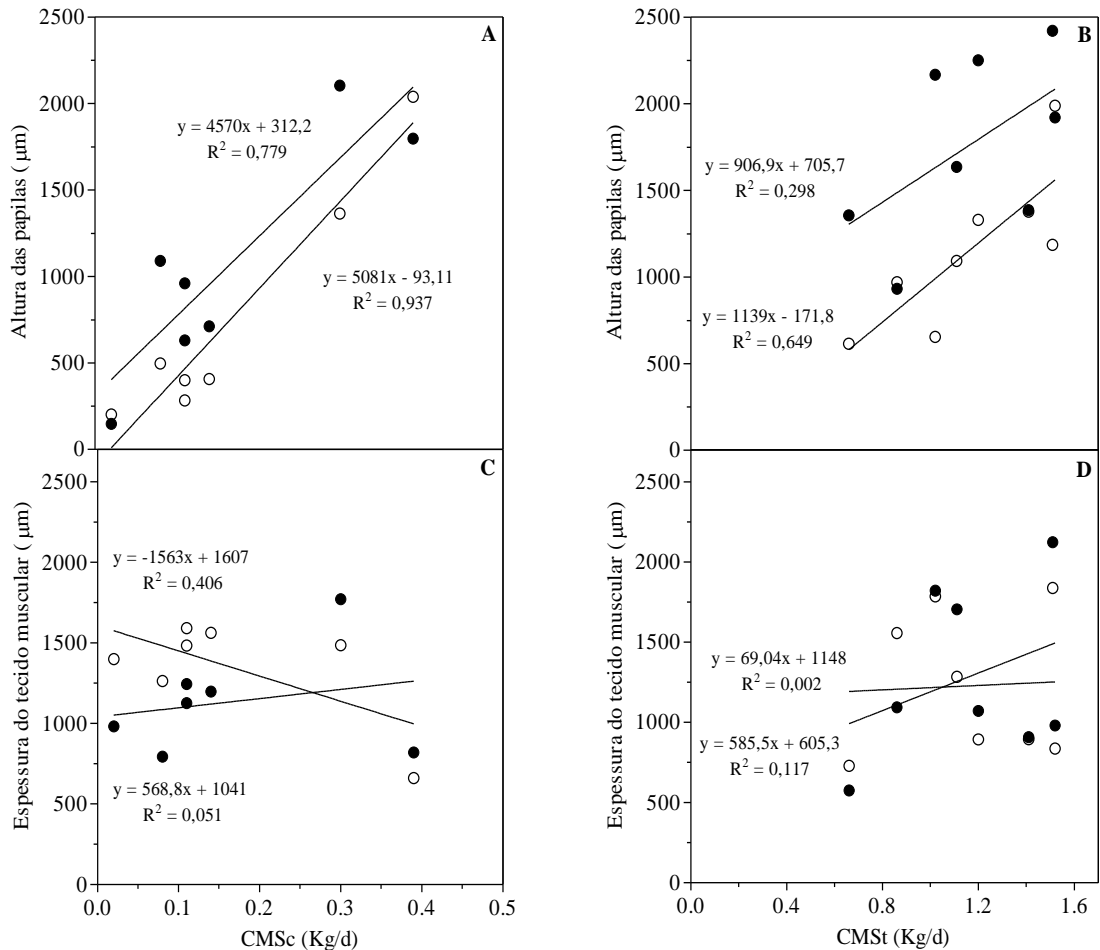


Figura 15 – Influência do consumo diário de massa seca (CMS) (Kg/L) sobre a altura das papilas (μm) e espessura do tecido muscular (μm) do rúmen dos bezerros. Para os animais mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (A e C) foi avaliado o efeito consumo de massa seca do concentrado (CMSc), enquanto para os animais mantidos em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (B e D) foi avaliado o consumo de massa seca total (CMSt). Foi avaliada a altura das papilas e a espessura do tecido muscular das porções ventral (●) e dorsal (○) do rúmen.

Estudos anteriores relacionaram o aumento da proliferação das células epiteliais e crescimento das papilas do rúmen à concentração dos AOVs no rúmen, principalmente propionato e butirato. No presente trabalho, não foi observada correlação entre a concentração de butirato e a altura das papilas, sugerindo que a faixa de concentração desse ácido orgânico no rúmen dos animais não influenciou o desenvolvimento das papilas nas condições avaliadas. No entanto, a concentração de propionato apresentou alta correlação quadrática ($r = 0,82$) com a altura das papilas da porção ventral do rúmen dos animais abatidos ao desmame (Figura 16A). Entre estes animais, as maiores alturas de papilas foram observadas quando a concentração de propionato no rúmen foi cerca de 30 mmol/ L, sendo que concentrações mais altas ou mais baixas de propionato estavam associadas a um menor crescimento das papilas (Figura 16A). Nos animais abatidos 30 dias após o desmame foi observada correlação moderada entre a concentração de propionato no rúmen e a altura das papilas ventrais (Figura 16B). Essa correlação sugere que maiores concentrações de propionato no rúmen estão relacionadas com papilas menores. Além disso, maiores concentrações totais de AOVs no rúmen também parecem estar associadas a papilas menores, tanto nos animais abatidos ao demame, quanto nos animais abatidos após o desmame (Figuras 17A e 17B).

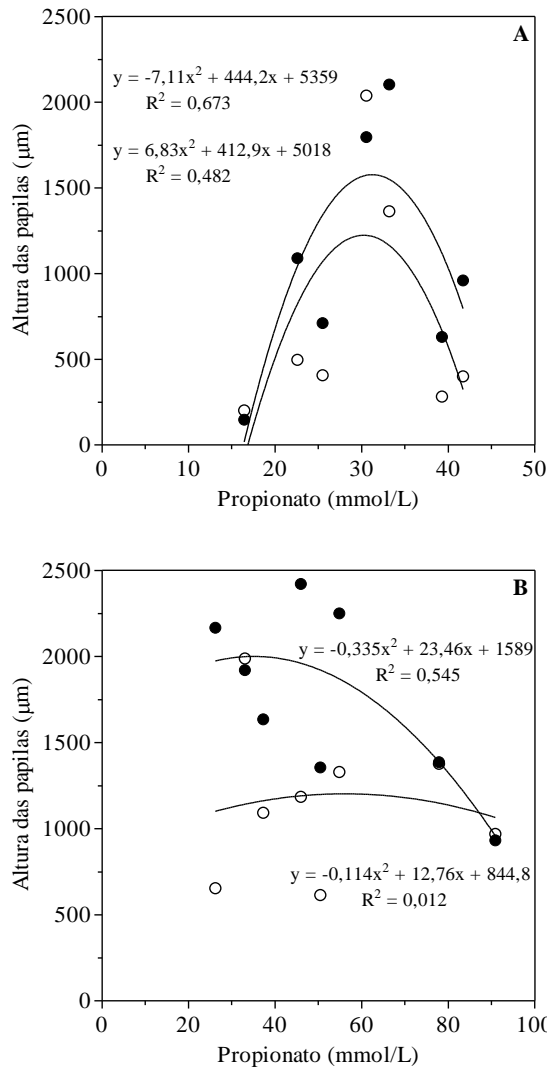


Figura 16 – Influência da concentração de propionato (mmol/L) sobre a altura das papilas (μm) do rúmen dos bezerros abatidos ao desmame (A) e 30 dias após o desmame (B). Foi avaliada a altura das papilas das porções ventral (●) e dorsal (○) do rúmen dos animais mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (A), bem como dos animais mantidos em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (B).

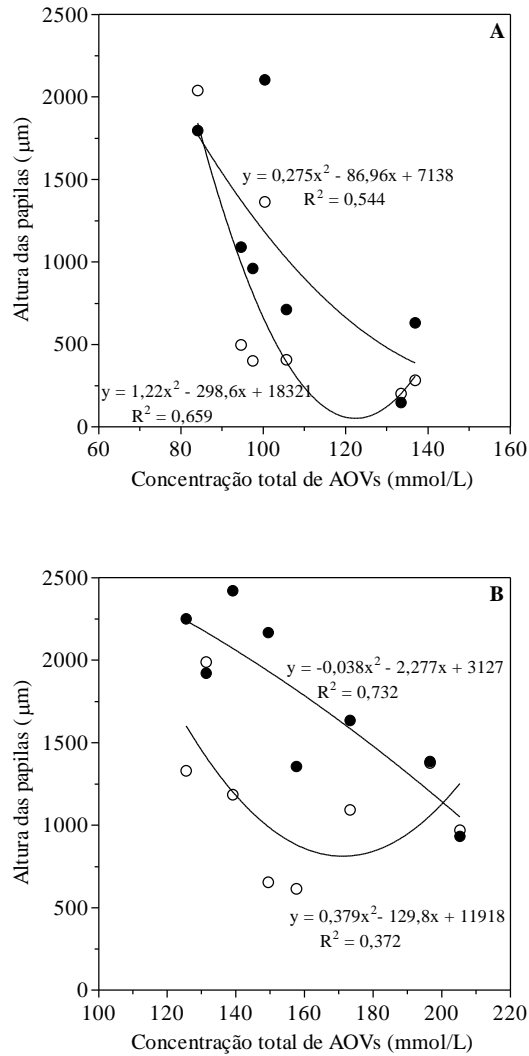


Figura 17 – Influência da concentração total de ácidos orgânicos voláteis (AOVs) (mmol/L) sobre a altura das papilas (μm) do rúmen dos bezerros abatidos ao desmame (A) e 30 dias após o desmame (B). Foi avaliada a altura das papilas das porções ventral (●) e dorsal (○) do rúmen dos animais mantidos em uma dieta a base de leite e concentrado até o desmame (A), bem como dos animais mantidos em uma dieta a base de feno e concentrado por 30 dias após o desmame (B).

2.4 DISCUSSÃO

Assim como nos animais adultos, o sistema de alimentação adotado para bezerros influencia a composição da microbiota do rúmen e, conseqüentemente, reflete nos produtos da fermentação ruminal e na eficiência alimentar dos animais (Li *et al.*, 2012; Jami *et al.*, 2013). Além disso, nos primeiros meses de vida a dieta está relacionada com o desenvolvimento anatômico do rúmen. Dessa forma, estudos recentes com a finalidade de verificar o efeito de diferentes estratégias de alimentação não só no desempenho do animal, como também no desenvolvimento ruminal dos bezerros tem avaliado a colonização, atividade enzimática, concentração de amônia, concentração de ácidos orgânicos voláteis (AOVs), aumento do volume e crescimento das papilas do rúmen durante a fase de aleitamento e após o desmame (Kristensen *et al.*, 2007; Kosiorowska *et al.*, 2010; Rey *et al.*, 2012; Rey *et al.*, 2013).

No Brasil é comum o fornecimento de concentrado *ad libitum* aos bezerros durante a fase aleitamento e desmame e introdução de feno na dieta com cerca de 60 dias de idade (Coelho, 1999; Coelho, 2009). O consumo de concentrado varia de acordo com a quantidade de leite, alimento preferencial dos bezerros durante esta fase, ofertada aos animais (Drackely, 2008). Neste trabalho, considerando os bezerros abatidos ao desmame, o consumo diário de massa seca do concentrado (CMSc) observado nos animais que consumiram quatro, seis e oito litros de leite por dia representa a tendência do maior consumo de alimentos sólidos pelos animais cuja oferta de leite foi menor (Figura 3A). Lima (2013) observou que animais que consumiram quatro e seis litros de leite por dia apresentaram CMSt equivalente, haja vista o efeito compensatório do CMSc, ou seja, maior CMSc pelos animais com menor consumo de leite. Segundo Drackely (2008), a restrição do volume de leite oferecido é importante para estimular o consumo de alimentos sólidos pelo animal durante a fase de aleitamento. No entanto, apesar do efeito compensatório do CMSc no CMSt, o maior consumo de leite resulta em um maior fornecimento de energia e maior GMD (Figura 2), devido à maior capacidade de aproveitamento dos nutrientes do leite pelos animais nesta fase (Lima, 2013; Rodrigues 2013).

A oferta diária de apenas dois litros de leite não foi compensada pelo maior CMSc, resultando em menor CMSt pelo animal . Esse comportamento já havia sido

reportado em estudos anteriores que avaliaram o efeito da redução da oferta de leite sobre o consumo de concentrado durante a fase de aleitamento (Baker *et al.*, 1976; Abdelsamei *et al.*, 2005; Kristensen *et al.*, 2007; Kosiorowska *et al.*, 2010). Tais estudos sugerem que o consumo de quantidades restritas de leite (volumes menores que 10 % do peso do animal ao nascimento) compromete o desempenho e ganho de peso dos animais já que somente após o primeiro mês de vida os bezerros conseguem consumir ração concentrada em quantidades suficientes para atender as demandas nutricionais.

O consumo de alimentos sólidos, como o concentrado, durante a fase de aleitamento tem sido considerado importante para estimular o desenvolvimento ruminal e não comprometer a ingestão futura de alimentos sólidos (Cozzi *et al.*, 2002). Apesar de o leite atender a demanda de energia dos bezerros, estudos consideram que o fornecimento exclusivo de dieta líquida limita o desenvolvimento ruminal e retarda a atividade oral, como a mastigação e a ruminação (Sweeney *et al.*, 2010). Neste trabalho, todas as dietas adotadas durante a fase de aleitamento incluíam a oferta de concentrado *ad libitum* para os animais. Assim, a ingestão de alimentos após o desmame não foi comprometida e o CMSt foi equivalente ($P > 0,05$) para os animais que consumiram quatro, seis e oito litros de leite (Figura 3B). De acordo com Lima (2013) o fornecimento de maiores volumes de leite durante a fase de aleitamento possibilita melhor desempenho e maior consumo de matéria seca e de nutrientes pelos bezerros.

O aumento da concentração de AOVs com a idade está associado ao aumento da capacidade de ingestão de alimentos sólidos pelos bezerros com a idade (Anderson *et al.*, 1987; Beharka *et al.*, 1998). Os bezerros apresentam baixo CMSt ao início da vida, visto a capacidade limitada de CMSc. No entanto, o desenvolvimento do trato gastrointestinal possibilita maior CMSc pelo animal, o que resulta no aumento do CMSt com a idade (Lima, 2013; Rodrigues 2013). O aumento do CMSt representa maior quantidade de substrato para a fermentação microbiana no rúmen. No caso dos animais abatidos 30 dias após a introdução de feno na dieta, a fermentação de alimentos fibrosos pelos micro-organismos fibrolíticos também contribui para o aumento da concentração de AOVs no rúmen (Sahoo *et al.*, 2005). Apesar da concentração total de AOVs ter aumentado com a idade, as proporções de acetato, propionato e butirato não variaram no rúmen dos animais ao desmame e 30

dias após o desmame (Figuras 4A e 4B). Nessas idades, especula-se que os processos fermentativos do rúmen já estejam balanceados e as proporções de 4,5 acetato : 3 propionato : 1 butirato sejam mantidas, assim como nos animais adultos (Anderson *et al.*, 1987; Sutton *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2012). O aumento da concentração total de AOVs no rúmen com a idade dos animais também está relacionado com o estabelecimento da microbiota ruminal (Bryant *et al.*, 1958; Rey *et al.*, 2012). Inicialmente, o rúmen é colonizado por bactérias anaeróbias facultativas que auxiliam na remoção do oxigênio residual no rúmen, possibilitando o estabelecimento das bactérias anaeróbias estritas responsáveis pelos processos fermentativos característicos do ecossistema ruminal (Fonty *et al.*, 1987; Minato *et al.*, 1992; Reyet *et al.*, 2013). A baixa concentração de AOVs no rúmen dos bezerros com três dias de idade está relacionada com a reduzida colonização do ecossistema ruminal nos primeiros dias de vida (Rey *et al.*, 2012; Rey *et al.*, 2013). Em trabalho recente, Rey e colaboradores (2013) relataram que a amplificação do gene rRNA16S para análise metagenômica da microbiota ruminal de bezerros da raça holandesa com apenas um dia de vida não foi possível devido a reduzida colonização rúmen. Além disso, nos primeiros dias de vida dos ruminantes a maior parte do leite ingerido flui diretamente para o abomaso em função do fechamento do orifício retículo-ruminal pela goteira esofágica (Huber, 1969; Church, 1988; Rodrigues *et al.*, 2002), limitando o substrato para a fermentação microbiana no rúmen.

A absorção dos AOVs pelo epitélio ruminal representa a principal fonte de energia para o desenvolvimento e crescimento dos ruminantes (Huntington, 1990; Allen *et al.*, 2005). Cerca de 80 % da energia necessária para a manutenção dos animais ruminantes é proveniente do metabolismo dos AOVs, principalmente propionato, butirato e acetato (Bergman, 1990; Penner *et al.*, 2009). Apesar de o GMD ter apresentado fraca correlação com a concentração total de AOVs no rúmen (Figura 5), bem como com as proporções de acetato e butirato, a redução da proporção de propionato parece estar relacionada ao maior GMD dos animais abatidos ao desmame (Figura 6). Supondo que animais com maior GMD absorvem e metabolizam mais propionato e, por isso, se desenvolvem mais, pode-se justificar a menor concentração desse AOV no rúmen desses animais como resultado da diferença nos processos absorptivos do epitélio ruminal dos animais avaliados. O propionato pode estar mais relacionado com o ganho de peso dos animais já que esse

AOV é o principal substrato para a gliconeogênese hepática (Bergman, 1990). A maior parte do butirato é ativado durante o transporte (formação de ésteres CoA) e metabolizado no próprio epitélio ruminal e os corpos cetônicos resultantes (acetoacetato, 3-hidroxi butirato) são transportados para o fígado e glândula mamária, onde estão envolvidos no processo de lipogênese. Já o acetato, além de estar relacionado com a lipogênese no tecido adiposo, é utilizado como fonte de energia nos tecidos periféricos (Bergman, 1990; Penner *et al.*, 2009; Aluwong *et al.*, 2010; Storm *et al.*, 2012).

O suprimento protéico adequado aos ruminantes é essencial para o maior desenvolvimento animal e obtenção de maiores índices de produção (Bach *et al.*, 2005). A degradação da proteína dietética no rúmen envolve a solubilização, hidrólise extracelular, transporte para o citoplasma, desaminação dos aminoácidos, e por fim, fermentação dos esqueletos de carbono (Owens e Zinn, 1988; Russell *et al.*, 1991, Walker *et al.*, 2005; Bach *et al.*, 2005). A partir desses processos os produtos do metabolismo de proteínas no rúmen são amônia, ácidos orgânicos e CO₂. Neste trabalho, a degradação de proteína dietética no rúmen dos animais abatidos ao desmame resultou em alta concentração de amônia (em média 33 mmol/L) (Figura 7). A caseína, um dos principais componentes do leite, é uma proteína solúvel e possui alta taxa de degradação no rúmen pelos micro-organismos (Ørskov, 1992; Arias, 1993). Maiores concentrações de amônia no rúmen de animais durante a fase de aleitamento também foi relatada em outros estudos (Kristensen *et al.*, 2007, Rey *et al.*, 2012). Rey e colaboradores (2012) observaram que entre o quinto e o vigésimo dia de vida, bezerros holandeses alimentam basicamente de leite e apresentam concentração de amônia no rúmen em média quatro vezes maior que a concentração observada nos animais com idade superior, cujo consumo de leite é menor devido ao maior consumo feno e concentrado. Aquele estudo ainda demonstrou maior atividade de urease e protease, enzimas envolvidas no metabolismo protéico no rúmen e sintetizadas por bactérias ureolíticas e proteolíticas, respectivamente, no período de maior consumo de leite pelos animais. Assim, pode-se sugerir que a ingestão de leite estimula o aumento de micro-organismos ureolíticos e proteolíticos, os quais apresentam elevada atividade de desaminação.

Após o desmame e introdução de feno na alimentação dos animais, observou-se redução na concentração de amônia, compatível com o observado em bezerros

consumindo feno e concentrado (Kristensen *et al.*, 2007; Rey *et al.*, 2012). A menor concentração de amônia no rúmen dos bezerros abatidos com três dias de idade, apesar do consumo de leite, provavelmente está associada à reduzida colonização do rúmen por bactérias proteolíticas nesta idade (Jami *et al.*, 2013; Rey *et al.*, 2013). Além disso, como foi mencionada para a variação na concentração de AOVs no rúmen dos bezerros, nesta fase a maior parte do leite ingerido flui diretamente para o abomaso.

Trabalhos anteriores demonstram que a atividade de desaminação dos micro-organismos é influenciada pelo consumo de nitrogênio na dieta (Russell *et al.*, 1983; Agle *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011). O maior CMSt dos bezerros refletiu no aumento da concentração de amônia no rúmen (Figura 8) provavelmente em função da maior disponibilidade de proteína para os micro-organismos proteolíticos. A energia do metabolismo de proteínas no rúmen parece contribuir para o GMD dos animais, tendo em vista a correlação moderada entre a concentração de amônia e o GMD (Figura 9).

Além do estabelecimento dos processos de fermentação pela microbiota ruminal, o amadurecimento do rúmen com a idade do animal envolve o aumento do volume e crescimento das papilas (aumento da área absorptiva) (Huber, 1969; Church, 1983; Baldwin *et al.*, 2004). Neste trabalho, a proliferação das células dos tecidos epitelial e conjuntivo possibilitou o aumento ($P < 0,1$) da altura das papilas (Figura 11B). No entanto não foi observada alteração ($P > 0,1$) nas médias das espessuras desses tecidos com a idade dos animais (Figura 10). A redução da densidade das papilas no rúmen está associada ao aumento do comprimento, largura e espessura das papilas (Church, 1988; Kristensen *et al.*, 2007). Desta forma, animais com papilas mais altas apresentaram menores densidades de papilas (Figuras 13A e 13B). Além disso, segundo Lesmeister e Heinrichs (2004), o aumento do volume do rúmen contribui para a redução da densidade uma vez que promove o espalhamento das papilas. Estudos anteriores que avaliaram o desenvolvimento de papilas do rúmen com a idade não abordaram a relação entre o ganho de peso e superfície de absorção do rúmen. Neste estudo, os animais abatidos ao desmame apresentaram grande variação na densidade de papilas, sendo que animais com menores densidades de papilas apresentaram maior GMD (Figura 14A). Desta forma, pode-se sugerir que o

maior GMD dos animais possa ser reflexo da maior superfície de absorção de AOVs que animais com menores densidades de papilas apresentam.

O desenvolvimento anatômico do rúmen está relacionado com o tipo de alimento ingerido pelos animais (Brownlee, 1956; Tamate *et al.*, 1962; Lesmeister e Heinrichs, 2004). O atrito das partículas dos alimentos sólidos sobre a parede do rúmen estimula a musculatura e o crescimento das papilas (Hamada *et al.*, 1976; Weigand *et al.*, 1975; Lesmeister e Heinrichs, 2004). Hamada e colaboradores (1976) avaliaram o consumo de volumoso por caprinos durante a fase de aleitamento (até 37 dias de idade) e observaram que o consumo de alimentos sólidos e o peso da camada muscular do rúmen apresentaram alta correlação linear ($r = 0,85$).

Neste trabalho foi observado que consumo de quantidades diferentes de concentrado não influenciou a espessura do tecido muscular do rúmen (Figuras 15C e 15D). A partir desse resultado e considerando a observação de Hamada e colaboradores (1976), pode-se sugerir que o atrito de partículas alimentares maiores, como as encontradas nas forragens, estimula o desenvolvimento da musculatura ruminal, em contraste com os alimentos concentrados cujas partículas são menores. Por outro lado, o crescimento das papilas parece ser influenciado ($r > 0,8$) pelo aumento do consumo de concentrado pelos bezerros (Figuras 15A e 15B). O consumo de alimentos sólidos estimula o crescimento das papilas não só devido ao atrito, como também por representar o aumento da disponibilidade de substrato para a fermentação ruminal e conseqüentemente, aumentara concentração de AOVs no rúmen (Beharka *et al.*, 1998).

A concentração de AOVs é relatada como fator estimulante à proliferação de células epiteliais e ao crescimento das papilas (Davis e Drackley, 1998). Estudos visando demonstrar que butirato e/ou propionato induzem o desenvolvimento das papilas avaliaram a infusão intra-ruminal desses ácidos (Sander *et al.*, 1959; Sakata e Tamate, 1978; Sakata *et al.*, 1980; Nozière *et al.*, 2000; Costa, 2008), ou a suplementação de AOVs na dieta (Gorka *et al.*, 2009). Neste trabalho não foi observada relação entre a concentração de butirato e o crescimento das papilas, provavelmente porque foram avaliadas concentrações naturalmente encontradas no rúmen como resultado dos processos fermentativos, as quais são mais baixas do que as testadas nos estudos com infusão intra-ruminal ou adição do AOV na dieta. No entanto, as diferentes concentrações de propionato observadas nos animais parecem

influenciar a altura das papilas ($r > 0,8$ nos animais abatidos ao desmame) (Figuras 16A e 16B). De acordo com a correlação quadrática obtida neste trabalho para animais abatidos ao desmame, tanto concentrações de propionato menores quanto maiores que 30 mmol/L estão relacionados com papilas mais curtas. Considerando que o efeito estimulatório da absorção de propionato sobre o epitélio ruminal esteja relacionado ao maior suprimento energético às células (Hinders e Owen, 1965; Barnes, 1983; Zhao e Sun, 2010), pode-se sugerir que menores concentrações desse AOV no rúmen restringiram o crescimento das papilas. Enquanto uma possível justificativa para a maior concentração de propionato nos animais com papilas mais curtas seria que a menor superfície epitelial desses animais limitaria a absorção dos AOVs, resultando em concentrações mais elevadas no rúmen. Essa hipótese pode ser suportada pela relação observada nas Figuras 17A e 17B que demonstram que o aumento da concentração total de AOVs no rúmen está relacionado com a redução do tamanho das papilas.

Considerando a hipótese e os objetivos propostos neste trabalho, os resultados demonstraram que a oferta de diferentes quantidades de leite durante a fase de aleitamento influenciou o consumo de concentrado, que refletiu no desenvolvimento das papilas do rúmen. O aumento da capacidade de consumo de concentrado com a idade representou o aumento da disponibilidade de substratos para a fermentação ruminal pelos micro-organismos, e conseqüentemente, resultou na maior concentração de AOVs no rúmen. Além disso, a partir dos resultados sugere-se que a concentração dos AOVs no rúmen esteja relacionada com a superfície de absorção do epitélio ruminal. A variação individual comumente observada entre animais (Cozzi *et al.*, 2002; Lesmeister e Heinrichs, 2004; Kristensen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009, Weimer *et al.*, 2010) representou uma limitação no presente trabalho para avaliação da influencia da dieta sobre desenvolvimento ruminal dos bezerras. As evidências indicam que a progressão do desenvolvimento ruminal é influenciada pela dieta. No entanto, o ecossistema ruminal e o desempenho animal podem apresentar diferenças substanciais mesmo entre animais com o mesmo tipo de alimentação.

2.5 CONCLUSÕES

- A quantidade de leite ofertada durante a fase de aleitamento influencia o consumo de concentrado de bezerros holandeses mestiços;
- O consumo de concentrado aumenta o desenvolvimento das papilas ruminais;
- A concentração de ácidos orgânicos voláteis do rúmen aumenta com a idade, no entanto as proporções de acetato, propionato e butirato se mantêm constantes durante a fase de cria;
- O consumo de leite estimula o metabolismo ruminal de proteínas, resultando no aumento da concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelsamei, A. H.; Fox, D. G.; Tedeschi, L. O.; Thonney, M. L.; Ketchen, D. J.; Stouffer, J. R. The effect of milk intake on forage intake and growth of nursing calves. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 940–947, 2005.

Agle, M.; Hristov, A. N.; Zaman, S.; Schneider, C.; Ndegwa, P.; Vaddella, V. K. The effects of ruminally degraded protein on rumen fermentation and ammonia losses from manure in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p.1625–1637, 2010.

Allen, M. S.; Bradford, B. J.; Harvatine, K. J. The cow as a model to study food intake regulation. **Annual Review of Nutrition**. v. 25, p. 523–547, 2005.

Aluwong, T.; Kobo, P. I.; Abdullahi, A. Volatile fatty acids production in ruminants and the role of monocarboxylate transporters: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 6229–6232, 2010.

Anderson, K. L.; Nagaraja, T. G.; Morrill, J. L. Ruminant metabolic development in calves weaned conventionally or early. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1000–1005, 1987.

Anderson, K. L.; Nagaraja, T. G.; Morrill, J. L. Ruminant metabolic development in calves weaned conventionally or early. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1000–1005, 1987.

Arias, R.S. **Necesidades energeticas y proteicas de los rumiantes**. Zaragoza: Editora Acribia, 1993. 175p.

Bach, A.; Calsamiglia, S.; Stern, M.D. Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, 9–21, 2005.

Baker, R. D.; Le Du Y. L. P.; Barker, J. M. Milk-fed calves: The effect of milk intake upon the herbage intake and performance of grazing calves. **Journal of Agricultural Science**, v. 87, p. 187–196, 1976.

Baldwin, R. L.; McLeod, K. R.; Klotz, J. L.; Heitmann, R. N. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and post-weaning ruminant. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 55–65, 2004.

Bancroft, J.D., Stevens, A. **Theory and practice of histological techniques**. New York: Churchill Livingstone, 1996. 606p.

Barnes, R. J.; Comline, R. S.; Dobson, A. Changes in the blood flow to the digestive organs of sheep induced by feeding. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 68, p. 77–88, 1983.

Beharka, A. A.; Nagaraja, T. G.; Morrill, J. L. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1946–1955, 1998.

Bergman, E. N. Energy contributions of volatile fatty acid from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, v. 70, p. 567–590, 1990.

Bradford, M. Photometric methods for protein determination. Procedures and analysis. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p.248–254, 1976.

BROWNLEE, A. The development of rumen papillae in cattle fed different diets. **British Veterinary Journal**, v. 112, p. 369-375, 1956.

Bryant, M. P.; Small, N.; Bouma, C., Robinson, I. Studies on the Composition of the Ruminant Flora and Fauna of Young Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 41, p. 1747–1767, 1958.

Chaney, A. L.; Marbach, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**. v. 8, p.130–132, 1962.

Church, D. C. **Digestive physiology and nutrition of ruminants**. Covallis: Prentice-Hall, 1983. 316p.

Church, D. C. **The ruminant: animal digestive physiology and nutrition**. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1988. 564p.

Coelho, S. G. **Desafios na criação e saúde de bezerros**. In: VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009, Belo Horizonte - MG. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira, 2009.

Coelho, S. G. **Ganho de peso e desenvolvimento do estômago de bezerros desaleitados aos trinta dias de idade e alimentados com concentrado e com ou sem feno**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 123p., 1999.

COSTA, S. F., PEREIRA, M. N., MELO, L. Q. et al. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros: I - Aspectos histológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1–9, 2008.

Costa, V.A.C.; Detmann, E.; Paulino, M.F.; Valadares Filho, S.C.; Carvalho, I.P.C.; Monteiro, L.P. Consumo e digestibilidade em bovinos em pastejo durante o período das águas sob suplementação com fontes de compostos nitrogenados e de carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p.1788–1798, 2011.

Cozzi, G.; Gottardo, F.; Mattiello, S.; Canali, E.; Scanziani, E.; Verga, M.; Andrighetto, I. The provision of solid feeds to veal calves: I. Growth performance, forestomach development, and carcass and meat quality. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 357–366, 2002.

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

Diaz, M. C.; Van Amburgh, M. E.; Smith, J. M. Composition of growth of Holstein calves fed milk replacer from birth to 105 kilogram body weight. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 830–842, 2001.

Drackley, J. K. Calf nutrition from birth to breeding. **Veterinary Clinics Food Animal**, v. 24, p. 55–86, 2008.

Feel, B. F. Observations on the development of ruminal lesions in calves fed on barley. **Research in Veterinary Science**, v. 9, p.458–466, 1968.

Ferreira, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, p.1039 –1042, 2011.

Fonty, G.; Gouet, P.; Jouany, J. P.; Senaud, J. Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 1835–1843, 1987.

Gorka, P.; Kowalski, Z. M.; Pietrzak, P.; Kotunia, A.; Kiljanczyk, R.; Flaga, J.; Holst, J.; Guilloteau, P.; Zabielski, R. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 47–53, 2009.

Hamada, T., S. Maeda, and K. Kameoka. Factors influencing growth of rumen, liver, and other organs in kids weaned from milk replacers to solid foods. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p.1110–1118, 1976.

Hinders, R. G.; Owen, F. G. Relation of ruminal parakeratosis development to volatile fatty acid absorption. **Journal of Dairy Science**, v. 48, p. 1069–1074, 1965.

Huber, J. T. Development of the digestive and metabolic apparatus of the calf. **Journal of Dairy Science**, v. 52, p. 1303–1315, 1969.

Huntington, G. B. Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: influence of physiological state and nutrition. **Reproduction Nutrition Development**. v. 30, p. 35–47, 1990.

Jami, E.; Israel, A.; Kotser, A.; Mizrahi, I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **The ISME journal**, v. 6, p. 1069–1079, 2013.

Jasper, J.; Weary, D. M. Effects of *ad libitum* intake on dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.3054–3058, 2002

Khan, M. A.; Lee, H. J.; Lee, W. S.; Kim, H. S.; Ki, K. S.; Hur, T. Y.; Suh, G. H.; Kang, S. J.; Choi, Y. J. Structural growth, rumen development, and metabolic and immune responses of holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.3376–3387, 2007.

Khan, M. A.; Weary, D. M.; Von Keyserlingk, M. A. G. Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 3547–3553, 2011.

Kosiorowska A.; Puggaard L.; Hedemann M. S.; Sehested J.; Jensen S. K.; Kristensen N. B.; Kuropka P.; Marycz K.; Vestergaard M. Gastrointestinal development of dairy calves fed low- or high-starch concentrate at two milk allowances. **Animal**, v. 5, p. 211–219, 2010.

Kristensen, N. B.; Sehested, J.; Jensen, S. K.; Vestergaard, M. Effects of milk allowance on concentrate intake, ruminal environment, and ruminal development in milk-fed Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4346–4355, 2007.

Lesmeister, K. E.; Heinrichs, A. J. Effects of corn processing on growth characteristics, rumen development, and rumen parameters in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3439–3450, 2004.

Li, M.; Penner, G.B.; Hernandez-Sanabria, E.; Oba, M.; Guan, L.L. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p.1924–1934, 2009.

Li, R.W.; Connor, E. E.; Li, C.; Baldwin, V. R. L.; Sparks, M. E. Characterization of the rumen microbiota of preruminant calves using metagenomic tools. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 129–139, 2012.

Lillie, R. D.; Fullmer, H. M. **Histopathological technique and practical Histochemistry**. New York: McGraw Hill, 1968. 160p.

Lima, J. C. M. **Consumo de matéria seca e exigências de energia para bezerros lactentes**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 44p., 2013.

Minato, H.; Otsuka, M.; Shirasaka, S.; Itabashi H.; Mitsumori, M. Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 38, p. 447–456, 1992.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrients requirements of dairy cattle**. Washington: National Academy Press, 2001. 381p.

Nozière, P.; Martin, C. M.; Remond, D.; Kristensen, N. B.; Bernard, R.; Doreau, M. Effect of composition of ruminally infused short-chain fatty acids on net fluxes of nutrients across portal-drained viscera in underfed ewes. **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 521– 531. 2000.

Ørskov, E.R. **Protein nutrition in ruminants**. San Diego: Academic Press, 1992. 175p.

Owens, F.N.; Zinn, R. Protein metabolism of ruminant animals. In: Church, D.C. **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. New Jersey: Prentice Hall, 1988, p. 227–249.

Penner, G. B.; Oba, M. Increasing dietary sugar concentration may improve dry matter intake, ruminal fermentation, and productivity of dairy cows in the postpartum phase of the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3341–3353, 2009.

Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3620–3633, 2003.

Rey, M.; Enjalbert, F.; Combes, S.; Cauquil, L.; Bouchez, O.; Monteils, V. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 245–257, 2013.

Rey, M.; Enjalbert, F.; Monteils, V. Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1500–1512, 2012.

Rodrigues, J. P. P. **Exigências nutricionais de proteína e macrominerais de bezerros da raça holandesa**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 54p., 2013.

Rodrigues, R. R.; Lucci, C. S.; Rodrigues, P. H. M. Alimentação de bezerros ruminantes com dieta sólida ou líquida, via goteira esofageana: formação da goteira e escape ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 2364–2372, 2002.

Russel, J. B.; Onodera, R.; Hino, T. Ruminal protein fermentation: News perspectives on previous contradictions. In: Tsuda, T.; Sasaki, Y.; Kawashima, R. **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. New York: Academic Press, 1991, p. 681–697.

Russell, J.B.; Sniffen, C.J.; Van Soest, P.J. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 763–775, 1983.

Sahoo, A., D. N. Kamra, and N. N. Pathak. Pre- and postweaning attributes in faunated and ciliate-free calves fed calf starter with or without fish meal. **Journal Dairy Science**, v. 88, p. 2027–2036, 2005.

Sakata, T.; Hikosaka, K.; Shiomura, Y.; Tamate, H. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 44, p. 325–331, 1980.

Sakata, T.; Tamate, H. Ruminal epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 1109–1113, 1978.

Sander, E. G.; Warner, R. G.; Harrison, H. N.; Loosli, J. K. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosae in the young calf. **Journal of Dairy Science**, v. 42, p. 1600–1605, 1959.

Siegfried, B. R.; Ruckemann, H.; Stumpf, G. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtschaft Forsch**, v. 37, p. 298, 1984.

Storm, A. C.; Kristensen, N. B.; Hanigan, M. D. A model of ruminal volatile fatty acid absorption kinetics and rumen epithelial blood flow in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2919–2934, 2012.

Sutton, J. D.; Dhanoa M. S.; Morant S. V.; France J.; Napper D. J.; Schuller E. Tamate, H.; Mcgilliard, A. D.; Jacobson, N. L.; Getty, R. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p. 408–420, 1962.

Walker, N. D.; Newbold, C. J.; Wallace, R. J. Nitrogen metabolism in the rumen. In: Pfeffer, E.; Hristov, A. **Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle**. Cambridge: CABI Publishing, 2005, p. 71–115.

Warner, R. G.; Flatt, W. P.; Loosli, J. K. Ruminant nutrition, dietary factors influencing development of ruminant stomach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, p. 788–792, 1956.

Weigand, E.; Young, J.; W; Mcgilliard, A. D. Volatile fatty acid metabolism by rumen mucous from cattle fed hay or grain. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 1294–1300, 1975.

Weimer, P. J.; Stevenson, D. M.; Mantovani, H. C.; Man, S. L. C. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5902–5912, 2010.

Zhao G.-Y.; Sun Y.B. Effects of volatile fatty acids on IGF-I, IGFBP-3, GH, insulin and glucagon in plasma, and IGF-I and IGFBP-3 in different tissues of growing sheep nourished by total intragastric infusions. **Asian-australasian Journal of Animal Science**, v. 23, p. 366–371, 2010.