



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**MARCADORES MORFOLÓGICOS EM
PAPILAS RUMINAIS DE BOVINOS E
OVINOS**

LUCIANO DA SILVA ALONSO

2002

LUCIANO DA SILVA ALONSO

**MARCADORES MORFOLÓGICOS EM PAPILAS RUMINAIS DE
BOVINOS E OVINOS**

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

Orientador

Prof. Marcos Neves Pereira



LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

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

Alonso, Luciano da Silva

Marcadores morfológicos em papilas ruminais de bovinos e ovinos / Luciano da Silva Alonso. -- Lavras : UFLA, 2002.

43 p. : il.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia:

1. Apoptose. 2. Papila ruminar. 3. Morfologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-636.2142

-636.31

LUCIANO DA SILVA ALONSO

**MARCADORES MORFOLÓGICOS EM PAPILAS RUMINAIS DE
BOVINOS E OVINOS**

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

Aprovada em 26 de abril de 2002.

Prof. José Camisão de Sousa - UFLA

Prof. Júlio Sílvio de Sousa Bueno Filho - UFLA

Prof.^a Lisete Chamma Davide - UFLA


Prof. Marcos Neves Pereira

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

DEDICO

À MEMÓRIA DE MEU PAI (VIVALDO) E DE MEU IRMÃO (ROGÉRIO).

Agradecimentos

A Deus por consentir que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao professor Marcos Neves Pereira pela capacidade e paciência em me orientar e pelo exemplo como pesquisador.

Ao professor João Chrysostomo de Resende Júnior pela cessão dos dados utilizados neste trabalho, pela incansável e imprescindível colaboração em todas as etapas deste, e pela amizade. Meus sinceros agradecimentos.

À acadêmica de Medicina Veterinária, Leandra Queiroz de Melo, pelo laborioso trabalho na coleta de dados.

À professora Cristina Delarete Drummond pelas valiosas sugestões que em muito enriqueceram este trabalho.

Às professoras Suely de Fátima Costa e Lisete Chamma Davide pelo desprendimento em cooperar sempre que foi necessário.

Aos professores José Camisão de Sousa, Júlio Sílvio de Sousa Bueno Filho e a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste. Muito obrigado.

Ao professor Henrique Ribeiro Alves de Resende pelo apoio constante e pela amizade.

Aos meus sogros, Sr. Aramis e Dona Gilda, por sempre terem acreditado em mim, e pela presença, mesmo em momentos difíceis.

Ao meu sobrinho André Lucas pelo Carinho, e aos meus irmãos, Adriana e Rodrigo, pelo Carinho e Apoio em todos os momentos de minha vida.

À minha mãe, Dona Nilce, pelo Amor, Carinho, Exemplo, e Ensinaamentos que, com certeza, foram a base de tudo o que hoje sou e constituem meu maior estímulo para melhorar como Ser Humano. Minha sincera gratidão e reconhecimento.

É difícil encontrar palavras para agradecer à minha esposa Marcela, pelo Amor e dedicação, e também pelas longas horas ao meu lado, dividindo comigo as tarefas para que este trabalho fosse concluído com sucesso. Meus mais profundos votos de Amor e Gratidão.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 3 |
| 2.1 Morfologia do estômago de ruminantes..... | 3 |
| 2.2 Efeito da dieta na morfologia das papilas ruminais | 3 |
| 2.3 Papilas ruminais e capacidade de absorção de AGV | 11 |
| 2.4 Ciclo celular no epitélio ruminal | 13 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 Locais de realização dos trabalhos..... | 18 |
| 3.2 Experimento 1 | 18 |
| 3.3 Experimento 2 | 19 |
| 3.4 Avaliações morfológicas | 20 |
| 3.4.1 Índice mitótico | 20 |
| 3.4.2 Índice apoptótico | 20 |
| 3.4.3 Mensurações microscópicas | 21 |
| 3.5 Análises estatísticas | 23 |
| 3.5.1 Experimento 1 | 23 |
| 3.5.2 Experimento 2 | 24 |
| 3.5.3 Correlação entre mensuração macroscópica e mensuração microscópica..... | 24 |
| 3.5.4 Correlação entre os avaliadores do índice apoptótico e índice mitótico | 25 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 26 |
| 5 CONCLUSÃO | 35 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |

RESUMO

ALONSO, L. S. Marcadores morfológicos em papilas ruminais de bovinos e ovinos. 2002. 43 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

A manipulação nutricional da capacidade de absorção de ácidos graxos voláteis (AGV) pela parede do rúmen pode ser uma estratégia para controlar a acidose ruminal em vacas leiteiras. Indução nutricional de aumento na área das papilas tem sido positivamente correlacionado à capacidade de absorção de AGV pela parede ruminal. No entanto, nem sempre se observa resposta em área papilar à variação no plano nutricional. Imprecisões na técnica de mensuração da área papilar podem parcialmente explicar tal fenômeno. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de alguns parâmetros morfológicos das papilas ruminais de bovinos e ovinos a mudanças agudas no plano nutricional. Foram avaliados o índice mitótico (IM), o índice apoptótico (IA), a largura das papilas, a largura do tecido conjuntivo, o número de cunhas epiteliais e o número de papilas dérmicas. Foram realizados 2 experimentos. No experimento 1 (E1) foram utilizadas 7 vacas fistuladas no rúmen e alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes por dia durante 19 dias seguido de um período de jejum de 72 horas. Biópsias das papilas ruminais foram realizadas nos dias 0, 4, 12 e 19 do período de alimentação e 24, 48 e 72 horas após o início do jejum. No experimento 2 (E2) foram realizados dois ensaios não simultâneos, cada um com 3 ovinos fistulados no rúmen. Nos dois ensaios os animais foram abruptamente submetidos a 72 horas de jejum após receberem dietas contendo alfafa e milho moído. Papilas ruminais foram coletadas por biópsia no final do período de alimentação e no final das 72 horas de jejum. Não foi detectado efeito significativo da frequência de alimentação concentrada sobre o IA no E1 ($P=0,95$) e do jejum sobre esta mesma variável no E2 ($P=0,29$). Em uma segunda análise realizada no E1 houve tendência ($P=0,07$) de aumento no IA 72 horas após o jejum comparativamente aos valores do 19º dia de alimentação. No E2 o IM foi 0,73% no período de alimentação e 0,48% no jejum ($P<0,01$), semelhante ao aumento previamente observado nesta variável quando os animais foram alimentados 1 vez por dia no E1. O efeito do plano alimentar foi não significativo sobre qualquer das outras variáveis estudadas ($P>0,34$ no E1 e $P>0,13$ no E2). Dentre os marcadores morfológicos avaliados o IM mostrou ser a melhor variável de resposta morfológica do epitélio à mudanças no plano alimentar.

Comitê orientador: Marcos Neves Pereira – UFLA (Orientador), Cristina Delarete Drummond – UFLA e Lisete Chamma Davide – UFLA.

ABSTRACT

ALONSO, L. S. Bovine and Ovine Ruminal Papillae Morphologic Markers. Lavras: UFLA, 2002. 43 p. (Dissertation – Master Program in Animal Science)

Nutritional manipulation of ruminal wall volatile fatty-acid (VFA) absorption capacity, may be a strategy to control ruminal acidosis in dairy cattle. Nutritional induction to increase papillae area has been positively correlated to the ruminal wall VFA absorption capacity. However, papillae area responses induced by nutritional plan variations are not always observed. Papillae area measurement technique imprecision may partially explain this fact. The objective of this experiment was to evaluate responses of a few bovine and ovine ruminal papillae morphologic variables to acute changes on the nutritional plan. Mitotic index (MI) and apoptotic index (AI), papillae widths, and numbers of epithelial pegs and ,dermal papillae were evaluated. In experiment 1 (E1), seven rumen cannulated cows fed concentrate once or four times a day for 19 days, followed by a 72 h fasting period. Ruminal papillae biopses were performed on days 0, 4, 12 and 19 of the feeding trial period and 24, 48 and 72 hours after the beginning of the fasting period. In experiment 2 (E2), two non simultaneous trials were done, each with 3 rumen cannulated sheep. In both trials, after receiving alfalfa and cracked corn diets, the animals were abrupt submitted to a 72 hours fasting period. Ruminal papillae were biopsed at the end of the feeding period and after the 72 h fasting period. AI was neither affected by concentrate feeding frequency in E1 ($P = 0.95$) nor by fasting in E2 ($P = 0.29$). Further comparison between AI values at 72 h post fasting and 19th day feeding trial period values, showed an effect of fasting ($P = 0.07$). In E2, MI was 0.73 % during the feeding period and 0.48 % during fasting ($P < 0.01$). This finding was similar to the previously observed MI increase, when animals were fed once a day in E1. Alimentary plan did not affect any other variable ($P > 0.34$ and $P > 0.13$ in E1 and E2, respectively). Among the morphological markers evaluated, MI was the best epithelial morphologic response variable induced by alimentary plan changes.

Graduate Committee: Marcos Neves Pereira – UFLA (Major Professor),
Cristina Delarete Drummond – UFLA and Lisete Chamma Davide – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A conversão microbiana de carboidratos em ácidos graxos voláteis (AGV) é uma característica da fisiologia digestiva dos ruminantes. Os AGV constituem a maior fonte de energia para o animal (Bergman, 1990). Vacas leiteiras de alta produção recebem dietas com alto teor de energia logo após o parto, como uma maneira de adequar a dieta consumida à demanda metabólica da lactação. Dietas energéticas são ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen. Quando fornecidas aos animais, estas dietas podem resultar em acúmulo de AGV no fluido ruminal, caso a mucosa não esteja apta à absorção rápida. Acúmulo de AGV no rúmen caracteriza o quadro de acidose ruminal (Elam, 1976) que pode afetar negativamente o desempenho e a saúde animal através de efeitos deletérios sobre a motilidade do rúmen (Crichlow & Chaplin, 1985), a fermentação da fibra (Grant & Mertens, 1992), o consumo de alimentos (Elliot et al, 1995) e a morfologia da parede ruminal (Elam, 1976). Práticas de manejo que estimulem o desenvolvimento morfológico do estômago de ruminantes podem ser utilizadas para promover maior capacidade de absorção de AGV pela parede do rúmen, constituindo um fator potencialmente capaz de reduzir a incidência de acidose no pós-parto de vacas leiteiras (Dirksen et al., 1985).

Marcadores morfológicos nas papilas ruminais são necessários em estudos de indução da capacidade de absorção de AGV pela parede do rúmen por permitirem avaliar o potencial de absorção da mucosa. Além de estarem correlacionados à capacidade de absorção, os marcadores morfológicos devem, ao mesmo tempo, ser sensíveis a mudanças no plano nutricional da maneira mais aguda possível, visando reduzir a necessidade de duração dos experimentos. Os AGV são indutores de proliferação do epitélio ruminal (Sakata & Tamate,

1978a) e a capacidade de absorção parece estar correlacionada positivamente à área epitelial (Sutton et al., 1963). No entanto, nem sempre se tem observado efeito simultâneo da dieta sobre o tamanho papilar e sobre a capacidade de absorção do órgão (Gäbel et al., 1993). Imprecisões nas técnicas de avaliação da capacidade de absorção e/ou nas técnicas de avaliação morfológica podem explicar tal fato.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta morfológica aguda do epitélio ruminal de bovinos e ovinos a mudanças no plano alimentar, visando definir marcadores morfológicos utilizáveis em estudos de manipulação nutricional da capacidade de absorção de AGV pela parede do rúmen. Foram avaliados o índice apoptótico, o índice mitótico, a largura das papilas, a largura do tecido conjuntivo das papilas, o número de cunhas epiteliais e o número de papilas dérmicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 – Morfologia do estômago de ruminantes

O estômago dos ruminantes é composto por quatro câmaras distintas. O pró-ventrículo, revestido por mucosa aglandular, é formado pelas três primeiras câmaras: rúmen, retículo e omaso. O abomaso, também conhecido como ventrículo ou estômago químico, constitui a quarta câmara, possuindo mucosa do tipo glandular. O rúmen, assim como outros órgãos cavitários do sistema digestório, apresenta quatro camadas ou túnicas constituindo sua parede. Estas túnicas são, no sentido da cavidade do abdômen para o interior do órgão, a serosa, a muscular, a submucosa e a mucosa. A túnica mucosa do rúmen caracteriza-se pela presença de inúmeras projeções, as papilas ruminais, que aumentam a superfície de absorção. O epitélio da túnica mucosa é do tipo estratificado pavimentoso queratinizado, estando apoiado em uma membrana basal ou lâmina própria, e constitui-se de quatro camadas de células: basal ou germinativa, espinhosa, granulosa e córnea. Estas são denominadas a partir da cavidade do abdômen para a luz do órgão (Lavker et al., 1969). O epitélio apresenta projeções em direção à lâmina própria denominadas cunhas epiteliais. Estas por sua vez delimitam reentrâncias do tecido conjuntivo em direção ao epitélio, as papilas dérmicas (Lavker & Gedeon Matoltsy, 1970).

2.2 Efeito da dieta na morfologia das papilas ruminais

Desde as primeiras pesquisas sobre desenvolvimento estrutural do estômago de ruminantes, foi possível observar a importância da dieta em promover respostas morfológicas no órgão. Brownlee (1956) pesquisou o

desenvolvimento papilar no rúmen de bezerros alimentados com várias dietas e sugeriu que este não era um evento pré-determinado. O valor energético da dieta ou a rapidez com que os alimentos eram degradados em frações absorvíveis eram responsáveis pelo crescimento das papilas do rúmen segundo suas observações. Flatt (1955), Flatt et al. (1958) e Warner et al. (1959) sugeriram que o desenvolvimento do tecido do pró-ventrículo, particularmente o desenvolvimento papilar, ocorria em resposta aos estímulos químicos dos produtos finais da fermentação. Flatt et al. (1958) obtiveram sucesso em promover desenvolvimento papilar em uma área limitada do rúmen de bezerros que receberam infusão de AGV no rúmen por um período de 12 semanas. Em estudos posteriores, Sander et al. (1959) conseguiram estimular o desenvolvimento papilar em uma área mais extensa da mucosa ruminal fazendo infusões de sais de propionato e butirato no rúmen.

Tamate et al. (1962) estudaram o efeito de várias dietas sobre o desenvolvimento morfológico do estômago de bezerros. Para isto utilizaram 27 bezerros, que distribuíram em 3 grupos diferentes. No grupo A, os bezerros receberam somente leite. No grupo B, a dieta consistiu de leite acrescido de feno e ração inicial *ad libitum*. O grupo C recebeu leite e infusões de AGV diretamente no rúmen. Os abates ocorreram em várias etapas e, nesta ocasião, amostras da mucosa ruminal foram coletadas do saco ventral do rúmen e do saco cranial. Foram determinados os comprimentos máximo e médio das papilas ruminais e o número de papilas por centímetro quadrado de mucosa. Os autores encontraram, em bezerros de 0 (zero) a 3 dias de vida, papilas razoavelmente desenvolvidas, que sugeriram ser resposta aos AGV oriundos do sangue materno via placenta. Bezerros alimentados somente com leite apresentaram papilas involuídas. Bezerros que tiveram infusões de leite diretamente no rúmen apresentaram algum desenvolvimento papilar. Maior desenvolvimento de papilas foi observado na mucosa dos animais que receberam infusões de AGV.

No grupo em que foi encontrado maior desenvolvimento papilar ocorreu também um menor número de papilas por centímetro quadrado, ocasionado, segundo os autores, provavelmente pela fusão de papilas para formar outras maiores.

Schnorr & Vollmerhaus (1968) fizeram ampla descrição morfológica das papilas ruminais. Descreveram as várias formas de papilas que podem ser encontradas nas diferentes regiões do rúmen de animais adultos. Citaram formas como “verruga”, “achatada”, “língua”, “bastão”, “lança” e “folha”. Os autores citaram que os motivos da existência de vários tipos morfológicos de papilas não eram conhecidos. Os mesmos autores, Schnorr & Vollmerhaus (1968), fizeram estudo macroscópico da arquitetura vascular do rúmen e uma descrição detalhada da ultraestrutura dos capilares sanguíneos no interior da papila ruminal. Neste estudo, apesar de não quantificada, foi citada a importância da microcirculação no metabolismo da mucosa ruminal, por receberem os produtos absorvidos e metabolizados pelo epitélio ruminal.

McGavin & Morril (1976) utilizaram bezerros neonatos para estudar os efeitos da forma do alimento e quantidade oferecida sobre a morfologia papilar, em um período experimental de até 6 semanas. As diferenças entre os grupos foram evidentes com 6 semanas. Com 4 semanas foram similares, porém em menor grau. Modificações na dieta alteraram pouco o formato de papila na região do saco cranial do rúmen. As outras regiões mostraram-se mais susceptíveis à apresentação de diferentes tipos morfológicos de papila.

Apesar das evidências de que a composição e a forma da dieta eram fundamentais no desenvolvimento morfológico da papila ruminal e de que infusões de AGV foram eficientes em promover desenvolvimento papilar, pouco se sabia sobre os efeitos da dieta no epitélio ruminal. Bullough (1972) correlacionou tamanho papilar e proliferação do epitélio ruminal.

Investigando o efeito da frequência alimentar sobre o epitélio da papila ruminal, Sakata & Tamate (1974) alimentaram dois carneiros com dietas contendo a mesma relação forragem: concentrado, em duas frequências diárias. O índice mitótico (IM) do epitélio ruminal foi estimado dividindo-se o número de núcleos de células basais mostrando figuras mitóticas, pelo número total de núcleos das células basais contados. O IM foi significativamente maior nas amostras oriundas do carneiro alimentado intermitentemente do que no carneiro que vinha sendo alimentado de forma regular.

Em outro experimento, Tamate et al. (1974) trabalharam com um carneiro adulto com fistula ruminal. Os autores observaram que a baixa frequência alimentar foi mais eficiente em promover a proliferação do epitélio ruminal em detrimento da frequência aumentada. Especulou-se que a causa deste resultado foi a variação brusca da taxa de produção intraruminal de AGV. Durante o jejum a produção de AGV diminuiu, e com a realimentação, ocorreu um aumento súbito na produção destes. Em contrapartida, a produção contínua, resultante da alimentação frequente, não foi igualmente capaz de estimular a proliferação do epitélio.

Buscando avaliar o comportamento do epitélio ruminal em carneiros recebendo infusões de AGV, Sakata & Tamate (1976) submeteram dois carneiros machos adultos a um experimento com 3 ensaios. No período experimental, os animais ficaram em jejum com água e minerais *ad libitum*. Um carneiro recebeu solução de butirato de sódio através de fistula ruminal. O outro carneiro foi utilizado como controle, recebendo apenas solução salina intraruminal. O butirato de sódio estimulou o índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen em todos os ensaios. Em nenhum dos ensaios houve estimulação do índice mitótico papilar do carneiro utilizado como controle.

Em outro experimento, Sakata & Tamate (1978 b) trabalharam com 4 carneiros fistulados no rúmen em quatro ensaios diferentes. Em cada um dos ensaios, os animais foram submetidos a um período pré experimental de pelo menos 2 semanas, no qual os animais foram alimentados, para suprir a manutenção, com feno e concentrado fornecidos 1 vez ao dia, e a um período experimental no qual os animais receberam apenas água e minerais. Os animais receberam infusões intraruminais de solução aquosa de butirato de sódio a 10% e de solução salina a 0,9%. A velocidade de administração das soluções variou de rápida (10 segundos) a lenta. Papilas ruminais foram coletadas por biópsia antes de cada infusão e 24 horas após a última infusão da série. Infusões rápidas de butirato promoveram um aumento significativo no índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen a partir do primeiro dia após o início das infusões em todos os ensaios. O índice mitótico manteve-se alto até o quinto dia após as infusões, voltando a valores similares ao inicial no sexto dia do ensaio com infusões rápidas de butirato. Os autores concluíram que, uma vez atingida a massa epitelial necessária para absorver e metabolizar AGV ruminal em maior volume, a taxa de divisão celular retorna a valores iniciais, apenas para manter a renovação celular normal. Infusões lentas de butirato de sódio não estimularam o aumento do índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen em nenhum dos ensaios. Além dos resultados observados no índice mitótico, as preparações histológicas também demonstraram que as cumhas epiteliais do rúmen desenvolveram-se marcadamente nos carneiros que receberam infusões rápidas de butirato, sugerindo que o aumento no índice mitótico levou ao aumento do número de células do epitélio (Sakata & Tamate, 1978 b).

Os achados eram conclusivos quanto ao potencial do aumento súbito de butirato em promover a proliferação do epitélio. Entretanto ainda não havia sido determinado se propionato e acetato também eram capazes de induzir proliferação do epitélio da papila ruminal. Sakata & Tamate (1979) delinearão

um experimento com 4 carneiros adultos; fizeram infusões intraruminais com butirato, propionato e acetato e avaliaram o efeito de cada ácido no epitélio ruminal, após biópsias de papilas realizadas antes e após as infusões. Os autores concluíram que butirato é mais eficiente em estimular proliferação do epitélio, seguido por propionato e por último, por acetato.

Desde o momento em que pesquisadores iniciaram a investigação do epitélio ruminal em resposta a mudanças no plano alimentar ou após infusões intraruminais de AGV, pôde-se perceber o efetivo papel que os picos de AGV exerciam no rúmen quanto à proliferação do epitélio. Entretanto, pouco se sabia sobre o efeito depressor da falta de AGV sobre o epitélio ruminal. Tamate & Fell (1978) trabalhando com 2 carneiros adultos fistulados no rúmen, coletaram papilas por biópsia durante um período em que os animais recebiam alimento e após um período de redução alimentar, constituído de fornecimento de feno em quantidade restrita. Os autores observaram que, no período de restrição alimentar, células isoladas morreram (apoptose celular) e encontraram fragmentações por perda celular espontânea intensa, particularmente na região das cunhas epiteliais. Células necróticas isoladas, fagocitose por células de Langerhans e por células epiteliais basais apareceram um dia após a mudança da dieta de concentrado para feno em quantidade restrita e foram encontradas com maior frequência nas últimas amostras de biópsia. Este experimento mostrou que a resposta celular a um menor nível alimentar é rápida no epitélio ruminal.

Após vários estudos sobre proliferação celular no epitélio ruminal em resposta a picos de AGV no rúmen, pesquisadores voltaram a correlacionar proliferação celular e crescimento das papilas do rúmen. Goodlad (1981) delineou um experimento em que carneiros recebiam uma de três dietas formuladas para resultar em diferentes proporções de AGV no rúmen. Houve hipertrofia das papilas ruminais, quando os carneiros foram alimentados com dieta à base de grãos, detectada tanto macroscópica quanto histologicamente.

Foram detectados, também, sinais de paraqueratose (diferenciação precoce de células para a camada córnea) e hiperqueratose (espessamento da camada córnea devido a pouca esfoliação), mas a mudança observada mais marcante foi o crescimento e a ramificação das papilas. As mudanças no epitélio foram acompanhadas por extensão da lâmina própria. O autor concluiu que o aumento no índice mitótico provavelmente está associado ao aumento no tamanho e à modificação da morfologia papilar. Quando a dieta foi modificada para forragem, houve queda acentuada no índice mitótico da camada basal do epitélio das papilas do rúmen.

Muitos delineamentos experimentais permitiam pesquisar efeitos da dieta sobre o epitélio ruminal *in vivo*. Considerando que um sistema *in vitro* poderia ser de grande aplicabilidade nas pesquisas sobre metabolismo do epitélio ruminal por fornecer um sistema homogêneo e com condições controladas, Baldwin & Jesse (1991) coletaram papilas do saco ventral de carneiros entre 12 e 24 semanas de vida, avaliaram a capacidade metabólica do epitélio pela conversão de butirato em β -hidroxibutirato e observaram que células oriundas da camada córnea mostraram baixa capacidade metabólica ($5,37 \pm 0,72$ nmol/120min/mg de células). Frações celulares obtidas das últimas séries de digestão por tripsina apresentaram células da camada basal, as quais se mostraram altamente viáveis (75 a 95%) e com grande capacidade de converter butirato em β -hidroxibutirato ($33,6 \pm 6,7$ nmol/120min/mg de células). Os pesquisadores presumiram que a capacidade metabólica das células do estrato córneo é relativamente baixa pela presença de grandes quantidades de fibras de queratina, com concomitante redução das demais organelas celulares.

Para avaliar o efeito da administração contínua de AGV no epitélio ruminal de carneiros recém-nascidos, visto que isto havia sido testado apenas em carneiros adultos, Lane & Jesse (1997) implantaram catéteres cirurgicamente no rúmen de carneiros neonatos. Os autores infundiram AGV (acetato, propionato e

butirato) ou solução salina continuamente à taxa de 1ml por minuto. Mantiveram também um grupo que não recebeu infusão. Carneiros infundidos com AGV tenderam, segundo comentários dos autores, a ter papilas mais longas do que aqueles infundidos com solução salina ou não infundidos ($P=0,23$).

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

Beharka et al. (1998) estudaram o efeito da forma física da dieta sobre o desenvolvimento morfológico do rúmen. Os autores relataram que visualmente não observaram diferenças óbvias na forma, distribuição e comprimento das papilas ruminais entre as dietas. Entretanto o exame microscópico mostrou que papilas oriundas do saco cranial do rúmen apresentaram menos alterações de forma e comprimento como resposta à dieta do que aquelas oriundas de outras regiões do rúmen. Os autores especularam que este resultado ocorreu, provavelmente, porque na região do saco cranial as partículas do alimento tendem a flutuar, promovendo um estímulo físico menor na mucosa ruminal.

Resende Júnior (1999), em um experimento feito com vacas secas e não gestantes, estudou o efeito da frequência alimentar sobre o desenvolvimento morfológico da papila ruminal. O autor observou que o fornecimento de alimento 1 vez por dia foi mais eficiente em estimular o índice mitótico da camada basal do epitélio ruminal do que o seu fornecimento 4 vezes ao dia. O autor explicou que isto provavelmente ocorreu porque o fornecimento contínuo ao longo do dia não induziu a formação de picos de AGV, deixando de estimular

o desenvolvimento do epitélio. Entretanto o autor não observou diferenças macroscópicas na morfologia papilar entre os tratamentos.

2.3 Papilas ruminais e capacidade de absorção de AGV

Logo nas primeiras pesquisas sobre desenvolvimento papilar em resposta a mudanças no plano alimentar foi possível observar que o maior tamanho de papilas estava correlacionado com a maior capacidade de absorção de AGV pelo rúmen. Sutton et al. (1963) forneceram leite, feno e concentrado para um grupo de bezerros holandeses e apenas leite para outro grupo. Animais alimentados com leite, feno e concentrado tiveram bom desenvolvimento papilar já na quarta semana de vida, e com 13 semanas apresentaram mucosa semelhante a de um ruminante adulto. Comparativamente, animais que receberam somente leite não desenvolveram papilas de forma significativa. A capacidade de absorção do rúmen pela taxa fracional de absorção de ácido acético foi mensurada. No grupo alimentado com dieta concentrada, a absorção aumentou significativamente durante as 13 semanas, mas não mudou naqueles animais alimentados somente com leite.

Dirksen et al. (1985) avaliaram a relação entre crescimento das papilas do rúmen e capacidade de absorção de AGV em vacas leiteiras. Trabalhando com 2 novilhas holandesas, alteraram a composição energética da dieta em 3 períodos experimentais de 7 a 14 dias cada. O período de dieta rica em energia foi caracterizado por papilas ruminais aumentadas e por capacidade de absorção de ácidos acético, butírico e propiônico 5 vezes mais rápida e em uma quantidade 3 vezes maior que aquela observada nos períodos de restrição alimentar. Em outro ensaio, utilizando vacas holandesas no período peri-parto, os autores reduziram o aporte energético da dieta abruptamente no início do período seco. Duas semanas antes do parto alteraram para uma dieta lactacional

rica em energia. Biópsias da mucosa ruminal em 6 ocasiões, em intervalos de uma a duas semanas a partir de 8 a 9 semanas antes do parto até 8 semanas pós parto, foram efetuadas. As amostras foram avaliadas morfometricamente por microscopia óptica e eletrônica. Nas amostras coletadas no período seco, com dieta pobre em energia, foi observada a redução progressiva da mucosa ruminal. A introdução da dieta rica em energia, 14 dias antes do parto, promoveu intenso desenvolvimento da mucosa ruminal que atingiu o tamanho máximo 4 a 5 semanas após o parto.

Gaebel et al. (1987) pesquisaram o efeito do pH no ambiente ruminal sobre a absorção de íons (Na^+ , Cl^- , Mg^{++}) e água, pelo epitélio do rúmen. Os autores observaram que a redução do pH de 6,78 para 4,79 reduziu a capacidade de absorção do epitélio ruminal. Os mecanismos exatos não foram citados mas os autores aventaram a hipótese de que o baixo pH tenha afetado o metabolismo das células epiteliais, reduzindo a capacidade de absorção.

Procurando entender o efeito do jejum na involução do epitélio ruminal, Gaebel et al. (1993) utilizaram 6 carneiros com fistulas ruminais. Forneceram feno *ad libitum* e concentrado aos animais e depois os deixaram em jejum por dois dias. O jejum não afetou a área superficial das papilas mas diminuiu a capacidade de absorção de minerais e AGV pela mucosa ruminal. Estes dados podem implicar que a capacidade de absorção da parede ruminal não é correlacionada à morfologia papilar, contrariamente a outros relatos da literatura (Dirksen et al, 1985; Sutton et al, 1963). No entanto, outro tipo de inferência seria a de que a medida morfológica utilizada, área superficial das papilas, não foi sensível à mudança induzida experimentalmente na capacidade de absorção.

De forma geral, os dados encontrados na literatura apontam que nem sempre a morfologia papilar estaria relacionada à capacidade de absorção de AGV pela parede ruminal. Um aprimoramento nas técnicas de medição da

capacidade de absorção e/ou nas técnicas de mensuração morfológica poderiam contribuir neste sentido.

2.4 Ciclo celular no epitélio ruminal

A massa de células do epitélio ruminal é determinada pela fração de células que está no ciclo de renovação celular e também pela duração das fases do ciclo. Células são naturalmente substituídas por outras idênticas, por um processo de divisão celular denominado mitose. A mitose constitui a fase mais breve do ciclo celular, enquanto a intérfase, período em que a célula encontra-se em processo metabólico intenso, constitui a fase mais longa. A intérfase pode ser subdividida em períodos G1, S e G2. O período G1 é o intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA, conhecido também como período de pré-duplicação do DNA. O período S compreende o processo de síntese de DNA para a formação de células filhas idênticas. O período G2, conhecido também como período de pós-duplicação do DNA, ocorre entre o final do processo de síntese de DNA e o início da mitose. Tanto o período G1 como o período G2 propiciam um tempo adicional para o crescimento celular. Após a intérfase, já com o DNA duplicado, a célula inicia o processo de divisão celular. A mitose é subdividida em 5 fases: Prófase, Prometáfase, Metáfase, Anáfase e Telófase (Alberts, et al. 1994). O número de células no epitélio também depende do tempo necessário para a migração das células filhas, desde o seu surgimento na camada basal, até a descamação na superfície luminal. Se as taxas de divisão e diferenciação celular estão em distúrbio, condições patológicas como hiperqueratose, paraqueratose e ruminites podem ocorrer (Elam, 1976).

O índice mitótico tem sido usado com frequência para expressar a atividade proliferativa do epitélio ruminal (Sakata & Tamate, 1974; Tamate et al., 1974; Sakata & Tamate, 1978 a; Tamate & Fell, 1978; Sakata & Tamate,

1979; Sakata et al., 1980; Goodlad, 1981; Gálfi et al., 1986; Resende Júnior, 1999). Foi demonstrado que, em animais de laboratório, o epitélio gastrointestinal geralmente mostra um ritmo circadiano do índice mitótico (Bullough, 1948; Wolfsberg, 1964; Chang, 1971; Scheving et al., 1972 – citados por Sakata & Tamate, 1978a).

Para investigar a existência de um ritmo circadiano no epitélio ruminal de carneiros, Sakata & Tamate (1978a) realizaram um experimento com dois ensaios. No ensaio 1, utilizaram dois carneiros adultos, que receberam alimento uma vez ao dia, às 11:00 h, com 350 g de concentrado e 500 g de feno. Papilas foram coletadas por biópsia do recesso do rúmen de 4 em 4 horas (00:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 e 20:00) durante 5 dias. O índice mitótico do epitélio ruminal foi relativamente baixo pela manhã e tornou-se alto à tarde e à noite. No segundo ensaio, utilizaram outros dois carneiros adultos alimentados com 300 g de concentrado e 500 g de feno às 07:00 h. Executaram-se biópsias às 08:00 e 20:00 h no primeiro dia, às 12:00 e 24:00 no segundo dia e às 04:00 e 16:00 h no terceiro dia. O índice mitótico foi razoavelmente baixo às 08:00 h, 1 hora após a alimentação, e aumentou às 12:00 h, 5 horas após a alimentação, permanecendo relativamente alto até às 04:00 h. No ensaio 1, o pico do índice mitótico aconteceu 5 horas após a alimentação e permaneceu até 13 horas após. Existiu nos dois ensaios, um ritmo circadiano influenciado pela alimentação. O aumento no índice mitótico foi percebido a partir de 5 horas após a alimentação nos dois ensaios, aparentemente coincidindo com o período de maior fermentação de digesta no rúmen e acúmulo de AGV (Pereira, 1997).

Goodlad (1981) alimentou 2 carneiros com forragem por um período, seguido de outro período de alimentação exclusivamente com concentrado por vários meses. O autor injetou [³H]timidina nos animais como marcador de pares de bases do DNA, visando obter uma determinação quantitativa da divisão celular no epitélio ruminal. O marcador foi injetado no período em que os

animais recebiam apenas forragem, na transição de forragem para concentrado e após vários meses com dieta exclusiva de concentrado. O índice mitótico na transição da dieta de forragem para concentrado atingiu, aos 5 e 6 dias após início da mudança, aproximadamente o dobro do detectado na dieta de forragem. Este foi seguido por um agudo declínio, atingindo, no oitavo dia, valores próximos aos observados inicialmente. A técnica permitiu ao pesquisador estimar a duração do ciclo celular da camada basal, o qual foi 23,1 horas na dieta de forragem, diminuindo para 17,0 horas na transição de forragem para concentrados. Após vários meses ingerindo concentrado, o ciclo celular da camada basal do epitélio ruminal foi de 24,4 horas. O tempo de renovação da camada basal na dieta de forragem foi de 7,5 dias, baixando para 1,9 dia durante a transição para concentrados. Após vários meses com concentrado, o tempo estimado de renovação da camada basal foi de 4,1 dias. A estimativa de renovação do epitélio inteiro foi de 16,5 dias na dieta de forragem, 4,3 dias na transição de forragem para concentrados e 10,9 dias após vários meses comendo concentrado. A taxa de proliferação celular da camada basal do epitélio foi também calculada. Na dieta de forragem, a camada basal proliferou 9% . Na transição de forragem para concentrado, esta taxa foi de 32,7%, e após vários meses de concentrado, a proliferação foi de 17,3%. Estes dados indicam que o efeito agudo de introdução de concentrado estimula mais a proliferação celular do que o efeito crônico. O autor inferiu que isto provavelmente acontece porque, na transição de forragem para concentrado, uma massa celular bem maior deve ser atingida para possibilitar absorção e metabolização eficiente dos AGV. Uma vez atingida esta massa celular, a proliferação epitelial cai a uma taxa capaz de possibilitar a reposição de células metabolicamente ativas perdidas por diferenciação e descamação.

Bullough (1972) e Tamate & Fell (1978) definiram a espessura do epitélio ruminal como sendo a massa de células epiteliais determinada pela taxa

mitótica e pela taxa de deleção celular ou apoptose. Entretanto estes autores não quantificaram a real importância da deleção celular na regulação do tamanho do tecido.

Apoptose é um evento relacionado com a homeostase na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose (Gerschenson & Rotello, 1992). Este mecanismo consiste em um dos tipos de morte celular, induzida ou antecipada por estímulos fisiológicos, permitindo a remoção de células alteradas por fatores externos. A apoptose difere da necrose, que se trata da morte celular acidental ou patológica. Morfologicamente, na necrose, há tumefação celular, que promove a lise da célula por perda da integridade da membrana. Ocorre também a liberação de enzimas lisossômicas, o extravasamento de conteúdo celular e a inflamação ao redor da célula morta (Gerschenson & Rotello, 1992; Kerr, 1993), eventos que não ocorrem na apoptose.

A descrição morfológica da célula em apoptose foi feita pela primeira vez na década de 1970. Células apoptóticas são identificadas morfológicamente pela retração do citoplasma e condensação da cromatina nuclear. Em uma fase seguinte, núcleo e citoplasma fragmentam-se em muitos corpos apoptóticos, com ou sem fragmentos nucleares, os quais são rapidamente fagocitados por células vizinhas ou por macrófagos (Kerr et al., 1972). Amarante-Mendes & Green (1999) definem apoptose como sendo um fenômeno biológico em que a morte celular é regulada por mecanismos genéticos e bioquímicos. Uma vasta gama de morte celular que ocorre durante a vida de um organismo envolve apoptose. Amarante-Mendes & Green (1999) salientam que apoptose, apesar de ocorrer frequentemente, é um evento visualizado raramente *in situ*. Os autores explicam que o reconhecimento e degradação de células apoptóticas pelas células vizinhas são eventos que ocorrem muito rapidamente, tornando difícil detectar morfológicamente corpos apoptóticos *in situ*. Segundo os autores esta

rápida eliminação é importante para prevenir a ocorrência de processos inflamatórios que poderiam ser facilmente identificados tanto macro como microscopicamente.

O exato mecanismo de indução da apoptose ainda é desconhecido. McConkey et al. (1990) relataram que o estímulo apoptótico seria responsável por ativar a expressão de “genes letais” que iriam induzir a síntese e ativação de uma endonuclease Ca^{++} e Mg^{++} dependente e de uma transglutaminase. À endonuclease é atribuída a fragmentação internucleossômica do DNA. A transglutaminase estaria relacionada com o aumento das ligações cruzadas das proteínas celulares, o que aumentaria a estabilidade da membrana plasmática, limitando desta forma o vazamento de constituintes citoplasmáticos durante a fragmentação celular em corpos apoptóticos.

Bursch et al. (1990) citam que o fenômeno da apoptose se completa em aproximadamente 3 horas, não sendo sincronizado em todo o órgão. Portanto, diferentes estágios de apoptose coexistem em diversas secções dos tecidos. Os autores relatam que devido à rápida taxa de deleção celular é necessário que apenas 2 a 3 % das células estejam em apoptose em determinado momento para que se obtenha uma regressão substancial de tecido. Em tais circunstâncias a regressão tecidual pode atingir a proporção de 25 % por dia.

Não se sabe qual a melhor maneira de avaliação da morfologia papilar em resposta a mudanças no plano alimentar. Marcadores morfológicos com resposta rápida aos tratamentos e que fossem correlacionados com maior capacidade de absorção pelo rúmen seriam de grande valia pela possibilidade de diminuição do tempo de duração dos experimentos. Vacas no período anterior ao parto apresentam depressão do consumo de alimentos, o que ocasiona a involução das papilas ruminais. A compreensão dos mecanismos que promovem a involução do epitélio ruminal em resposta ao jejum é importante em pesquisas sobre formulação de dietas para vacas no período de transição.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Locais de realização dos trabalhos

Os procedimentos envolvendo animais foram executados anteriormente por outros autores. Foram realizados 2 experimentos, sendo o experimento 1 com papilas ruminais de bovinos (Resende Júnior, 1999) e o experimento 2 com papilas ruminais de ovinos. A leitura das lâminas para coleta dos dados utilizados neste trabalho foi realizada no Laboratório de Morfologia Microscópica do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

3.2 - Experimento 1

As lâminas histológicas utilizadas foram preparadas por Resende Júnior (1999). Na ocasião do experimento o autor utilizou sete vacas das raças Jersey (4) e Holandesa (3), não lactantes e não gestantes, com cânulas ruminais implantadas cirurgicamente no saco dorsal do rúmen. Os animais foram abrigados e alimentados individualmente em baias com cama de areia. Após um período de padronização de sete dias, iniciou-se o período de comparação, com 19 dias de duração. Durante este período os animais consumiram uma dieta composta por concentrado, em quantidade equivalente a 0,5% do peso corporal, e feno de Coastcross *ad libitum*. Os animais dentro de cada raça foram aleatoriamente alocados a um de dois tratamentos:

T1 = A quantidade diária de concentrado foi fornecida apenas 1 vez ao dia, às 06:00 horas. O intuito deste tratamento foi induzir um pico de AGV no rúmen

desencadeando aumento nas concentrações plasmáticas de insulina capaz de induzir resposta morfológica no epitélio (Sakata et al., 1980)

T4 = A quantidade diária de concentrado foi parcelada em 4 vezes ao dia, às 06:00, 12:00, 18:00 e 24:00 horas.

Após o período de comparação, seguiu-se um período de jejum de 72 horas, em que os animais receberam apenas água *ad libitum*. O objetivo do jejum foi induzir resposta morfológica aguda no epitélio ruminal. Doze papilas ruminais foram obtidas por biópsia nos seguintes momentos: último dia do período de padronização; quarto dia do período de comparação; décimo segundo dia do período de comparação; décimo nono dia do período de comparação; vinte e quatro horas de jejum; quarenta e oito horas de jejum; setenta e duas horas de jejum (Resende Júnior, 1999)

3.3 - Experimento 2

Foram utilizados 6 ovinos com fistula ruminal divididos em 2 ensaios com 3 animais cada. No primeiro ensaio os animais foram alimentados com milho em grão suprimindo a manutenção e silagem de alfafa *ad libitum* por 21 dias seguido por jejum de 72 horas. No segundo trabalho 3 ovinos foram alimentados *ad libitum* com dieta completa contendo 48% de alfafa e 52% de milho durante 21 dias e também submetidos a 72 horas de jejum. O objetivo do jejum foi, assim como no experimento 1, induzir resposta morfológica aguda no epitélio ruminal.

As papilas ruminais foram coletadas por biópsia no saco cranial do rúmen (*Atrium ruminis*) no dia 21 do período de alimentação e no final das 72 horas de jejum. O processamento histológico das papilas do experimento 1 e 2 foi realizado utilizando-se a técnica de coloração com hematoxilina-eosina (Resende Júnior, 1999).

3.4 - Avaliações morfológicas

3.4.1 - Índice mitótico

O IM das lâminas do experimento 1 foi determinado por Resende Júnior (1999). Para as lâminas referentes ao experimento 2 a determinação do índice mitótico foi feita em microscópio óptico (Ken-A-Vision). Os núcleos das células da camada basal do epitélio foram contados em todas as regiões em que esta podia ser bem delimitada. Para esta contagem foi utilizado um aumento de 400 vezes. Todas as células com núcleo apresentando figuras de mitose foram contabilizadas. O percentual do IM foi calculado dividindo-se o número de células apresentando figuras mitóticas pelo número total de núcleos contados. Três avaliadores independentes executaram a contagem de células em cada papila e o número médio das três avaliações foi utilizado como resultado.

3.4.2 - Índice apoptótico

Para os dois experimentos realizados foi determinado o IA. À semelhança dos procedimentos para determinação do IM, também foram contadas as células na camada basal do epitélio em todas as regiões em que esta podia ser bem delimitada, utilizando-se um aumento de 400 X. Todas as células apresentando figuras de apoptose foram contabilizadas. Dividiu-se o número de células em apoptose pelo número total de células contadas. No experimento 1, dois avaliadores independentes realizaram a contagem das células. No experimento 2, a contagem das células foi realizada por 3 avaliadores independentes. O IM e o IA foram contados nas mesmas lâminas, mas não simultaneamente.

3.4.3 - Mensurações microscópicas

Cada papila foi mensurada com uma lente ocular micrométrica, com graduação de 0 a 10 unidades, em microscópio óptico (Ken-A-Vision), com aumento de 100X. Os parâmetros observados foram: largura da papila, largura do tecido conjuntivo, número de cunhas epiteliais e número de papilas dérmicas. Para determinar a largura das papilas e a largura do tecido conjuntivo, foi padronizado o ápice da papila como o ponto de referência inicial. A partir do ápice da papila, marcou-se 5 μm em direção à base da papila, e neste ponto foi, então, determinada a primeira medida para a largura da papila e para a largura do tecido conjuntivo. A segunda medida foi determinada a 5 μm da primeira, isto é, na região da papila distante 10 μm do ápice (Figura 1). Utilizando as medidas obtidas nestes 2 pontos de referência, foi estipulada a média entre as duas medidas e determinados, então, os valores de largura da papila e largura do tecido conjuntivo (Figura 2) em cada papila. Para a determinação do número de cunhas epiteliais e papilas dérmicas (Figura 2) foi padronizado o intervalo entre 5 e 15 μm com relação ao ápice da papila. Neste intervalo, em ambos os lados do tecido conjuntivo, foram contados o número de cunhas epiteliais e o número de papilas dérmicas. Foi efetuada a média tomando-se o número total de cunhas epiteliais e o número total de papilas dérmicas nos dois lados do tecido conjuntivo. Para cada parâmetro, os valores foram obtidos por dois avaliadores. O número médio entre as duas avaliações foi considerado como resultado.

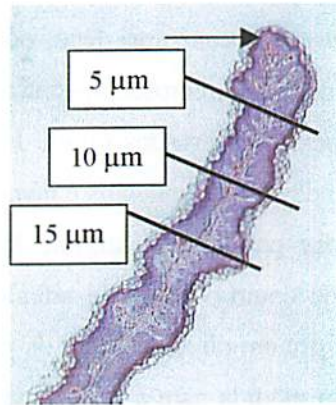


FIGURA 1: Papila do rúmen de carneiro (Experimento 2). A seta indica o ápice da papila. Os traços indicam os pontos de referência obtidos com o auxílio da lente ocular micrométrica. Nos pontos 5 μm e 10 μm , foram determinadas as larguras da papila e do tecido conjuntivo. Entre os pontos 5 e 15 μm foram contados os números de cunhas epiteliais e papilas dérmicas. Coloração: HE. Aumento: 320X.

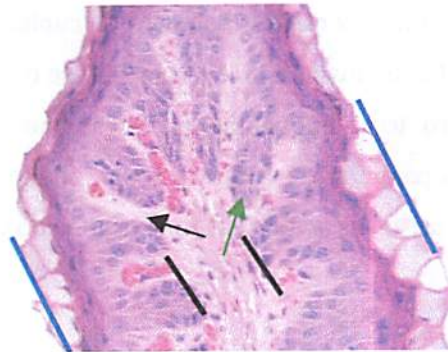


FIGURA 2: Papila de carneiro. A seta verde aponta para uma cunha epitelial. A seta preta aponta para uma papila dérmica. Entre os traços pretos observa-se a largura do tecido conjuntivo. Entre os traços azuis observa-se a largura da papila ruminal. Coloração: HE. Aumento: 630 X

3.5 - Análises estatísticas

3.5.1 - Experimento 1

As variáveis índice apoptótico, largura da papila, largura do tecido conjuntivo, número de cunhas epiteliais e número de papilas dérmicas, foram analisadas como medidas repetidas, pelo procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (Littel et al. 1996). Utilizou-se a estrutura de covariância com o maior valor para o critério de informação de Akaike. As estruturas de covariância testadas foram: simetria composta (Compound symmetric – CS), auto regressiva de ordem 1 (Auto regressive order one – AR 1) e não estruturada (Unstructures – UN).

O seguinte modelo foi adotado:

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

Sendo:

μ = média geral.

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

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

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

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

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

e_{ijk} = Resíduo.

O quadrado médio do efeito de vaca dentro de tratamento foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de tratamento.

3.5.2 - Experimento 2

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS, pelo seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + C(F)_i + F_j + T_k + e_{ijk}$$

μ = Média geral.

$C(F)_i$ = Efeito de carneiro dentro de fase ($i = 1$ a 6)

F_j = Efeito de fase ($j = 1$ ou 2)

T_k = Efeito de tratamento ($k =$ alimentado ou jejum).

e_{ijk} = Erro independente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 .

3.5.3 - Correlação entre mensuração macroscópica e mensuração microscópica

O objetivo desta análise foi determinar a correlação entre a mensuração macroscópica da largura, determinado por Resende Júnior (1999), e a mensuração microscópica. Para tal, foram utilizados os valores de largura da papila obtidos pelo referido autor e os valores de largura da papila obtidos pelo método de mensuração microscópica. Foi efetuada a média da largura da papila de cada grupo de 12 papilas, ou seja, todas as papilas coletadas de cada vaca em cada dia de coleta. Este procedimento foi efetuado para os valores de largura da papila obtidos pelos métodos de mensuração macroscópica e microscópica. A partir daí foi estimado o coeficiente de correlação entre as medidas nos dois métodos de avaliação.

3.5.4 - Correlação entre os avaliadores do índice apoptótico e do índice mitótico

Visando detectar a precisão das técnicas de determinação do índice apoptótico e de determinação do índice mitótico, foi estimado o índice de correlação entre os avaliadores. Para o experimento 1, os valores de índice apoptótico de cada um de dois avaliadores foram utilizados e o índice de correlação entre os valores estimado. O mesmo foi realizado para os valores de índice apoptótico e índice mitótico determinados por cada um de três avaliadores no experimento 2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento 1, dois avaliadores realizaram a contagem de células da camada basal do epitélio da papila ruminal. O avaliador 1 contou 1.170.100 células em 620 papilas do epitélio de bovinos. O avaliador 2 contou 1.101.553 células nas mesmas 620 papilas. No experimento 2 o número médio de células contadas pelos 3 avaliadores no epitélio de ovinos foi 160.462 para a determinação do IA e 188.061 para a determinação do IM. Para evitar erros na contagem de células em mitose e em apoptose as determinações de IA e IM não foram realizadas simultaneamente, justificando a diferença no número de células contadas em cada avaliação. Mesmo exigindo trabalho laboratorial intenso, as mensurações de IA e IM foram de precisão elevada. A correlação entre mensurações realizadas por avaliadores independentes no mesmo animal foram sempre superiores a 0,91 (Tabela 1).

TABELA 1. Correlações entre avaliadores para os índices apoptótico (Experimentos 1 e 2) e mitótico (Experimento 2). Correlações foram realizadas entre os valores de cada avaliador computados com todas as células contadas para cada vaca em cada dia de coleta no Experimento 1 (n=49) e para cada ovino antes e depois do jejum no Experimento 2 (n=12).

| Índice apoptótico (Experimento 1) | | |
|-----------------------------------|-------------|--|
| Avaliador 2 | Avaliador 1 | |
| | 0,91 | |

| Índice mitótico (Experimento 2) | | |
|---------------------------------|-------------|-------------|
| | Avaliador 1 | Avaliador 2 |
| Avaliador 2 | 0,98 | |
| Avaliador 3 | 0,99 | 0,98 |

| Índice apoptótico (Experimento 2) | | |
|-----------------------------------|-------------|-------------|
| | Avaliador 1 | Avaliador 2 |
| Avaliador 2 | 0,96 | |
| Avaliador 3 | 0,96 | 0,99 |

Tanto a alteração na frequência de alimentação concentrada em bovinos quanto jejum de 72 horas em ovinos não tiveram efeito significativo sobre o IA (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2: Mensurações microscópicas das papilas ruminais de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes por dia por 19 dias e posteriormente submetidas a jejum de 72 horas. As papilas foram coletadas por biópsia no saco cranial do rúmen, nos dias 4, 12 e 19 de aplicação dos tratamentos e após 24, 48 e 72 horas do jejum. Mensurações no dia 0 foram utilizadas como covariável no modelo de análise estatística. Doze papilas foram coletadas e mensuradas em cada animal, em cada dia de coleta. Experimento 1.

| | Frequência | | | P | | |
|---|------------|-------|------|------|------|------|
| | 1 | 4 | EPM | F | D | F*D |
| Índice apoptótico | 0,41 | 0,40 | 0,08 | 0,95 | 0,01 | 0,11 |
| Largura das papilas (μm) | 98,9 | 103,2 | 13,4 | 0,86 | 0,23 | 0,42 |
| Largura do conjuntivo (μm) | 69,5 | 78,0 | 10,5 | 0,65 | 0,17 | 0,34 |
| Número de cunhas epiteliais | 6,7 | 7,8 | 1,0 | 0,55 | 0,41 | 0,63 |
| Número de papilas dérmicas | 6,5 | 7,1 | 1,0 | 0,75 | 0,39 | 0,60 |

EPM=Erro padrão da média

F=Efeito da frequência de alimentação concentrada . D=Efeito do dia de coleta.

F*D=Interação entre F e D.

TABELA 3: Mensurações microscópicas e índices mitótico e apoptótico (% dos núcleos da camada basal do epitélio) das papilas ruminais de ovinos alimentados (A) e após 72 horas de jejum (J). As papilas foram coletadas por biópsia no saco cranial do rúmen. Experimento 2.

| | A | J | EPM | P |
|---|------|------|------|-------|
| Índice mitótico | 0,73 | 0,48 | 0,04 | <0,01 |
| Índice apoptótico | 0,29 | 0,33 | 0,02 | 0,29 |
| Largura das papilas (μm) | 27,7 | 32,3 | 2,4 | 0,23 |
| Largura do conjuntivo (μm) | 7,6 | 11,7 | 2,3 | 0,26 |
| Número de cunhas epiteliais | 20,0 | 22,9 | 1,2 | 0,14 |
| Número de papilas dérmicas | 19,6 | 22,5 | 1,1 | 0,13 |

EPM=Erro padrão da média

Tamate & Fell (1978) relataram que após indução de jejum houve aumento aparente na quantidade de células em apoptose na camada basal do epitélio de ovinos. Estes autores, no entanto, não mensuraram o IA. Os dados aqui coletados não suportam a utilização do IA, mensurado em lâminas coradas com hematoxilina-eosina, como variável de resposta morfológica do epitélio ruminal a mudança no plano alimentar. É possível que a técnica de coloração utilizada tenha prejudicado a identificação das células em apoptose, mascarando possíveis diferenças entre tratamentos. Como o processo de apoptose é rápido e com diferentes estágios coexistindo em um mesmo tecido (Bursch et al., 1990), a contagem de células apoptóticas coradas por hematoxilina-eosina pode não representar o total de células em apoptose no tecido. Vale também ressaltar que apenas 2 a 3% de células em apoptose podem corresponder a cerca de 25% de regressão tecidual por dia (Bursch et al., 1990), enfatizando a natureza aguda e proporcionalmente pouco representativa da população celular do processo de apoptose. Corantes específicos para ácidos nucléicos (Behmer et al., 1976)

podem ser mais efetivos na detecção das fases de apoptose celular. Sua utilização poderia melhorar a acurácia do IA como variável de resposta morfológica do epitélio ruminal a mudanças nutricionais.

O local escolhido para contagem de figuras apoptóticas também pode ter interferido nos resultados. Neste trabalho, procuramos quantificar células apoptóticas na camada basal do epitélio, local em que se encontram células com alta atividade metabólica (Baldwin & Jesse, 1991). Bursch et al. (1990) relatam que os diferentes estádios apoptóticos coexistem em partes distintas de tecidos animais. A contagem de células apoptóticas em outros locais do epitélio ruminal poderia aumentar a eficácia na mensuração desta variável, comparativamente à contagem única na camada basal.

Houve tendência de interação significativa ($P=0,11$) entre dia de coleta e tratamento no índice apoptótico no experimento 1 (Figura 1). Vacas consumindo concentrado uma vez por dia tiveram ligeira elevação do IA entre o 4^o e o 12^o dia de coleta. No mesmo intervalo de tempo houve redução do IA do epitélio ruminal de vacas consumindo concentrado 4 vezes por dia. Uma possível explicação seria de que o consumo de concentrado uma vez por dia estimula a formação de picos de AGV no fluido ruminal. Considerando evidências de que o butirato induz apoptose (Ramos et al, 2002), pode-se explicar a interação observada a partir do 12^o dia de condução do experimento.

Outra análise estatística foi feita com os dados do experimento 1, utilizando para tal o mesmo modelo estatístico adotado para a análise dos dados oriundos do experimento com ovinos. Foram considerados os dados referentes ao 19^o dia do período de alimentação (IA = 0,31%) e os dados obtidos após as 72 horas de jejum (IA = 0,42%), sendo o erro padrão da média igual a 0,04. O intuito desta análise foi comparar o IA obtido no período de fornecimento de alimento com o IA obtido durante o período de jejum. O efeito de dia tendeu a ser significativo ($P = 0,07$), sugerindo que o jejum poderia estar relacionado à maior

ocorrência de apoptose no epitélio ruminal.

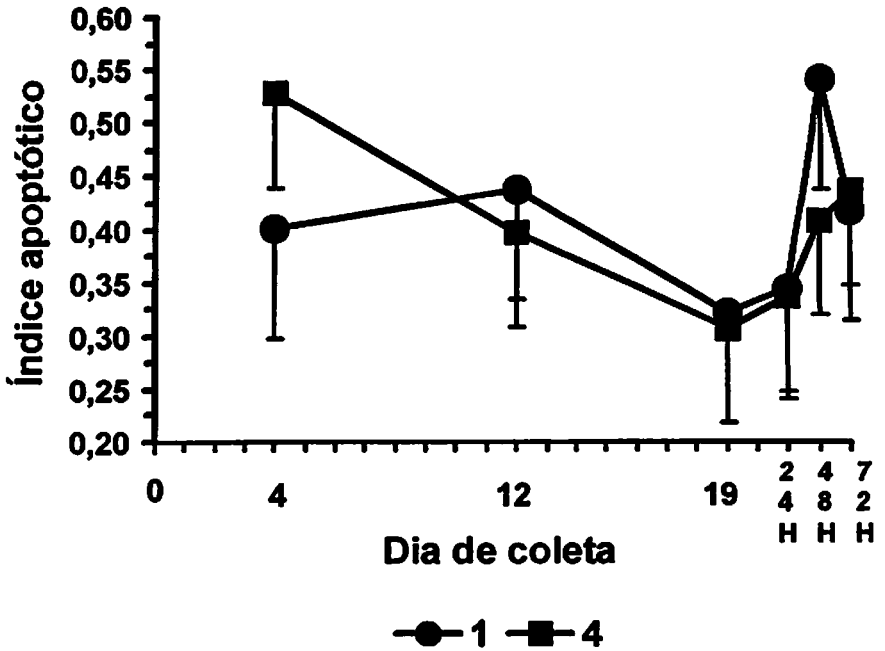


FIGURA 1: Índice apoptótico (% dos núcleos da camada basal do epitélio) das papilas ruminais de vacas não lactantes e não gestantes alimentadas com concentrado 1 ou 4 vezes por dia, por 19 dias, e posteriormente submetidas a jejum de 72 horas. As papilas foram coletadas por biópsia no saco cranial do rúmen nos dias 4, 12 e 19 de aplicação dos tratamentos e após 24, 48 e 72 horas do jejum. Mensurações no dia 0 foram utilizadas como covariável no modelo de análise estatística. Doze papilas foram coletadas e mensuradas em cada animal, em cada dia de coleta. Experimento 1. ($P=0,11$ para a interação entre frequência de alimentação concentrada e dia da coleta).

Não foi observado efeito significativo do plano nutricional sobre a largura das papilas, a largura do conjuntivo e o número de cunhas epiteliais e papilas dérmicas (Tabelas 2 e 3).

As variáveis microscópicas avaliadas são indicadoras indiretas de massa celular, possivelmente correlacionadas à capacidade de absorção de AGV pela parede do rúmen (Gaebel et al., 1987; Sutton et al., 1963). No entanto, Gäbel et al. (1993) observaram que a maior capacidade de absorção de AGV pela parede do rúmen não ocorreu concomitantemente à mudança na área superficial das papilas. A largura das papilas ruminais, medida pela relação área/comprimento, também não foi afetada significativamente pelo plano alimentar no Experimento 1 (Resende Júnior, 1999). A falta de resposta nestes marcadores morfológicos pode ter ocorrido em função do período de aplicação dos tratamentos não ter sido longo o suficiente para induzir mudança na massa papilar. Dirksen et al (1985) observaram que o desenvolvimento máximo da mucosa ruminal em vacas holandesas ocorreu 4 a 5 semanas após o parto, em um tempo total de 6 a 7 semanas de consumo de concentrado. Goodlad (1981), em estudo feito com carneiros, observou que o tempo de renovação do epitélio inteiro foi de 16,5 dias quando a dieta consistiu em forragem, 4,3 dias na transição de forragem para concentrados e 10,9 dias após vários meses consumindo concentrado.

Outra possível explicação para a ausência de alterações nos parâmetros avaliados microscopicamente seria a região do rúmen em que as papilas foram biopsiadas. Beharka et al. (1998) argumentam que papilas do saco cranial foram menos afetadas morfológicamente por variação dietética que papilas dos sacos ventral e dorsal. No entanto, Rabelo et al. (2001) também observaram que papilas do saco ventral de vacas leiteiras foram pouco afetadas por variação no conteúdo energético de dietas pré-parto. Variações na macroscopia papilar

induzidas nutricionalmente, apesar de serem aparentemente possíveis a curto prazo (Dirksen et al., 1985), podem não ser facilmente detectáveis experimentalmente. O jejum de 72 horas induzido nos Experimentos 1 e 2 não induziu mudança no tamanho papilar, mostrando que não houve resposta morfológica mesmo quando a mudança dietética foi muito mais acentuada que mudanças em níveis nutricionais, principalmente de energia (Rabelo et al., 2001).

A correlação entre a largura papilar, determinada por mensuração macroscópica e determinação da relação área/comprimento (Resende Júnior, 1999), e as mensurações de largura, obtidas por avaliação microscópica em lâminas coradas por hematoxilina-eosina, foi de 0,51 (Figura 2). Os valores de largura papilar, determinados macroscopicamente (Resende Júnior, 1999), foram, na maioria das vezes superiores aos valores de largura determinados microscopicamente.

Como o micrótomo dificilmente faz um corte longitudinal da papila em região exatamente central, era de se esperar que mensurações de papilas intactas resultassem em maiores valores de largura papilar que nas papilas inclusas. Apesar da correlação positiva e média entre estas variáveis, mensurações nas papilas intactas parecem melhor representar a área da papila ruminal.

O IM respondeu de forma aguda à mudança no plano alimentar nos Experimentos 1 (Resende Júnior, 1999) e 2 (Tabela 2). O IM mostrou ser uma boa variável de resposta morfológica tanto a mudanças alimentares pequenas, como à variação na frequência de alimentação concentrada (Resende Júnior, 1999) quanto a mudanças alimentares drásticas como o jejum (Tabela 2). Vale também enfatizar que a resposta em IM foi altamente significativa estatisticamente ($P < 0,01$), indicando que esta variável é eficiente para a avaliação morfológica do epitélio mesmo em trabalhos básicos de capacidade de absorção de AGV pela parede do rúmen, que normalmente utilizam baixo

número de unidades experimentais. O IM médio para os 6 ovinos alimentados e após jejum nos 2 experimentos (n=12) foi 0,61 e o desvio padrão da variável foi 0,16.

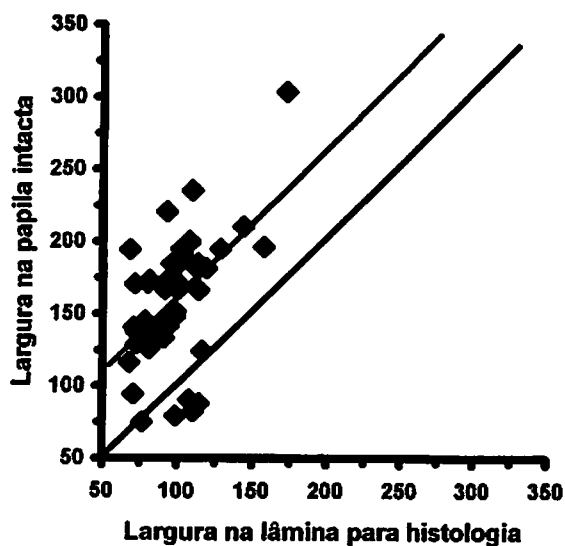


FIGURA 2: Correlação entre a mensuração de largura papilar (μm) realizada em papilas ruminais intactas (Resende Júnior,1999) e a mensuração de largura realizada nas mesmas papilas após preparo para avaliação histológica. Correlações foram realizadas entre os valores médios de largura papilar de 12 papilas de cada vaca em cada dia de coleta no Experimento 1 (n=49). $r = 0,51$.

A resposta aguda do IM à mudança nutricional tem sido observada por outros autores. Tamate et al. (1974) observaram que ocorreu degeneração das células basais do epitélio após 3 dias de jejum e resposta celular à realimentação em 6 horas. O ciclo circadiano de crescimento celular das papilas ruminais foi diferente em ovinos alimentados uma ou duas vezes por dia (Ohwada & Tamate, 1983). A resposta em crescimento celular à mudança na oferta de nutrientes parece ser imediata nas células do epitélio ruminal. Após a alimentação ocorrem picos de AGV no rúmen e de insulina no plasma sanguíneo. Os AGV, especialmente butirato, e a insulina são prováveis mediadores de proliferação celular no epitélio ruminal (Sakata et al., 1980; Gálfi et al., 1993). Resende Júnior (1999) argumentou que provavelmente o maior índice mitótico observado no aumento da oferta de nutrientes deve-se a picos de AGV no rúmen, que estimulam a proliferação celular para aumentar a capacidade de absorção da mucosa ruminal. Atingida a massa celular necessária para a demanda maior de absorção, o índice mitótico retorna aos valores anteriores à mudança nutricional.

Embora não existam evidências mostrando que um epitélio com alto IM também apresente alta atividade metabólica por célula e alta capacidade de absorção de AGV, em nosso estudo o IM foi o melhor indicador de resposta morfológica dentre todas as variáveis avaliadas, e pode ser útil em trabalhos sobre indução nutricional da capacidade de absorção de AGV pela parede do rúmen.

5 CONCLUSÃO

Dentre as variáveis morfológicas avaliadas, o IM foi o único que apresentou resposta estatisticamente significativa à variação na frequência de alimentação concentrada de bovinos e a jejum em bovinos e ovinos. O IM parece ser um bom marcador para quantificação da resposta morfológica do epitélio ruminal à mudança no plano alimentar.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. The mechanics of cell division. In: _____. **Molecular Biology of the cell**. 3 ed. New York: Garland Publishing, Inc. 1994. cap.18, p. 911 – 946.

AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 32, p. 1053-1061, 1999.

BALDWIN, R. L.; JESSE, B. W. Technical note: isolation and characterization of sheep ruminal epithelial cells. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 69, p. 3603, 1991.

BEHARKA, A. A. et al.. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, p. 1946-1955, 1998.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patologia**. São Paulo: EDART – USP. 1976. 241 p.

BERGMAN, E. N. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, [S.l.], v. 70, p. 567-590, 1990.

BROWNLEE, A. The development of rumen papillae in cattle fed on different diets. **British Veterinary Journal**, [S.l.], v. 112, p. 369, 1956.

BULLOUGH, W. S. The control of epidermal thickness. **British Journal of Dermatology**, [S.l.], v. 87, p.87-347, 1972.

BURSCH, W.; KLEINE, L.; TENNISWOOD, M. The biochemistry of cell death by apoptosis. **Bioch. & Cell Biology**, [S.l.], v. 68, p. 1071-1074, 1990.

CRICHLow, E. C.; CHAPLIN, R. K. Ruminant lactic acidosis: relationship of forestomach motility to nondissociated volatile fatty acids levels. **American Journal Veterinary Research**, [S.l.], v. 46, p. 1908, 1985.

DIRKSEN, G.; LIEBICH, H. G.; MAYER, E. Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. **The Bovine Practitioner**, [S.l.], v. 20, p. 116-120, 1985.

ELAM, C. J. Acidosis in feedlot cattle: practical observations. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 43, n. 4, p. 898-901, 1976.

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

FLATT, W. P. Studies of factors Affecting the development of the ruminant forestomach. 1955. Ph. D. thesis – Cornell University, Ithaca, New York.

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

GÄBEL, G.; MAREK, M.; MARTENS, H. Influence of food deprivation on SCFA and electrolyte transport across sheep reticulorumen. **Journal Veterinary Medicine**, [S.l.], v. A 40, p. 339, 1993.

GAEBEL, G.; SUENDERMANN, M.; MARTENS, H. The influence of osmotic pressure, lactic acid and pH on ion and fluid absorption from the washed and temporarily isolated reticulo-rumen of sheep. **Journal Veterinary Medicine**, [S.l.], v. A 34, p. 220, 1987.

GÁLFI, P.; GÄBEL, G.; MARTENS, H. Influence of extracellular matrix components on the growth and differentiation of ruminal epithelial cells in primary culture. **Research Veterinary Science**, [S.l.], v. 54, p. 102, 1993.

GÁLFI, P.; NEOGRÁDY, S.; KUTAS, F. Dissimilar ruminal epithelial response to short-term and continuous intraruminal infusion of sodium n-butyrate. **Journal Veterinary Medicine**, [S.l.], v. A 33, p. 47, 1986.

GERCHENSON, L. E.; ROTELLO, R. J. Apoptosis: a different type of cell death. **FASEB J.**, v. 6, p. 2450-2455, 1992.

GOODLAD, R. A. Some effects of diet on the mitotic index and the cell cycle of the ruminal epithelium of sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, [S.l.], v. 66, p. 487, 1981.

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

GREENWOOD, R.H. ; MORRIL, J.L. ; TITGEMEYER, E.C. ; KENNEDY, G.A. A new method of measuring diet abrasion and its effect on the development of the forestomach. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, p. 2534-2541, Oct. 1997.

KERR, J. F. R. Definition of apoptosis and overview of its incidence. In: LAVIN, M.; WATTERS, D. (Eds). **Programed cell death: the cellular and molecular biology of apoptosis**. Chur: Harwood, 1993. p. 1-18.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, [S.l.], v. 26, p. 239-257, 1972.

LANE, M. A.; JESSE, B.W. Effect of volatile fatty acid infusion on development of the rumen epithelium in neonatal sheep. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, p. 740-746, Apr.1997.

LAVKER, R.; CHALUPA, W.; DICKEY, J. F. An electron microscope investigation of rumen mucosae. **Journal Ultrastructure Research**, [S.l.], v. 28, p. 1-15, July 1969.

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

LITTEL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D. SAS® system for mixed models. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1996. 633p..

McCONKEY, D.J.; ORRENIUS, S.; JONDAL, M. Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). *Immunology Today*, [S.l.], v. 11, p. 120-121, 1990.

McGAVIN, M. D.; MORRILL, J. L. Scanning electron microscopy of ruminal papillae in calves fed various amounts and forms of roughage. *American Journal Veterinary Research*, [S.l.], v. 37, p. 497-508, 1976.

OHWADA, S.; TAMATE, H. Circadian rhythm of the mitotic index in the rumen epithelium of sheep. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, [S.l.], v. 33, p. 138-141, 1983.

RABELO, E.; BERTICS, S. J.; MACKOVIC, J.; GRUMMER, R. R. Strategies for increasing energy density of dry cow diets. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 84, p. 2240-2249, 2001.

RAMOS, M. G.; RABELO, F. L. A.; DUARTE, T.; GAZZINELLI, R. T.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autocrine synthesis of tumor necrosis factor and nitric oxide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, [S.l.], v. 35, p. 161-173, 2002.

RESENDE JÚNIOR, J. C. Efeito da frequência de alimentação concentrada sobre a morfologia das papilas do rúmen. 1999. 67p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SAKATA, T.; HIKOSAKA, K.; SHIOMURA, Y.; TAMATE, H. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. **British Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 44, p. 325, 1980.

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

SAKATA, T.; TAMATE, H. Effect of the intermittent feeding on the mitotic index and the ultrastructure of basal cells of the ruminal epithelium in sheep. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, [S.l.], v. 25, p. 156, 1974.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Presence of circadian rhythm in the mitotic index of the ruminal epithelium in sheep. **Research in Veterinary Science**. [S.l.], v. 34, p. 1-3, Jan. 1978 a.

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

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

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, Savoy**, v. 42, p. 1600, 1959.


SCHNORR, B.; VOLMERHAUS, B. Das blutgefäßsystem des pansens von rind und ziege: IV. Mitteilung zur funktionellen morphologie der vörmägen der hauswiederkäuer. **Zentralblatt Für Veterinar Medizin, [S.l.]**, A 15, p. 799, 1968.

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

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

TAMATE, H.; FELL, B. F. Cell deletion as a factor in the regulation of rumen epithelial populations. **Veterinary Science Communications, [S.l.]**, v. 1, p. 359, 1978.

TAMATE, H.; KIKUCHI, T.; SAKATA, T. Ultrastructural changes in the ruminal epithelium after fasting and susequent refeeding in the sheep. **Tohoku Journal of Agricultural Research, [S.l.]**, v. 25, p. 142, 1974.



WARNER, R. G.; HARRISON, H. N.; SANDER, E. G. The effect of various dietary factors on the development of the rumen. **Proc. 1959 Cornell Nutrition Conf. Feed Mfrs. 91**, [S.l.], 1959.