**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito do fornecimento de colostro bovino liofilizado e caprino
sobre o epitélio intestinal de caprinos recém-nascidos**

Violene Montanari Nordi

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens**

**Piracicaba
2010**

Wiolene Montanari Nordi
Zootecnista

**Efeito do fornecimento de colostro bovino liofilizado e caprino sobre o
epitélio intestinal de caprinos recém-nascidos**

Orientador:
Prof. Dr. **RAUL MACHADO NETO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Nordi, Wiolele Montanari

Efeito do fornecimento de colostro bovino liofilizado e caprino sobre o epitélio intestinal de caprinos recém-nascidos / Wiolele Montanari Nordi. - - Piracicaba, 2010.
92 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Aleitamento animal 2. Bovinos 3. Caprinos 4. Colostro 5. Imunidade 6. Imunoglobulinas
7. Intestino animal 8. Liofilização 9. Ruminantes I. Título

CDD 636.39084
N832e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus queridos pais que eu tanto amo,

Alzira Wiolene Montanari Melo Nordi

e Edson Nordi

por todo amor, incentivo, carinho, ensinamentos, os quais proveram a base fundamental do meu caráter ...

Ao meu admirável irmão,

Cristofer Montanari Nordi,

pelo amor, união, carinho, pela compreensão da minha ausência ...

Ao meu companheiro de muitas horas,

Vitor de Góes Lima Dantas,

pela amizade, companheirismo, atenção, amor, carinho, dedicação ...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à **Deus** ... que me iluminou através da vida e continua iluminando diariamente para superar limites e vencer!

À **minha família, mãe Alzira, pai Edson e irmão Cristofer** ... minha base sólida, meu apoio, grande parte do meu mundo, pessoas importantíssimas que com muito carinho, amor e compreensão, apesar de sentirem muito a dor da separação, me apoiaram e continuam apoiando para que eu concretize meus mais valiosos sonhos,

À minha **avó Branca, tios, primos, parentes**, que acreditam no meu sucesso,

Ao meu amado namorado **Vitor de Góes Lima Dantas**, pessoa especial que surgiu em minha vida, sem eu ao menos esperar, e aos poucos fez brilhar sua estrelinha iluminando meu caminho,

Ao meu orientador **Prof. Dr. Raul Machado Neto**, primeiramente pela oportunidade, por acreditar e confiar em mim, pelo aprendizado, pela amizade, pelo apoio irrestrito, pela compreensão, pelas palavras e estímulos amigas e principalmente pelo excelente exemplo como profissional,

Ao **Prof. Dr. Raul Dantas d'Arce** e **Prof. Dr. Irineu U.Packer**, pelos momentos de aprendizagem, *in memoriam*,

À **Prof. Dr. Ivanete Susin**, responsável pelo SIPOC – Setor Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos – ESALQ/USP pela oportunidade de trabalho em conjunto, pela colaboração que tornou possível a realização do experimento a campo,

Aos **professores do Departamento de Zootecnia**, pelos ensinamentos e atenção durante o curso,

À amiga **Anali Linhares Lima**, pela cumplicidade, pela paciência, pelo companheirismo, pelo apoio em todos os momentos, pelos momentos bons e ruins, enfim, simplesmente por ser verdadeiramente minha amiga,

À **Débora Botequi Moretti**, pela amizade, pela paciência, pelos ensinamentos, pelo inestimável apoio e companheirismo na fase de campo, análises laboratoriais, e durante todo o curso

À **Patricia Pauletti**, pela amizade, pela simplicidade, pela enorme competência e pela incomensurável ajuda laboratorial no início do mestrado,

Às **amigas e estagiárias** do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal – LAFA, Ingrid Grígolo, Mariana Pontin e Ana Paula Oeda pelo estudo, pela amizade, pela ajuda, pelo convívio e momentos de descontração,

Às minhas companheiras de lar, **Janaína Rosolem Lima, Alice Cassetari e às que dia já foram**, obrigada pela enorme paciência, carinho, companheirismo, brincadeiras, descontração, brigas, discussões, enfim, tudo,

Aos inúmeros **amigos e colegas conquistados em Piracicaba...** todos da pós-graduação, dos estudos, dos churrascos, das baladas e festas, dos bares... quantidade de amigos, que não caberiam numa única página.

Uns mais e outros menos presentes, mas todos companheiros, amigos para todos os momentos que me fizeram crescer, Obrigada!

Aos **funcionários do departamento de Zootecnia e do prédio da Zoologia**, em especial ao José Luiz F. Piedade (Zé), pela atenção e momentos agradáveis de convivência no departamento,

Ao **Professor Pedro Duarte Novaes**, do departamento de Morfologia da FOP/UNICAMP, pela ajuda nas avaliações estereológicas,

À **Universidade Federal do Paraná**, por oferecer-me a oportunidade de realizar a graduação em Zootecnia e iniciar-me na pesquisa,

À **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP** e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização da pós-graduação,

Ao **SIPOC**, aos alunos e funcionários, pela ajuda e colaboração para realização deste trabalho à campo,

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa de estudo e pelo apoio financeiro através de projeto,

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de estudo,

E, finalmente, à todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa e dissertação.

**DE CORAÇÃO,
OS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS!**

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Imunidade passiva.....	21
2.2 Falha na transferência de proteção passiva	22
2.3 Importância do colostro	23
2.4 Colostro caprino e higidez do recém-nascido.....	25
2.5 Caracterização do epitélio intestinal	26
2.6 Fechamento intestinal	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Local de coleta e de processamento das amostras	31
3.2 Animais e Tratamentos.....	31
3.3 Banco de colostro.....	32
4 Coleta de amostras	32
4.1 Colostro	32
4.2 Tecidos intestinais.....	32
5 Análises laboratoriais	33
5.1 Análise bromatológica das refeições de colostro	33
5.2 Imunoglobulina G no colostro bovino e colostro caprino	33
5.3 Fator do crescimento semelhante à insulina tipo I - IGF1 no colostro bovino liofilizado e colostro caprino	34
5.4 Microscopia óptica.....	34
5.5 Morfometria dos segmentos intestinais	35

5.5.1 Estereologia.....	37
5.6 Células caliciformes	39
5.7 Imunohistoquímica.....	39
5.8 Delineamento experimental e análise estatística	40
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 Fator do crescimento semelhante a insulina tipo I no colostro bovino liofilizado e no colostro caprino	43
6.2 Morfometria dos segmentos intestinais.....	44
6.2.1 Altura das vilosidades intestinais	44
6.2.2 Profundidade das criptas intestinais	49
6.2.3 Espessura da túnica muscular.....	54
6.2.4 Volume parcial da mucosa absortiva	58
6.2.5 Densidade de superfície da mucosa intestinal.....	63
6.3 Células caliciformes	65
6.4 Imunohistoquímica.....	69
6.5 Caracterização do intestino delgado dos cabritos.....	74
6.5.1 Histologia do duodeno	74
6.5.2 Histologia do jejuno.....	75
6.5.3 Histologia do íleo	76
7 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS	79

RESUMO

Efeito do fornecimento de colostro bovino liofilizado e caprino sobre o epitélio intestinal de caprinos recém-nascidos

Foi avaliado o fornecimento do colostro bovino liofilizado como alternativa de fonte inicial de imunoglobulinas para caprinos recém-nascidos bem como as características histológicas, considerando avaliações histomorfométricas, estereológicas, imunohistoquímicas e o número de células caliciformes no epitélio intestinal destes animais. Foram utilizados dois grupos de 15 cabritos, que receberam 5% do peso vivo de colostro bovino liofilizado (CBL) ou colostro caprino (CC), com 55 mg/mL de imunoglobulina G, às 0, 7 e 14 horas de vida. Amostras do duodeno, jejuno médio e íleo foram coletadas às 18, 36 e 96 horas de vida para análises histológica e imunohistoquímica. Três animais foram sacrificados logo após o nascimento, constituindo o grupo zero hora. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo as variáveis morfométricas consideradas em arranjo fatorial 2x3+1, tendo como efeitos principais os dois tipos de colostro, os três horários de abate e o grupo zero hora. A concentração de IGF-I no colostro bovino liofilizado e colostro caprino foi de 158,71 e 356,32 ng/mL, respectivamente. A altura das vilosidades no jejuno mostrou-se superior ($P<0,05$), apresentando vilosidades 30,7% e 24,2% mais altas do que o duodeno e o íleo às 36h, respectivamente. O duodeno, às 18h, apresentou profundidade das criptas 48,4% maior que o jejuno e, às 96h as criptas duodenais mostraram-se 23,2% maiores que as criptas do íleo ($P<0,05$). No jejuno, as criptas apresentaram-se mais profundas às 96h ($P<0,05$) do que nos outros horários. A espessura da túnica muscular no jejuno apresentou-se mais espessa às 36 e 96h do que à zero h e mais espessa às 36h do que às 18h ($P<0,05$). No geral, jejuno e íleo, apresentaram túnica muscular menos espessa ($P<0,05$) que a encontrada no duodeno. Independente dos segmentos, às 96h a túnica muscular foi mais espessa que às 18h. O Vv da mucosa absortiva foi maior no jejuno, enquanto no íleo às 36h o Vv foi maior do que nos demais horários experimentais. Independente do segmento, às 36h o Vv foi 17,3% maior que às 96h. O número de células caliciformes no jejuno foi 78,6% menor às 18h ($P<0,05$) nos cabritos que ingeriram colostro caprino e 54,6% maior às 96h ($P<0,05$) nos animais que ingeriram colostro bovino liofilizado. Colostro bovino liofilizado pode ser utilizado como fonte de proteção passiva alternativa para os caprinos recém-nascidos. O IGF-I presente no colostro não influenciou a morfometria entérica. O jejuno mostrou-se o segmento mais importante no processo absortivo de imunoglobulinas. A distribuição dos anticorpos internalizados pelo epitélio entérico mostrou-se relacionada aos segmentos do intestino e tempo de vida dos recém-nascidos, independente da fonte de anticorpos, bovina liofilizada ou caprina.

Palavras-chave: Absorção; Estereologia; Histologia entérica; Imunidade passiva; Imunoglobulinas; Pequenos ruminantes

ABSTRACT

Effects of feeding lyophilized bovine colostrum and caprine colostrum on the intestinal epithelium of newborn goat kids

It was evaluated the supply of the lyophilized bovine colostrum as an alternative source of immunoglobulin for newborn goat kids and the histological characteristics, through histomorphometric, stereological, immunohistochemical evaluations and goblet cells number in the intestinal epithelium in this animals. Two groups of fifteen newborn goat kids received 5% of body weight of lyophilized bovine colostrum (LBC) or caprine colostrum (CC) with 55 mg/mL of immunoglobulin G at 0, 7 and 14 hr of life. Samples of duodenum, medium jejunum and ileum were collected at 18, 36 and 96 hr of life for histological and immunohistochemical analysis. Three animals were sampled just after birth representing the zero hr group. A completely randomized designing was used, and the variable morphometric was considered as 2x3+1 factorial arrangement, having as the main factors colostrum supply, the three slaughter hours and the zero hr group. The IGF-I concentration in lyophilized bovine colostrum or caprine colostrum was 158,71 and 356,32 ng/mL, respectively. Villous height was superior in the jejunum ($P<0.05$) with villous 30.7% and 24.2% higher than duodenum and ileum at 36hr, respectively. The duodenum showed at 18hr crypts 48.4% deeper than in the jejunum and at 96hr, the duodenal crypts was 23.2% deeper than ileum crypts ($P<0.05$). In the jejunum, crypts were deeper at 96hr compared to the other experimental hours. The muscularis submucosal thickness in the jejunum was thicker at 36 and 96hr than zero hr and was thicker at 36hr than 18hr. Jejunum and ileum, in general thinner ($P<0.05$) tunica muscular layer than found in the duodenum. Regardless of the segments, at 96hr, the muscularis submucosal was thicker than 18hr. The absorptive mucosa partial volume (Vv) was higher in the jejunum, while in the ileum the Vv was higher at 36hr than all other experimental dates. Regardless of the segments, at 36hr, the Vv was 17.3% higher than at 96hr. The goblet cells number was different in jejunum with 78.6% less cells at 18hr ($P<0.05$) in the goat kids fed caprine colostrum and 54.6% higher at 96hr ($P<0.05$) in the goat kids fed lyophilized colostrum. Lyophilized bovine colostrum can be used as an alternative source of passive protection for the newborn kids. The IGF-I present in colostrum didn't influence the enteric morphology. The jejunal epithelium was the most important segment related to absorption process. The internalized antibody distribution in the enteric epithelium showed related to the small intestine segments and post-partum period, regardless of the antibodies source, lyophilized bovine or caprine.

Keywords: Absorption; Enteric histology; Immunoglobulins; Passive immunology; Small ruminant; Stereology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Morfometria da altura da vilosidade, profundidade da cripta no duodeno de cabritos (A) e altura da vilosidade, profundidade da cripta e espessura da túnica muscular no jejuno de cabritos (B), aumento de 10x. Barra=100µm.....	36
Figura 2 -	Representação esquemática do sistema teste de arcos ciclóides.....	38
Figura 3 -	Valores médios (média ± erro padrão) da altura das vilosidades (µm) por segmento intestinal.....	48
Figura 4 -	Valores médios (média ± erro padrão) da profundidade da cripta (µm) para a interação entre segmento intestinal e horário experimental.....	53
Figura 5 -	Valores médios (média ± erro padrão) da espessura da túnica muscular (µm) por segmento intestinal.....	57
Figura 6 -	Valores médios (média ± erro padrão) da espessura da túnica muscular (µm) por horário experimental.....	57
Figura 7 -	Volume parcial Vv (%) da mucosa absortiva (média ± erro padrão) por segmento intestinal.....	61
Figura 8 -	Volume parcial Vv (%) da mucosa absortiva (média ± erro padrão) por horário experimental	61
Figura 9 -	Número de células caliciformes (médias) por segmento intestinal.....	68
Figura 10 -	Células caliciformes no íleo de cabritos, aumento de 10x (A), aumento de 20X (B). Barra= 100µm.....	69
Figura 11 -	Imunomarcção das imunoglobulinas G presentes nas vilosidades do jejuno de cabritos. Adição de DAB comercial sem a coloração com azul de toluidina (A) e após corados (B), aumento de 10X. Barra=200µm.....	71
Figura 12 -	Vacúolos preenchidos com IgG presentes ao longo de toda vilosidade do jejuno de cabritos às 18 horas de vida; e distribuídos na metade superior das vilosidades no jejuno de cabritos às 36 horas de vida, aumento de 10X. Barra=100µm.....	72
Figura 13 -	Íleo de cabritos às 18 horas com vacúolos localizados médio-apicalmente, aumento de 10X. Barra=100µm.....	73

- Figura 14 - Duodeno de cabritos às 18, 36 e 96 horas, com núcleos na região apical, média e basal dos enterócitos na parte superior, média e inferior das vilosidades, respectivamente, aumento de 20X. Barra=100µm..... 74
- Figura 15 - Jejuno de cabritos à 0 hora com núcleos na região apical, aumento de 10X; Jejuno de cabritos às 18 e 36 horas, ausência de padrão para posição dos núcleos, aumento de 20X e 10X, respectivamente. Barra=100µm..... 75
- Figura 16 - Íleo de cabritos às 18 e 36 horas, com núcleos na posição medio-apical, no terço superior das vilosidades, aumento de 40X e 20X, respectivamente; Íleo de cabritos às 96 horas com núcleos na região basal, aumento de 20X. Barra=100µm..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição bromatológica das refeições de colostro bovino liofilizado e colostro caprino oferecidas aos cabritos durante o período experimental.....	33
Tabela 2 -	Altura das vilosidades (μm) no duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida.....	45
Tabela 3 -	Profundidade das criptas (μm) do duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida.....	50
Tabela 4 -	Espessura da túnica muscular (μm) do duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida.....	55
Tabela 5 -	Volume parcial da mucosa absorviva (%) no duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida.....	59
Tabela 6 -	Densidade de superfície da mucosa intestinal (mm^2/mm^3) no duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida.....	64
Tabela 7 -	Células caliciformes presentes no duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida.....	66

1 INTRODUÇÃO

As primeiras horas de vida são críticas para os caprinos recém-nascidos, pois além de terem que se adaptar às novas condições ambientais, encontram-se susceptíveis à invasão de microorganismos antes da completa ativação de seu sistema imunológico.

Os caprinos nascem sem anticorpos na circulação sanguínea, sendo a proteção obtida com a transferência de imunoglobulinas da mãe para o filho. As imunoglobulinas maternas, provenientes da corrente sangüínea e sintetizadas pela glândula mamária, são transferidas ao recém-nascido após a ingestão do colostro, conferindo-lhe proteção inicial.

O intestino delgado dos ruminantes, nas primeiras horas de vida, possui uma condição especial de absorção de macromoléculas, internalizando-as e transferindo-as intactas até a corrente sanguínea, onde exercerão a função de defesa do organismo. Além das imunoglobulinas, no colostro estão presentes fatores bioativos que têm sido relacionados com o desenvolvimento, crescimento e maturação do epitélio intestinal dos recém-nascidos.

Após o período de intensa absorção de imunoglobulinas, nas primeiras 48 horas de vida, ocorrem alterações ultra-estruturais nas células absortivas intestinais e perda de permeabilidade à macromoléculas, caracterizando o fechamento intestinal. Desta forma, a proteção inicial do recém-nascido está assegurada, mas muitas vezes não são avaliados outros fatores que acompanham as secreções lácteas caprina que podem desafiar a higidez do animal. A contra-indicação para o consumo de colostro e leite caprino diz respeito à transmissão da artrite encefalite caprina - CAE, doença viral infectocontagiosa transmitida principalmente através da ingestão de colostro e leite contaminados. Por ser uma doença grave e que tem elevado a ocorrência de morbidez e mortalidade nos rebanhos, ganha relevância especial o estudo de métodos alternativos de fornecimento de imunoglobulinas para cabritos recém-nascidos. Assim, o procedimento proposto no presente estudo, inédito de utilização de colostro bovino liofilizado para caprinos, uma fonte rica em anticorpos e livre de CAE, constitui-se em uma importante alternativa a ser considerada.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o colostro bovino liofilizado como alternativa de fonte inicial de imunoglobulinas para caprinos recém-nascidos e estudar a relação do processo de aquisição de imunidade passiva em cabritos, aleitados com colostro bovino liofilizado e colostro caprino, sobre as características histológicas, considerando avaliações histomorfométricas, estereológicas, imunohistoquímicas e histomorfológicas e quantidade de células caliciformes do epitélio intestinal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Imunidade passiva

A proteção transferida da mãe para o filho via placenta, colostro, ou ambos, recebe a denominação de imunidade passiva, pois não tem participação do recém-nascido na sua síntese (BRAMBELL, 1958; JEFFCOTT, 1972).

Os cabritos são agamaglobulinêmicos ou hipogamaglobulinêmicos ao nascerem (RIBEIRO et al., 1983; ARGÜELLO et al., 2004; LIMA, et al., 2009; RODRÍGUEZ et al., 2009). Apresentam esta condição inicial, pois a placenta do tipo sindesmocorial, composta por cinco membranas teciduais, impede a passagem de anticorpos no período gestacional. Assim, é essencial a aquisição de imunoglobulinas no período pós-parto, através da ingestão do colostro, único veículo de transporte destas macromoléculas nos ungulados (BRAMBELL, 1958; McCOY et al., 1970; JEFFCOTT, 1972; PORTER, 1976).

Nas primeiras horas de vida existem condições ideais para a absorção de anticorpos, pequena produção de ácido clorídrico no estômago, baixa atividade da tripsina gástrica, presença de um fator inibidor de tripsina no colostro e baixa atividade enzimática na mucosa intestinal (KRUSE, 1983). Aliado a estes fatores, a mucosa intestinal apresenta-se altamente permeável à macromoléculas como as imunoglobulinas. Estas são internalizadas e transportadas, de modo não-seletivo, pelas células intestinais absorptivas, extrusadas biologicamente ativas para o sistema linfático e, em seguida, para o sistema circulatório (LEECE; MORGAN, 1962; MOOG, 1979; KRUSE, 1983; BESSI, 2002ab).

Em ruminantes, após o pico de concentração de imunoglobulinas adquiridas passivamente através do colostro, ocorre a fase de transição da proteção passiva para a ativa. Este período de transição é caracterizado pela diminuição na concentração de anticorpos séricos, resultado do catabolismo das imunoglobulinas exógenas (KRUSE, 1983; MACHADO NETO; PACKER, 1986; BARACAT et al., 1997; PAULETTI et al., 2002; LIMA et al., 2009). Posteriormente, a produção endógena de imunoglobulinas

começa a predominar, até que sejam atingidos níveis normais na circulação do animal (CAMPBELL et al., 1977; RIBEIRO et al., 1983; MACHADO NETO; PACKER, 1986; PAULETTI et al., 2003).

2.2 Falha na transferência de proteção passiva

A falha na transferência de proteção passiva pode predispor o recém-nascido a doenças infecciosas, ocasionando elevados índices de morbidez e mortalidade no período pós-natal (O'BRIEN; SHERMAN, 1993; VIHAN, 1988; FEITOSA et al., 2001). Esta falha, em bovinos e caprinos, ocorre quando a concentração de imunoglobulinas séricas, às 24 horas de vida, é inferior que 10 - 12 mg/mL de IgG (RIBEIRO et al., 1983; O'BRIEN; SHERMAN, 1993).

Existem alguns fatores que predispõem a condição de falha, como a baixa produção de colostro pela mãe, ingestão de colostro com baixa concentração de imunoglobulinas, manejo inadequado do colostro, morte ou rejeição da mãe, alimentação deficiente da mãe no terço final de gestação, quadro severo de mastites, baixa aquisição pelo recém-nascido em função de problemas de conformação do teto, vigor do recém-nascido, peso ao nascer, número de crias, prematuridade ao nascer, precocidade da secreção gástrica (FEITOSA et al., 2001; ROOKE et al., 2002; ARGÜELLO et al., 2004; CASTRO et al., 2005; SCHMIDEK et al., 2008; CASTRO et al., 2009; GODDEN et al., 2009; FLAIBAN et al., 2009).

Schmidek et al. (2008) determinaram que a falha na primeira mamada influenciou em 10% a taxa de mortalidade em bezerros Guzerá. Verificaram que o baixo peso do bezerro ao nascer, inferior a 25 kg, problema no aparelho mamário e a idade das vacas ao parto, foram os fatores de maior relevância.

Castro et al. (2009), trabalhando com cabritos verificaram que o baixo peso ao nascer (inferior a 2,8 kg) e parto com três ou mais cabritos influenciaram negativamente a transferência da proteção passiva. Da mesma forma, Turquino (2010) estudando a transferência da imunidade passiva em cordeiros, verificou maior ocorrência de falhas

em cordeiros com peso igual ou inferior que 3 kg e oriundos de partos gemelares, estando esta condição fortemente associada com a mortalidade até os 60 dias de vida.

Vihan (1988) verificou relação entre concentração de imunoglobulinas séricas, privação de colostro, mortalidade, ganho de peso vivo e proteção passiva em cordeiros até duas semanas de vida. Segundo o autor, os animais com nível sérico de gamaglobulinas menor que 0,5 g/100mL, com baixa taxa de sobrevivência, foram considerados animais que apresentaram falha na transferência de proteção passiva. Também verificaram que os cordeiros privados da ingestão de colostro apresentaram menores níveis séricos de gamaglobulinas até as 72 horas de vida e mortalidade em até 20% dos animais.

Machado Neto et al. (2004b) ao relacionarem os sistemas de manejo de bovinos leiteiros recém-nascidos com morbidez e mortalidade verificaram que o tamanho do rebanho, o manejo do colostro e do aleitamento, o local onde os bezerros são criados, a idade de acesso ao concentrado e o período de desmama, influenciaram a aquisição de imunidade passiva e a mortalidade neonatal.

Buscando evitar a condição de morbidez, a primeira ingestão de colostro deve ocorrer logo nas primeiras horas de vida, monitorando a quantidade, 5% a 7% do peso vivo e a qualidade do alimento fornecido, garantindo vigor, resistência às infecções e melhores índices de sobrevivência dos ruminantes (MACHADO-NETO et al., 1997 e 2004b; ARGÜELLO et al., 2004).

2.3 Importância do colostro

O colostro é uma mistura de secreções produzidas pela glândula mamária e de elementos oriundos do soro sanguíneo, principalmente imunoglobulinas, que são transportadas através do epitélio alveolar e acumuladas na glândula mamária durante o período pré-parto (JEFFCOTT, 1972; FOLEY; OTTERBY, 1978; VIHAN 1988). O colostro difere do leite com relação à composição química, possuindo elevadas concentrações de imunoglobulinas e nutrientes essenciais, hormônios e fatores bioativos, como os fatores de crescimento semelhantes à insulina - IGFs (BÜHLER et

al, 1998; HAMMOM; BLUM, 2002; BLUM; BAUMRUCKER, 2002; PENCHEV GEORGIEV, 2008).

Independente da forma de aquisição da imunidade passiva pelas diferentes espécies animais e dentre as cinco classes de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE), a IgG é priorizada no processo de transferência (CAMPBELL et al., 1977; AVRECH et al., 1994). Em ruminantes, a IgG perfaz mais de 80% da imunoglobulinas presentes no colostro (BUTLER, 1969; CAMPBELL et al., 1977; AVRECH et al., 1994; PENCHEV GEORGIEV, 2008). Esta classe de imunoglobulinas confere proteção ao recém-nascido e modula a resposta imune, através de mecanismos que controlam a produção endógena de anticorpos (PORTER, 1979).

Nos ruminantes, as imunoglobulinas adquiridas através da ingestão do colostro alcançam concentração máxima entre 24 e 48 horas de vida (LOGAN et al., 1978; KRUSE, 1983; RIBEIRO et al., 1983; MACHADO-NETO; PACKER, 1986; MACHADO-NETO et al., 2004; ARGÜELLO et al., 2004; KINDLEIN et al., 2007; CASTRO-ALONSO et al., 2008; LIMA et al., 2009; MORETTI et al., 2010). Machado Neto e Packer (1986), Machado-Neto et al. (2004), Argüello et al. (2004), Castro-Alonso et al. (2008) e Moretti et al. (2010) trabalhando com bovinos, caprinos e ovinos, encontraram as concentrações mais elevadas de IgG sérica no período entre 24 e 36 horas de vida. Logan et al. (1978) e Lima et al. (2009) trabalhando com fornecimento de colostro de origem bovina para ovinos e caprinos, respectivamente, encontraram máxima concentração de IgG sérica às 48 horas de vida.

Trabalhos realizados nas últimas duas décadas atribuem aos IGFs presentes no colostro uma função de crescimento do tecido intestinal em recém-nascidos (ODLE et al., 1996; BÜHLER et al., 1998; BLUM; HAMMON, 2000; BLÄTTLER et al., 2000; PAULETTI et al., 2007). Estes fatores bioativos são sintetizados e secretados principalmente pelo fígado, podendo ter ação autócrina e parácrina, ou agirem como fatores de crescimento endócrinos que circulam no plasma e atuam em sítios distantes (HOSSNER et al., 1997). Os IGFs se ligam a proteínas de ligação – IGFBPs, modulando a interação IGF-receptor. Alguns fatores como o estado nutricional do animal, alterações hormonais e a associação dos IGFs às suas proteínas de ligação

controlam a atividade desses fatores bioativos (McGUIRE et al., 1995; ODLE et al., 1996; RHOADS et al., 2000; HAMMON; BLUM, 2002; BLUM; BAUMRUCKER, 2002).

Os receptores para os IGFs e para a insulina estão localizados principalmente nas células da cripta intestinal, sendo responsáveis pela estimulação da proliferação celular entérica dos animais (HAMMON; BLUM, 2002). Deste modo, estes fatores de crescimento podem ser potencialmente importantes para o crescimento, desenvolvimento e maturação da mucosa intestinal.

2.4 Colostro caprino e higidez do recém-nascido

O consumo de colostro fornecido precocemente em quantidade adequada é crítico para a aquisição inicial de proteção local e sistêmica. Apesar destas condições serem as necessárias e desejáveis para a transferência adequada de proteção inicial ao recém-nascido, para caprinos e ovinos, patógenos presentes nas secreções lácteas maternas representam um indesejável desafio à higidez do recém-nascido.

As secreções lácteas caprinas oriundas de mães infectadas pela CAE são responsáveis pela transmissão desta importante doença viral infectocontagiosa para os caprinos. O vírus da CAE causa persistentes infecções e induz inflamações crônicas e lesões degenerativas, dor e desconforto para o animal. É responsável pela elevada ocorrência de morbidez e mortalidade diminuindo, assim, a lucratividade da atividade produtiva (CALLADO et al., 2001; PETERHANS et al., 2004).

As formas mais comuns de transmissão da CAE são a ingestão de colostro e leite das mães infectadas e do contato com animais infectados (ADAMS et al., 1983; BLACKLAWS et al., 2004). Com o objetivo de diminuir a incidência da doença, especialmente em áreas de risco de transmissão, tem-se desenvolvido maneiras para minimizar ou anular o contato do recém-nascido com colostro e leite de mães infectadas. Podem ser citados como procedimentos alternativos de manejo do colostro a pasteurização (ARGÜELLO et al., 2003; FERNÁNDEZ et al., 2006), o armazenamento de colostro não infectado sob refrigeração e congelamento (ARGÜELLO et al., 2003 e 2004), fornecimento de colostro comercial bovino (ARGÜELLO et al., 2004; MELLADO

et al., 2008) e colostro caprino liofilizado (CASTRO et al., 2005). O fornecimento de colostro bovino para caprinos foi avaliado como método de manejo alternativo, buscando a prevenção contra a CAE e assegurando, ao mesmo tempo, aquisição de adequada proteção passiva (LIMA et al., 2009).

A prática do fornecimento de colostro bovino para pequenos ruminantes é possível em função da homologia da estrutura dos anticorpos dos ruminantes e da alta disponibilidade desta secreção nos rebanhos leiteiros (LOGAN et al., 1978; LIMA et al., 2009; MORETTI et al., 2010). O colostro bovino liofilizado, na forma de banco de colostro para caprinos recém-nascidos, uma proposta inovadora, que esta sendo avaliada no presente trabalho é uma prática promissora, pois além de conservar as imunoglobulinas do colostro, permite um manejo de fornecimento mais simplificado aliado a facilidade de armazenamento.

2.5 Caracterização do epitélio intestinal

O intestino delgado apresenta na sua constituição dobras macroscópicas e microscópicas, as vilosidades e microvilosidades, que aumentam a área absorptiva do órgão. As vilosidades intestinais são constituídas, por células responsáveis pela defesa, digestão, absorção e secreção de hormônios e enzimas.

O tamanho das vilosidades é regulado pela taxa de mitose e apoptose, ou seja, proliferação e morte programada das células epiteliais da mucosa (BLÄTTLER et al., 2001; ROFFLER et al., 2003; SAUTER et al., 2004; BITTRICH et al., 2004). Ao atingir a porção apical das vilosidades, as células sofrem apoptose e em seguida, são extrusadas para o lúmen intestinal (BURGUESS, 1998). Os mecanismos que desencadeiam a apoptose não são bem conhecidos, mas sabe-se que fatores de crescimento, hormônios e a absorção de IgG podem influenciar a taxa de morte celular (WOLINSKI et al., 2003; CASTRO-ALONSO et al., 2008).

O epitélio intestinal de ruminantes é altamente permeável à macromoléculas nas primeiras 24 a 48 horas de vida (BRAMBELL, 1956). Esta permeabilidade é temporária, sendo que as células com características fetais logo são substituídas por uma primeira

geração de células adultas, maduras, caracterizadas pela impermeabilidade à macromoléculas (SMEATON e SIMPSON-MORGAN, 1985; XU, 1996; BESSI et al., 2002ab; KINDLEIN et al., 2008b). Trahair e Robinson (1989), ao analisarem a estrutura dos enterócitos de cordeiros aos dois dias de vida, verificaram alto grau de organização, com características de epitélio maduro.

Entre as vilosidades ocorrem depressões correspondentes as glândulas intestinais ou criptas de Lieberkühn. As criptas, por possuírem células-tronco, constantemente geram novas células responsáveis pela reposição das células epiteliais. Da região das criptas as células são originadas, e continuamente migram para o topo das vilosidades, podendo ter ações morfológica e funcionalmente diferentes (BLÄTTLER et al., 2001; PAULETTI, 2003; GODLEWSKI et al., 2005). A profundidade das criptas é diretamente influenciada pela taxa de proliferação das células presentes nesta região da mucosa. Assim, a medida da profundidade das criptas pode ser considerada como potencial de proliferação das células intestinais (BITTRICH et al., 2003; GODLEWSKI et al., 2005).

Smeaton e Simpson-Morgan (1985), estudando o período de transição entre as gerações de células intestinais, última geração de células fetais e primeira geração de enterócitos do tipo adulto, em cordeiros recém-nascidos, observaram aumento na atividade mitótica nas criptas e proliferação de um tipo diferenciado de célula epitelial. Os autores sugerem que ocorre renovação celular em dois ou três dias após o nascimento. Em ovinos, no período pré-natal, as células da cripta possuem baixa atividade mitótica, aumentando a taxa de proliferação após o parto (TRAHAIR et al., 1986).

Localizadas na porção apical dos enterócitos estão as microvilosidades e, a partir de invaginações na base destas, em células do tipo fetal, surge um complexo de túbulos, formando o complexo endocítico apical. Este complexo é responsável pelo aparecimento de vacúolos citoplasmáticos com a função de internalização e transporte de anticorpos, oriundos do colostro, nas primeiras horas de vida (SIMPSON; SMEATON, 1972; TRAHAIR; ROBINSON, 1989; KAUP et al., 1996; PÁCHA et al., 2000).

Bessi et al. (2002ab) estudando a absorção de anticorpos pelo intestino delgado proximal e distal de bezerros recém-nascidos, verificaram a presença de células com vacúolos vazios ou preenchidos por material absorvido logo nas primeiras horas de vida e ausentes nos animais aos três dias de idade. Da mesma forma, Bittrich et al. (2003) encontraram células epiteliais vacuoladas no íleo de bezerros, logo pós-parto, período de elevada permeabilidade intestinal, realizando o transporte de macromoléculas, situação não mais verificada aos 7 dias de vida.

Kaup et al. (1996) ao analisarem a ultra-estrutura dos enterócitos de bezerros após a ingestão de colostro, sugeriram que as células do jejuno e do íleo são responsáveis pela maior absorção, o que foi constatado pela elevada quantidade de células vacuoladas neste segmento. Kindlein et al. (2008a), trabalhando com bezerros, verificaram crescente vacuolação nos enterócitos da região cranial para caudal, sugerindo que o processo de internalização da IgG nos enterócitos aumenta do duodeno para o íleo. Da mesma forma, Bessi et al. (2002b) ressaltaram que o processo de absorção de anticorpos do colostro está relacionado as células fetais vacuoladas do jejuno e íleo.

Entre as células absorptivas podem ser encontradas as células caliciformes, produtoras de muco, o qual protege e lubrifica o revestimento do intestino (DEPLANCKE; GASKINS, 2001). Estas células estão presentes em maior quantidade na região distal do intestino delgado e em menor quantidade na região proximal (CHENG; Le BLOND, 1974).

Bessi et al. (2002a) estudando o intestino delgado proximal de bezerros recém-nascidos encontraram células caliciformes distribuídas uniformemente ao longo das vilosidades em animais aos três dias de idade e aleitados com colostro. Nos animais que não se alimentaram de colostro, as células caliciformes apresentavam-se localizadas no terço inferior das vilosidades. Bessi et al., (2002b) ao analisarem o intestino delgado distal de bezerros, verificaram maior número de células caliciformes na base das vilosidades. Agressões, tanto patogênicas quanto mecânicas determinam aumento da quantidade de células caliciformes e a produção de muco (SCHAUFFERT et al., 2000).

A eficiência absorptiva está relacionada ao tamanho das vilosidades, sendo que logo nos primeiros dias de vida ocorrem grandes mudanças nas características histológicas do epitélio intestinal. O jejuno é caracterizado por vilosidades mais longas, que proporcionam maior superfície de contato e elevada absorção de imunoglobulinas, e conseqüentemente, elevada eficiência absorptiva. As vilosidades do duodeno e jejuno, nos primeiros dias de vida de bezerros, tornam-se mais baixas e uniformes (BESSI et al., 2002a), determinando uma redução na eficiência absorptiva (PAULETTI et al., 2007).

Pauletti et al. (2007), utilizando estereologia como método para analisar as mudanças na mucosa absorptiva do intestino delgado de bezerros, verificaram maior volume da mucosa do jejuno ao nascimento e aos sete dias de idade, quando comparado aos outros dois segmentos intestinais. Van Ginneken et al. (2002) observaram que a densidade de superfície (Sv) da mucosa intestinal foi maior no jejuno, sugerindo que as vilosidades são maiores e mais numerosas, apesar de possuírem uma parede intestinal mais delgada, quando comparado a outras regiões.

As alterações histológicas que ocorrem na mucosa intestinal durante o período de permeabilidade às macromoléculas estão relacionadas ao consumo de colostro e ao processo de maturação do trato gastrointestinal. Na literatura podem ser encontrados inúmeros trabalhos estudando o efeito do fornecimento de colostro sobre as características histomorfométricas do epitélio intestinal como a circunferência, área e altura das vilosidades e profundidade das criptas. Podem ser citados estudos com bezerros (BÜHLER et al., 1998; BLÄTTLER et al., 2001; HAMMON; BLUM, 2002; ROFFLER et al., 2003; BITTRICH et al., 2004; SAUTER et al., 2004; PAULETTI et al., 2007; KINDLEIN et al., 2008b), cordeiros (TRAHAIR; ROBINSON, 1989; TRAHAIR et al., 1997) e suínos (JENSEN et al., 2001). Estas condições morfométricas estão relacionadas com o desenvolvimento do intestino delgado e com a capacidade de absorção de nutrientes (BÜHLER et al., 1998; BLÄTTLER et al., 2001; SAUTER et al., 2004).

O desenvolvimento pós-natal do trato gastrointestinal também tem sido relacionado a fatores bioativos como o IGF-I e IGF-II presentes no colostro, levando-se em conta o tempo que os enterócitos ficam expostos à ação dos IGFs (BURRIN et al., 1996; ODLE et al., 1996; BLUM; HAMMON, 2000; BLÄTTLER et al., 2001). Estes fatores

de crescimento podem ser potencialmente importantes para contribuir com o desenvolvimento e maturação da mucosa intestinal. Diferentemente, Roffler et al. (2003), estudando o efeito da suplementação com alto nível de IGF-I e Pauletti et al. (2007), estudando o efeito de diferentes concentrações de IGF-I (500 a 6000 µg) sobre as características morfométricas e estereológicas de bezerras, não encontraram efeito significativo deste fator bioativo sobre a morfometria intestinal no período estudado.

2.6 Fechamento intestinal

O fechamento intestinal ocorre quando as células absortivas perdem a permeabilidade à macromoléculas, condição que ocorre entre 24 a 48 horas de vida (BRAMBELL, 1958; LEECE; MORGAN, 1962). Após este período, surge uma nova geração de células enterocíticas, adultas com características diferenciadas das células fetais e impermeáveis à absorção de macromoléculas.

A primeira geração de células adultas que se estabelece após o fechamento intestinal não possui as mesmas características das células fetais, são consideradas células maduras e incapazes de absorver macromoléculas (BESSI et al., 2002a; CAMPBELL; SIEGEL; KNOWLTON, 1977; SMEATON; SIMPSON-MORGAN, 1985). Quanto mais precocemente o recém-nascido receber colostro, maior será a eficiência de absorção e mais rapidamente ocorrerá o processo de fechamento, situação benéfica para a proteção do animal contra microrganismos que potencialmente podem também ser absorvidos pelo trato intestinal (LECCE; MORGAN, 1962).

Os mecanismos que promovem o fechamento intestinal não são bem conhecidos. Contudo, sabe-se que vários fatores contribuem para a ocorrência de condições ideais para a absorção de anticorpos como também para o fechamento intestinal. Podem ser citados os fatores presentes no colostro, a substituição das células enterocíticas, mecanismos endócrinos, fatores estressores fisiológicos e do ambiente, prematuridade, desenvolvimento gástrico, início da ingestão de alimentos sólidos (LEECE; MORGAN, 1962; JEFFCOTT, 1972; STOTT et al., 1979; KRUSE, 1983; HOUGH et al., 1990; MACHADO NETO et al., 1997; JENSEN, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de coleta e de processamento das amostras

A parte experimental de campo foi conduzida durante o segundo semestre de 2009, nas instalações do Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos - SIPOC pertencente ao Departamento de Zootecnia, ESALQ/USP.

As análises laboratoriais foram executadas no Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal - LAFA e Laboratório de Histologia, do referido departamento, ESALQ/USP. A liofilização do colostro bovino foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Análise Experimental, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ/USP e as análises bromatológicas das refeições, no laboratório CBO Assessoria & Análise, Campinas, SP.

3.2 Animais e Tratamentos

Foram utilizados 33 cabritos machos recém-nascidos, mestiços oriundos do cruzamento das raças Saanen e Boer. Após o nascimento, 30 cabritos foram separados de suas mães, submetidos à assepsia umbilical, pesados e distribuídos aleatoriamente em dois grupos, sendo 15 animais aleitados com colostro bovino liofilizado – CBL; e 15 animais aleitados com colostro caprino - CC. Os animais receberam refeições de colostro, com concentração de 55 mg/mL de IgG, em quantidades correspondentes a 5% do peso vivo, às 0, 7 e 14 horas de vida. Três animais recém-nascidos não receberam colostro e foram sacrificados logo após o nascimento, constituindo o grupo zero hora. Um cabrito do grupo CC morreu antes do término do período experimental. Os animais experimentais foram mantidos e tratados de acordo com os padrões aceitos para o tratamento humanitário de animais (autorizado pelo Comitê de Ética do FZEA/USP).

3.3 Banco de colostro

Pools de colostro bovino e caprino foram coletados e preparados previamente ao experimento, utilizando a primeira secreção láctea de vacas sadias e cabras. Os *pools* foram homogeneizados, estimada a concentração de imunoglobulinas pelo método de imunodifusão radial, fracionados em pastilhas de 300 mL e armazenados a -20°C.

Para a formação do colostro bovino liofilizado, as pastilhas congeladas do *pool* bovino foram encaminhadas para o Laboratório de Bioquímica e Análise Experimental, onde foi realizada a liofilização. Para a obtenção do pó, o material foi triturado e armazenado em um recipiente hermeticamente vedado a -20°C.

No momento do fornecimento, o colostro caprino foi diluído com leite integral até atingir a concentração de 55 mg/mL de IgG. O colostro bovino liofilizado foi ressuspenso em água recompondo sua condição inicial e diluído com leite integral até atingir a concentração de IgG desejada (55mg/mL).

4 Coleta de amostras

4.1 Colostro

Amostras dos *pools* de colostro bovino e colostro caprino foram coletadas e mantidas a -20°C para as análises bromatológica e quantificação de IGF-I.

4.2 Tecidos intestinais

Cinco cabritos de cada tratamento foram sacrificados em cada horário de abate (18, 36 e 96 horas de vida) para a coleta de amostras do intestino delgado. Três animais foram abatidos logo após o nascimento, sem a ingestão de colostro (grupo zero hora). Nos horários de abate, os cabritos foram pesados, anestesiados com xilazina e

quetamina e exsangüinados através do corte da jugular. Amostras do duodeno, jejuno médio e íleo foram coletadas para análises histológicas.

5 Análises laboratoriais

5.1 Análise bromatológica das refeições de colostro

As refeições de colostro bovino liofilizado e colostro caprino foram analisadas para quantificação de matéria seca, proteína bruta, umidade e voláteis de acordo com A.O.A.C. (2000). Os valores bromatológicos das refeições são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição bromatológica das refeições de colostro bovino liofilizado e colostro caprino, oferecidas aos cabritos durante o período experimental

Composição (%)	Colostro bovino liofilizado	Colostro caprino
Matéria Seca	19,29	27,78
Umidade e voláteis	80,72	72,22
Proteína Bruta*	9,20	16,23
Extrato Etéreo*	5,03	11,74

*Valores analíticos expressos em 100% de matéria seca

5.2 Imunoglobulina G no colostro bovino e colostro caprino

A quantificação da imunoglobulina G no colostro bovino e colostro caprino foi realizada por imunodifusão radial - IDR (MANCINI et al., 1965, modificado por BESSER, 1985). A técnica foi realizada em placas de agarose 1,2% contendo anti-IgG bovina ou anti-IgG caprina (Sigma Chemicals Company – USA). Foram utilizadas como padrão

IgG caprina e IgG bovina (Sigma Chemicals Company-USA). Repetições com variação acima de 5% foram analisadas novamente e as concentrações expressas em mg/mL. A concentração de IgG obtida durante este procedimento foi utilizada para determinar a diluição dos *pools* bovino e caprino até 55 mg/mL de IgG.

5.3 Fator do crescimento semelhante à insulina tipo I - IGF-I no colostro bovino liofilizado e colostro caprino

O IGF-I presente nos colostros foi quantificado por ensaio imunoenzimático pós-extração utilizando-se o kit IGF-I EIASIA KAP1581 (DiaSource Immunoassays S.A.). Para tal, 100 μ L de amostra e 400 μ L de solução de pré-tratamento (etanol ácido) foram incubados por 30 minutos e depois centrifugados quinze minutos a 4.400 g. O sobrenadante (100 μ L) foi separado e adicionado a 600 μ L de solução de neutralização.

Foram adicionados 50 μ L dos padrões, controles e amostras extraídas aos poços da microplaca revestida com anti-IGF-I. A seguir, adicionou-se 100 μ L de IGF-I-HRP (IGF-I conjugado com a enzima horseradish peroxidase), seguindo-se incubação por uma hora em temperatura ambiente. A placa foi, então, lavada três vezes com 400 μ L de solução de lavagem. Posteriormente, foi adicionada a cada poço 100 μ L de solução cromogênica em até 15 minutos. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, 100 μ L de solução de parada foi adicionado e a absorbância lida em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 450 nm (filtro de referência 650 nm). As amostras foram analisadas em duplicata, sendo o valor médio utilizado para se obter as concentrações de IGF-I em ng mL^{-1} .

5.4 Microscopia óptica

Amostras de 5x5 cm de comprimento foram retiradas do duodeno, jejuno médio e íleo, abertas longitudinalmente em papel filtro, lavadas com solução salina 0,9% e esticadas em placas de petri com o auxílio de alfinetes.

Os tecidos foram, então, fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio – PBS, 0,1M, pH 7.2, por 30 minutos. Decorrido o tempo, as amostras foram repicadas em segmentos de 3x3 mm e armazenadas novamente em solução de paraformaldeído 4% em PBS a 3°C, por 24 horas. Procedendo-se esta etapa inicial, o tecido foi lavado quatro vezes com PBS. Após permanecer armazenado nesta solução *overnight* a 3°C, o tecido sofreu desidratação lenta pela passagem em banhos de concentrações crescentes de etanol, 30%, 50%, 70% e 90%, por de dez minutos e em etanol 100%, duas vezes por 20 minutos.

A etapa seguinte consistiu na pré-infiltração com solução de resina glicol metacrilato (JB-4, Polyscience Inc.) diluída em etanol 100% na proporção 1:3. Passando-se para a infiltração em resina pura a 3°C. Os tecidos foram, então, incluídos em resina plástica (JB-4, Polyscience Inc.) a 3°C em estado de anaerobiose.

Os blocos de historesina contendo os tecidos foram seccionados por navalha de aço no micrótomo (Leica RM 2125RT), obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. O espaçamento adotado entre cada secção do tecido intestinal foi de dez cortes não sequenciais (BÜHLER et al., 1998; PAULETTI et al., 2007). Foram confeccionados dois laminários, sendo um para análise histomorfométrica e estereológica e outro para análise imunohistoquímica e histológica. As características histológicas do intestino delgado dos cabritos foram avaliadas em ambos os laminários.

5.5 Morfometria dos segmentos intestinais

Os cortes histológicos utilizados para a análise histomorfométrica foram corados com uma solução de ácido cítrico, fosfato bifásico anidro e azul de toluidina, obtendo assim um corante azul de toluidina 0,05%, pH 4,5 (SAKAI, 1973). As lâminas foram montadas com permount e analisadas em aumento de 10X utilizando-se um sistema de análise de imagens acoplado a um microscópio (Top Light B2) com monitor integrado (BEL Engineering srl – Italy). Após captadas, as imagens dos cortes foram analisadas no programa de análise de imagens Bel MicroImage Analyzer. As variáveis

morfométricas analisadas foram: altura de vilosidade, profundidade de cripta e espessura da túnica muscular.

A altura de 20 vilosidades foi medida a partir da região basal da vilosidade, coincidente com a porção superior das criptas, até o ápice da mesma. Vinte criptas foram medidas da base até o início da vilosidade adjacente (região de transição cripta/vilosidade) (Figura 1 A e B). A espessura da túnica muscular de 15 cortes foi mensurada (Figura 1B).

Figura 1 - Morfometria da altura da vilosidade, profundidade da cripta no duodeno de cabritos (A) e altura da vilosidade, profundidade da cripta e espessura da túnica muscular no jejuno de cabritos (B), aumento de 10x. Barra=100µm

5.5.1 Estereologia

A estereologia é uma técnica histomorfométrica usada para quantificar estruturas tridimensionais a partir de cortes bidimensionais (BADDELEY et al., 1986). Para que possam ser utilizados os métodos estereológicos, os cortes analisados devem ser isotrópicos. Em função da mucosa do intestino delgado não possuir estruturas de orientação fixa, ou seja, apresentarem condição anisotrópica. Baddeley et al. (1986) propuseram o método de estereologia de cortes verticais, que se aplica a cortes que se apresentam perpendicularmente a uma superfície "horizontal", representada por um plano existente nas estruturas avaliadas. No presente estudo, foi considerado como plano "horizontal" o limite entre a mucosa e a submucosa.

Imagens foram obtidas a partir dos cortes histológicos utilizando-se um sistema de análise de imagens acoplado a um microscópio (Top Light B2) com monitor integrado (BEL Engineering srl – Italy). Para cada segmento de cada animal foram analisados 5 campos em aumento de 10X.

A análise estereológica para determinação do volume parcial (V_v) e densidade de superfície (S_v) da mucosa absorptiva do duodeno, jejuno e íleo foi realizada por meio de sobreposição de um sistema teste do tipo ciclóide nas imagens dos cortes, com 35 arcos ciclóides e 70 pontos teste (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática do sistema teste de arcos ciclóides
 Fonte: BADDELEY et al. (1986)

O volume parcial (V_v) da mucosa absorptiva, expresso em porcentagem, foi obtido pelo número de pontos teste sobre a superfície da mucosa e o número total de pontos na grade (BADDELEY et al., 1986; VAN GINNEKEN et al., 2002). A densidade de superfície (S_v) da mucosa absorptiva, expressa em mm^2/mm^3 , foi calculada com base no número de intersecções dos arcos ciclóides sobre a superfície da mucosa, comprimento do arco ciclóide presente no grid tipo ciclóide e o número de pontos testes sobre a superfície da mucosa entérica (VAN GINNEKEN et al., 2002).

$$V_v = \Sigma P (\text{MUCOSA}) / \Sigma P (\text{VOLUME REFERENCIAL}). 100 \quad (1)$$

Em que:

$\Sigma P (\text{mucosa})$ = número de pontos do sistema teste sobre a camada específica em análise;

$\Sigma P (\text{volume referencial})$ = número total de pontos na grade.

$$S_v = 2 * \Sigma I (\text{MUCOSA}) / l (p) * \Sigma P (\text{MUCOSA}) \quad (2)$$

Em que:

$\Sigma I (\text{mucosa})$ = número de intersecções dos arcos ciclóides sobre a camada específica em análise;

$l (p)$ = comprimento do arco ciclóide (mm);

$\Sigma P (\text{mucosa})$ = número de pontos do sistema teste sobre a camada específica em análise.

5.6 Células caliciformes

Para a identificação e quantificação de células caliciformes foram utilizadas 15 vilosidades orientadas por segmento do intestino delgado (MASHIMO et al., 1996). Imagens dos cortes histológicos foram obtidas e analisadas em aumento de 10X, utilizando-se um sistema de análise de imagens acoplado a um microscópio (Top Light B2) com monitor integrado (BEL Engineering srl – Italy).

5.7 Imunohistoquímica

Para a localização da absorção de IgG nos segmentos intestinais, os cortes histológicos foram incubados por 29 minutos em PBS (0,01M, pH 7.6) adicionado de

tween 20 (monolaurato de polioxietilenosorbitol). Procedeu-se o tratamento com HCl 1N, pré-aquecido a 40°C por 60 minutos e subseqüentes lavagens com PBS. Os cortes foram, então, pré-tratados em tripsina (0,02-0,05% w/v diluído em água destilada) pré-aquecida (40°C) e mantidos em câmara úmida a 37°C, por 20 minutos. Após três lavagens de três minutos cada com PBS, os cortes foram desnaturados com peróxido de hidrogênio 3% por três minutos. A reação foi cessada pela incubação com soro de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 20 minutos a temperatura ambiente.

Os anticorpos primários anti-IgG caprina ou anti-IgG bovina, produzidos em coelho (Sigma Chemicals Company, USA), foram adicionados sobre os cortes histológicos dos animais que receberam colostro caprino ou colostro bovino liofilizado, respectivamente, em câmara úmida, permanecendo por 15 horas a 3°C. O anticorpo secundário biotilado contra imunoglobulinas de coelho, produzido em cabra (Vectastain ABC Kit PK-4002 – Vector Laboratories, Burlingame, CA), foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente.

Decorrido o tempo, foram adicionados aos cortes avidina desidrogenase e horseradish peroxidase biotinalada (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 30 minutos. A localização da peroxidase no tecido e, conseqüentemente, da IgG caprina ou bovina, foi revelada com a solução contendo 3,3' diamino-benzidina (DAB Substract Kit SK-4100 - Vector Laboratories Burlingame, CA). Os cortes foram corados com azul de toluidina, por um período máximo de 30 segundos.

Como controle positivo foi realizado este mesmo procedimento imunohistoquímico no baço de caprinos.

5.8 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Para a análise das variáveis histomorfométricas, estereológicas e de células caliciformes foi considerado um arranjo fatorial 2x3+1, tendo como efeitos principais o tipo de colostro fornecido (colostro bovino liofilizado ou colostro caprino), os três horários de abate (18, 36 e 96 horas de vida) e o grupo zero hora (animais abatidos sem ingestão de colostro,

logo após o nascimento). Para a execução das análises estatísticas, as variáveis foram submetidas à análise de variância para tal delineamento e realizado teste para avaliação das diferenças entre médias utilizando-se o método de Tukey, através do procedimento PROC MIXED do programa SAS[®], versão 8 para Windows[®] (2008). Para todas as análises foi utilizado nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$). O peso ao nascimento foi utilizado inicialmente como co-variável em todas as variáveis analisadas.

São apresentadas as médias dos quadrados mínimos $\pm$ erros padrão (Least Squares Means) referente aos tratamentos (CBL e CC), horários experimentais (0, 18, 36 e 96 horas de vida) e segmentos intestinais (duodeno, jejuno médio e íleo).

Quando a pressuposição de normalidade dos dados não foi atendida, estes foram transformados em log na base 10, analisados e apresentadas as médias geométricas dos quadrados mínimos (Least Squares Means) retransformadas 10^x seguida por intervalos de confiança de 95%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Fator do crescimento semelhante à insulina tipo I no colostro bovino liofilizado e no colostro caprino

As concentrações de IGF-I no colostro bovino liofilizado e colostro caprino foram 158,71 e 356,32 ng/mL⁻¹, respectivamente.

Na literatura são encontrados inúmeros trabalhos estudando o efeito do fornecimento de colostro e a influência dos componentes bioativos como os IGFs presentes nesta secreção, sobre as características histológicas do epitélio intestinal (BURRIN et al., 1996; ODLE et al., 1996; XU, 1996; BLUM; HAMMON, 2000; BLÄTTER et al., 2001; PAULETTI et al., 2007; MORETTI et al., 2010), contudo estudos em caprinos são escassos.

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina – IGF-I e IGF-II que fazem parte da família da insulina agem como fatores de crescimento e apesar do fígado ser o principal órgão responsável pela síntese, muitos tecidos são capazes de sintetizar, incluindo a glândula mamária e o trato gastrointestinal (CORDANO et al., 2000; PENCHEV GEORGIEV et al., 2008; DROZDOWSKI; THOMSON, 2009).

Os IGFs de origem exógena, especialmente ingeridos com o colostro, os endógenos, produzidos pela mucosa entérica, bem como os séricos, podem potencializar o desenvolvimento e a maturação do trato gastrointestinal após a ligação com seus receptores, que estão localizados principalmente nas células da cripta intestinal (ODLE et al., 1996; XU, 1996; BLUM; BAUMRUCKER, 2002; HAMMON; BLUM, 2002; PENCHEV GEORGIEV et al., 2003; BAGALDO et al., 2007).

Roffler et al. (2003) ao fornecerem extrato de colostro adicionado de IGF-I à bezerros neonatos, verificaram efeito positivo sobre o trato intestinal, os quais apresentaram maior tamanho de vilosidades quando comparados aos animais controle, alimentados somente com leite. De modo contrário, efeito significativo do fornecimento de IGF-I sobre a morfometria intestinal de bezerros não foi encontrado por Pauletti et al. (2007).

No presente estudo a concentração de $158,71 \text{ ng/mL}^{-1}$ de IGF-I no colostro bovino liofilizado e $356,32 \text{ ng/mL}^{-1}$ no colostro caprino estão dentro da variação de concentração encontrada por Simmem; Simmem; Reihnart (1988), os quais com valores de 50 a 500 ng/mL de IGF-I. Contudo, a concentração de IGF-I encontrada no presente estudo é inferior ao comparar com $874,53 \pm 335,02 \text{ ng/mL}$ de IGF-I encontrado por Pauletti et al. (2005).

6.2 Morfometria dos segmentos intestinais

6.2.1 Altura das vilosidades intestinais

As médias das alturas das vilosidades (μm) nos segmentos intestinais dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nos horários experimentais encontram-se apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Altura das vilosidades (μm) no duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida

Horários experimentais (média - intervalo de confiança)						Probabilidade		
Duodeno*	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	862,08 (437,52 - 1.327,39)	644,17 (480,84 - 862,98)	553,35 (358,10 - 853,10)	529,66 (348,34 - 803,53)	568,85 (479,73 - 674,53)	0,0863	0,9863	0,4643
CC	862,08 (437,52 - 1.327,39)	424,62 (316,96 - 316,96)	474,24 (270,40 - 829,85)	495,45 (349,14 - 704,69)	463,45 (396,28 - 543,25)			
Média geral	862,08 (437,52 - 1.327,39)	644,17 (480,84 - 862,98)	553,35 (358,10 - 853,10)	514,04 (415,91 - 635,33)				

Horários experimentais (média $\pm$ erro padrão)						Probabilidade		
Jejuno	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	825,21 $\pm$ 92,13	877,97 $\pm$ 69,66	1.024,47 $\pm$ 70,00	920,51 $\pm$ 69,92	940,99 $\pm$ 40,21	0,4799	0,0167	0,5839
CC	825,21 $\pm$ 92,13	864,53 $\pm$ 69,91	1.149,70 $\pm$ 69,65	934,00 $\pm$ 79,00	982,74 $\pm$ 41,88			
Média geral	825,21 $\pm$ 92,13 ^b	871,25 $\pm$ 49,41 ^b	1.087,09 $\pm$ 49,43 ^a	927,26 $\pm$ 53,15 ^{ab}				

Íleo	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	586,94 $\pm$ 113,61	680,28 $\pm$ 72,72	829,87 $\pm$ 72,89	627,69 $\pm$ 73,33	712,61 $\pm$ 42,01	0,5875	0,4518	0,3411
CC	586,94 $\pm$ 113,61	638,49 $\pm$ 72,83	667,61 $\pm$ 72,72	721,73 $\pm$ 115,05	675,94 $\pm$ 51,47			
Média geral	586,94 $\pm$ 113,61	659,38 $\pm$ 51,45	748,74 $\pm$ 51,46	674,71 $\pm$ 68,08				

^{ab}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre os horários experimentais pelo teste de Tukey (P<0,05)

CBL – animais que receberam colostro bovino liofilizado; CC – animais que receberam colostro caprino

*Dados retransformados (10^x), (x-y) intervalo de confiança de 95%

A altura das vilosidades não diferiu entre os tratamentos, horários experimentais e não houve interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$) no duodeno e íleo. Testou-se como co-variável o peso ao nascimento, não sendo o mesmo significativo ($P>0,05$) em nenhum segmento intestinal. No jejuno não houve diferença entre os tratamentos e interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$). Neste segmento verificou-se efeito significativo do horário experimental ($P<0,05$) sobre a altura das vilosidades.

Vários estudos demonstram que as características do trato gastrintestinal e o desenvolvimento pós-natal são influenciados pela ingestão de colostro (TRAHAIR; ROBINSON, 1989; BÜHLER et al., 1998; BLÄTTLER et al., 2001; HAMMON; BLUM, 2002; BESSI et al., 2002ab; ROFFLER et al., 2003; MEI et al., 2006; KINDLEIN et al., 2008b). No presente estudo, as duas dietas, colostro bovino liofilizado e colostro caprino, não influenciaram a altura das vilosidades nos três segmentos intestinais ($P>0,05$). Estes resultados concordam com Jensen et al. (2001) que ao fornecerem colostro suíno ou colostro bovino para leitões recém-nascidos, não verificaram diferença na altura das vilosidades. Bühler et al. (1998) e Bittrich et al. (2004), da mesma forma, não verificaram efeito da ingestão de colostro sobre a morfometria das vilosidades nos segmentos distais do intestino delgado de bezerros.

Roffler et al. (2003) verificaram máximo comprimento das vilosidades acompanhado de uma elevada taxa de proliferação das células das criptas, em bezerros após a ingestão de extrato de colostro, quando comparado à animais controle alimentados com leite. Concomitantemente à elevada proliferação celular, ocorreu a renovação da mucosa intestinal, e aumento no tempo de vida dos enterócitos. Correlação negativa entre o tamanho das vilosidades e a taxa de proliferação celular nas criptas também foi encontrada por Sauter et al. (2004), Blättler et al. (2001) e Bittrich et al. (2004). Segundo Blättler et al. (2001) o fornecimento de colostro por tempo prolongado pode reduzir a apoptose sendo este fato justificado em função dos fatores de crescimento presentes no colostro.

A altura das vilosidades no jejuno dos cabritos às 36 horas foi 24,1% e 19,7% maior em relação aos animais à zero e às 18 horas, respectivamente. Resultado que pode estar refletindo um aumento da proliferação celular esperado para 18 horas, com

uma menor taxa de renovação às 36 horas, compatível a um processo de absorção menos intenso comparado anterior. Em ovinos, de acordo com Moretti et al. (2010), o período de maior proliferação celular foi registrado às 24 horas comparado a cordeiros à zero e 72 horas de vida.

A maior altura das vilosidades normalmente está relacionada à elevada atividade celular no período em que ocorre intensa absorção de imunoglobulinas, à quantidade de nutrientes e aos fatores de crescimento como os IGFs, presentes no colostro, atuando principalmente na porção proximal do intestino (BÜHLER et al., 1998; BLÄTTLER et al. 2001). Burrin et al. (1996) e Houle et al. (1997), trabalhando com leitões, encontraram efeito positivo do IGF-I na altura das vilosidades do jejuno, salientando a importância dos fatores de crescimento para o desenvolvimento entérico.

Da mesma forma, as proteínas, gorduras também atuam estimulando o desenvolvimento e a maturação do trato gastrointestinal (BÜHLER et al., 1998; BLÄTTLER et al., 2001; ROFFLER et al., 2003; SAUTER et al., 2004; PAULETTI et al., 2007; KINDLEIN et al., 2008a; MORETTI et al., 2010). No presente estudo, a quantidade de proteína, gordura e IGF-I no colostro de origem caprina e bovina, não revelaram influência sobre a morfometria das vilosidades dos segmentos intestinais. O resultado de IGF-I encontrado no presente estudo concorda com Pauletti et al. (2007), os quais verificaram que o fornecimento de níveis de IGF-I no colostro não afetou as características morfométricas da mucosa do intestino delgado de bezerros até 7 dias de vida.

Bessi et al. (2002a), estudando a variação da forma e o tamanho das vilosidades em bezerros ao microscópio eletrônico de varredura, observaram que no terceiro dia de vida houve redução na altura das vilosidades, representando um diferente estágio de maturação das células epiteliais do intestino delgado de bezerros. No presente estudo, a altura das vilosidades dos cabritos às 96 horas foi semelhante aos outros horários experimentais, indicando homogeneidade, apesar de, neste horário experimental serem encontradas células epiteliais em diferente estágio de maturação.

Ao comparar as médias das alturas das vilosidades (μm), independente do tratamento, verificou-se que não houve diferença entre os horários experimentais e interação entre segmento intestinal e horário experimental ($P>0,05$). A altura das

vilosidades apresentou-se diferente entre os segmentos intestinais ($P<0,05$), como ilustrado na Figura 3.

^{AB} Médias seguidas de letras diferentes diferem entre os segmentos intestinais pelo teste de Tukey ($P<0,05$)

Figura 3 - Valores médios (média $\pm$ erro padrão) da altura das vilosidades (µm) por segmento intestinal

A altura das vilosidades no jejuno diferiu significativamente do duodeno e íleo ($P<0,05$), sendo 30,7% superior ao duodeno e 24,2% superior ao íleo, fato que pode estar relacionado com a intensa atividade de absorção das imunoglobulinas do colostro, observada neste segmento intestinal. Segundo Kaup et al. (1996) as regiões do intestino delgado possuem diferentes potenciais de absorção, sendo as regiões distais as mais ativas.

Resultados semelhantes para a altura das vilosidades foram encontrados por Blättler et al. (2001), Bittrich et al. (2004) e Sauter et al. (2004) os quais também verificaram maior comprimento das vilosidades no jejuno de bezerros após a ingestão de colostro. Da mesma forma, Pauletti et al. (2007) verificaram que o jejuno apresentou as maiores variações na morfometria, diferindo dos demais segmentos ao nascimento e

aos sete dias de idade, com exceção dos animais abatidos aos dois dias. Este fato, segundo os autores, pode estar relacionado com a fase transitória do epitélio pós-absortivo. Sauter et al. (2004), ao fornecerem colostro e leite para bezerros por 3 dias, ambas dietas equivalentes nutricionalmente, observaram vilosidades mais longas no jejuno e íleo dos animais que receberam colostro.

6.2.2 Profundidade das criptas intestinais

As médias para as profundidades das criptas (μm) nos segmentos intestinais dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nos horários experimentais encontram-se apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Profundidade da cripta (μm) do duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida

Horários experimentais (média $\pm$ erro padrão)						Probabilidade		
Duodeno	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário*
CBL	156,53 $\pm$ 29,34	170,66 $\pm$ 11,05	148,72 $\pm$ 9,96	159,99 $\pm$ 9,91	159,79 $\pm$ 5,94	0,7816	0,2537	0,0495
CC	156,53 $\pm$ 29,34	135,21 $\pm$ 11,05	158,27 $\pm$ 11,08	178,53 $\pm$ 11,18	157,34 $\pm$ 6,38			
Média geral	156,53 $\pm$ 29,34	153,93 $\pm$ 7,81	153,49 $\pm$ 7,48	169,26 $\pm$ 7,51				
Jejuno	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	88,15 $\pm$ 14,10	109,27 $\pm$ 11,00	127,83 $\pm$ 11,06	158,42 $\pm$ 11,05	131,84 $\pm$ 6,35	0,4900	0,0001	0,8251
CC	88,15 $\pm$ 14,10	95,78 $\pm$ 11,04	128,08 $\pm$ 11,00	152,31 $\pm$ 12,48	125,39 $\pm$ 6,61			
Média geral	88,15 $\pm$ 14,10 ^b	102,53 $\pm$ 7,80 ^b	127,95 $\pm$ 7,81 ^{ab}	155,37 $\pm$ 8,39 ^a				
Íleo	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	122,81 $\pm$ 17,46	138,45 $\pm$ 11,19	147,60 $\pm$ 11,23	128,99 $\pm$ 11,26	138,34 $\pm$ 6,46	0,7824	0,2028	0,9415
CC	122,81 $\pm$ 17,46	142,79 $\pm$ 11,22	153,52 $\pm$ 11,19	126,81 $\pm$ 14,49	141,04 $\pm$ 7,14			
Média geral	122,81 $\pm$ 17,46	140,62 $\pm$ 7,92	150,56 $\pm$ 7,92	127,90 $\pm$ 9,21				

CBL – animais que receberam colostro bovino liofilizado; CC – animais que receberam colostro caprino

* Diferença entre as médias para a interação não foi detectada pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) para a profundidade das criptas entre os tratamentos nos três segmentos intestinais. O peso dos cabritos ao nascer, testado inicialmente como co-variável, não influenciou a profundidade das criptas no duodeno e íleo ($P>0,05$), sendo significativo no jejuno ($P<0,05$).

No duodeno dos cabritos verificou-se interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$), contudo, ao realizar a comparação entre as médias pelo teste de Tukey, não foi revelada a diferenças entre as médias para a interação. No jejuno houve diferença ($P<0,05$) para a profundidade das criptas entre os horários experimentais e não verificou-se efeito da interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$). No íleo não houve efeito do horário experimental e interação entre tratamento e horário experimental sobre a profundidade das criptas ($P>0,05$). Resultados semelhantes para esta variável, no íleo, foram encontrados por Blättler et al. (2001) e Sauter et al. (2004).

Estudos têm demonstrado que o fornecimento de colostro por tempo prolongado influencia o desenvolvimento do intestino delgado, pois estimula a proliferação das células epiteliais e a profundidade das criptas (ODLE et al., 1996; BÜHLER et al., 1998; BLÄTTLER et al., 2001; BITTRICH et al., 2004). No presente estudo, as duas dietas, colostro bovino liofilizado e colostro caprino, não influenciaram a profundidade das criptas nos segmentos intestinais ($P>0,05$).

No jejuno às 96 horas de vida, verificou-se que a profundidade das criptas, aumentou significativamente, sendo 43,3% e 34,0% maior que nos animais à zero e 18 horas, respectivamente. Este aumento provavelmente está relacionado com o final do processo de absorção de imunoglobulinas e a necessidade de proliferação celular para a renovação epitelial por células adultas e maduras, após o período absorptivo. Às 96 horas de vida, após um intenso processo de absorção de macromoléculas, detectado às 18 e 36 horas, ocorreu provavelmente o fechamento do epitélio intestinal aos anticorpos. Esta condição pode ter estimulado a proliferação celular e conseqüentemente aumento na profundidade das criptas, para renovação dos enterócitos após a apoptose.

Aumento na profundidade das criptas também foi verificado por Bittrich et al. (2004) em bezerros aos oito dias de vida, por Jensen et al. (2001) em leitões aos dois dias e por Mei et al. (2006) em leitões no primeiro dia de vida, alimentados com colostro bovino, colostro bovino adicionado de plasma suíno e colostro suíno, respectivamente.

As criptas de Lieberkühn são glândulas intestinais compostas por células tronco, localizadas na base das depressões. Estas células são proliferativas e, após a diferenciação e especialização, migram para o epitélio luminal. São responsáveis pela reposição das células que compõem as vilosidades (GRANT; SPECIAN, 1998; BLÄTTLER et al., 2001; DROZDOWSKI; CLANDININ; THOMSON, 2010). Segundo Castro-Alonso et al. (2008), os enterócitos apoptóticos estão relacionados ao processo absorptivo de IgG. Assim, sugere-se que quanto mais intenso o processo de absorção de macromoléculas, maior será a atividade dos mecanismos celulares e mais rapidamente ocorrerá a apoptose para renovação celular (MORETTI et al., 2010).

Independente dos tratamentos, CBL ou CC, verificou-se diferenças entre os segmentos intestinais, horários experimentais e interação entre segmento intestinal e horário experimental ($P < 0,05$), sendo as médias ilustradas na Figura 4. O peso dos cabritos ao nascer, testado inicialmente como co-variável, exerceu efeito sobre a profundidade das criptas ($P < 0,05$).

Horários experimentais

^{AB}Médias seguidas de letras diferentes no mesmo horário experimental diferem entre os segmentos intestinais pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) ^{ab}Médias seguidas de letras diferentes diferem entre os horários experimentais pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 4 - Valores médios (média $\pm$ erro padrão) da profundidade da cripta para a interação entre segmento intestinal e horário experimental

Ao comparar os horários experimentais dentro de segmento intestinal, verificou-se que a profundidade das criptas não diferiu nos cabritos à zero hora e às 96 horas no duodeno e íleo ($P > 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados por Mei et al. (2006).

Às 18 horas pôde ser observado que o duodeno apresentou 48,4% maior profundidade das criptas do que o jejuno. Este comportamento no jejuno, provavelmente esta relacionado ao processo absorptivo, fase em que os enterócitos estão em plena atividade, enquanto na cripta, há predominância de células com baixa atividade de proliferação e diferenciação.

Às 96 horas de vida, a profundidade da cripta foi 23,2% maior no duodeno quando comparada ao íleo ($P < 0,05$), sendo que ambos os segmentos intestinais não

diferiram ($P>0,05$) do jejuno, neste mesmo horário experimental. No jejuno pôde ser verificado, às 96 horas de vida, criptas 41,5%, 33,1% e 16,8% mais profundas quando comparadas aos outros horários experimentais (0,18 e 36 horas, respectivamente), fato pode estar relacionado a um comportamento compensatório de renovação epitelial que ocorre após o encerramento da absorção das macromoléculas do colostro, como já discutido anteriormente.

Através da profundidade das criptas podemos avaliar o potencial proliferativo das células epiteliais, pois a cripta é o local onde ocorre a atividade mitogênica. A proliferação celular, verificada quando há incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) ao DNA das células esta diretamente relacionada à profundidade das criptas (ROFFLER et al., 2003; BITTRICH et al., 2004). Moretti et al. (2010) trabalhando com cordeiros encontraram máximos valores de mitose, em todos os segmentos intestinais às 24 horas de vida, explicado pelos autores como reflexo da influência do colostro, rico em fatores bioativos, sobre a atividade mitogênica no intestino delgado. Ainda segundo Moretti et al. (2010) e Sauter et al. (2004) ao determinar a taxa de proliferação celular em ovinos e bezerros, respectivamente, verificaram no jejuno as maiores porcentagens de células marcadas com BrdU, ou seja, em mitose.

6.2.3 Espessura da túnica muscular

As médias para as espessuras da túnica muscular (μm) nos segmentos intestinais dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nos horários experimentais são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Espessura da túnica muscular (μm) do duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida

Horários experimentais (média $\pm$ erro padrão)						Probabilidade		
Duodeno	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	202,16 $\pm$ 34,61	174,21 $\pm$ 26,92	152,71 $\pm$ 24,26	216,97 $\pm$ 24,14	181,29 $\pm$ 14,47	0,1603	0,1839	0,1385
CC	202,16 $\pm$ 34,61	166,23 $\pm$ 26,93	245,75 $\pm$ 27,00	225,05 $\pm$ 27,25	212,34 $\pm$ 15,55			
Média geral	202,16 $\pm$ 34,61	170,22 $\pm$ 19,03	199,23 $\pm$ 18,23	221,01 $\pm$ 18,30				
Jejuno	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	84,17 $\pm$ 21,43	117,23 $\pm$ 16,57	112,46 $\pm$ 16,65	139,94 $\pm$ 16,63	123,21 $\pm$ 9,56	0,5626	0,0878	0,3296
CC	84,17 $\pm$ 21,43	80,77 $\pm$ 16,63	125,29 $\pm$ 16,57	139,19 $\pm$ 18,79	115,08 $\pm$ 9,96			
Média geral	84,17 $\pm$ 21,43	99,00 $\pm$ 11,75	118,87 $\pm$ 11,76	139,57 $\pm$ 12,64				
Íleo	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	60,76 $\pm$ 9,69	87,86 $\pm$ 6,21	98,95 $\pm$ 6,23	106,84 $\pm$ 6,25	97,88 $\pm$ 3,58	0,1122	0,0017	0,2355
CC	60,76 $\pm$ 9,69	74,29 $\pm$ 6,23	103,37 $\pm$ 6,94	88,84 $\pm$ 8,04	88,83 $\pm$ 4,10			
Média geral	60,76 $\pm$ 9,69 ^b	81,08 $\pm$ 4,40 ^{bc}	101,16 $\pm$ 4,66 ^a	97,84 $\pm$ 5,11 ^{ac}				

^{abc} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre os horários experimentais pelo teste de Tukey (P<0,05)

CBL – animais que receberam colostro bovino liofilizado; CC – animais que receberam colostro caprino

Os valores para a espessura da túnica muscular não diferiram significativamente entre os tratamentos, bem como não foi encontrada interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$) no duodeno, jejuno e íleo dos cabritos. O peso dos cabritos ao nascer, testado inicialmente como co-variável, não influenciou a espessura da túnica muscular ($P>0,05$) em todos os segmentos intestinais estudados.

No duodeno e jejuno, não se verificou efeito do horário experimental ($P>0,05$) sobre a espessura da túnica muscular. No íleo, a espessura da túnica muscular apresentou-se diferente ($P<0,05$) entre os horários experimentais.

Conforme a Tabela 4, no íleo dos cabritos à zero hora, verificou-se a presença de uma túnica muscular mais delgada comparada aos animais às 36 e 96 horas. Nestes horários a espessura da túnica muscular foi 39,9% e 37,9% mais espessa, do que nos animais à zero hora, respectivamente. Da mesma forma, os animais às 36 horas tiveram a espessura da túnica muscular 19,8% mais espessa que os animais às 18 horas. Este aumento na espessura da túnica muscular entérica, após a ingestão da primeira secreção láctea, pode estar relacionado à concentração de IGF-I presente nas dietas fornecidas aos cabritos.

Com relação à ação do IGF-I sobre a atividade celular entérica, Bagaldo et al. (2007), estudando o efeito do fornecimento de colostro bovino com diferentes concentrações de IGF-I, verificaram importante participação deste fator de crescimento sobre a maturação e proliferação celular. Da mesma forma, Sauter et al. (2004) e Odle et al. (1996) em suas revisões de literatura, citaram que o IGF-I atua positivamente no desenvolvimento do trato gastrointestinal, além de modular a atividade enzimática no intestino delgado de bezerros. Contudo, Burrin et al. (1996) ao comparar os leitões alimentados com leite adicionado de IGF-I e leitões controle, observaram que a espessura da túnica muscular não foi alterada pelo fator bioativo.

Independente dos tratamentos, CBL ou CC, verificou-se diferença na espessura da túnica muscular entre os segmentos intestinais ($P<0,05$) e entre os horários experimentais ($P<0,05$), sendo as médias apresentadas nas Figuras 5 e 6. Não houve efeito da interação entre segmento intestinal e horário experimental ($P>0,05$) e da co-variável peso ao nascer ($P>0,05$).

^{AB} Médias seguidas de letras diferentes diferem entre os segmentos intestinais pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 5 – Valores médios (média $\pm$ erro padrão) da espessura da túnica muscular (μm) por segmento intestinal

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes diferem entre os horários experimentais pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 6 – Valores médios (média $\pm$ erro padrão) da espessura da túnica muscular (μm) por horário experimental

O duodeno, independente do horário experimental, foi o segmento intestinal que apresentou a camada muscular mais espessa, sendo 43,7% e 57,6% mais espessa do que no jejuno e íleo, respectivamente. A maior espessura da túnica muscular no duodeno dos cabritos trata-se de uma condição fisiológica normal neste segmento, em função da intensa atividade digestiva.

A espessura da túnica muscular, independente de segmento, diferiu às 18 e 96 horas de vida. Às 18 horas o valor médio da túnica foi de $117,37 \pm 7,83 \mu\text{m}$, enquanto às 96 horas o valor médio foi de $153,75 \pm 8,25 \mu\text{m}$, representando um aumento de 23,6% na espessura da túnica muscular.

Fatores fornecidos exogenamente como proteínas, gorduras, carboidratos e fatores de crescimento semelhantes à insulina fornecidos através do colostro, em quantidade e qualidade, logo nas primeiras horas de vida, podem determinar diferenças no desenvolvimento da mucosa entérica nos recém-nascidos (HAMMON; BLUM, 1998; BÜHLER et al., 1998; BLÄTTLER et al., 2001; SAUTER et al., 2003; ROFFLER et al., 2003; MEI et al., 2006; PAULETTI et al., 2007; KINDLEIN et al., 2008a; GODDEN et al., 2009).

6.2.4 Volume parcial da mucosa absorptiva

Análises estereológicas foram utilizadas no presente estudo para descrever possíveis mudanças na mucosa absorptiva do intestino delgado. Como parâmetro de comparação foram utilizadas medidas do volume parcial da mucosa absorptiva – Vv e a densidade de superfície da mucosa absorptiva - Sv (BADDELEY et al., 1986; VAN GINNEKEN et al., 2002).

As médias encontradas para o Vv (%) nos segmentos intestinais dos cabritos, alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nos horários experimentais encontram-se apresentadas na Tabela 5. Testou-se o peso dos cabritos ao nascer como co-variável, contudo não houve efeito significativo deste no modelo estatístico ($P > 0,05$).

Tabela 5 - Volume parcial da mucosa absorviva (%) no duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida

Horários experimentais (média ± erro padrão)						Probabilidade		
Duodeno	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	65,89 ± 8,36	52,80 ± 6,20	62,55 ± 6,23	40,17 ± 6,24	51,84 ± 3,58	0,1553	0,2956	0,1807
CC	65,89 ± 8,36	39,20 ± 8,16	45,04 ± 6,94	46,68 ± 7,07	43,64 ± 4,22			
Média geral	65,89 ± 8,36	46,00 ± 5,13	53,80 ± 4,67	43,42 ± 4,77				
Jejuno	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	67,62 ± 4,45	83,56 ± 3,85	81,64 ± 3,47	79,32 ± 3,45	81,50 ± 2,07	0,1025	0,0855	0,2659
CC	67,62 ± 4,45	77,56 ± 3,46	83,02 ± 3,44	68,94 ± 3,90	76,51 ± 2,07			
Média geral	67,62 ± 4,45	80,56 ± 2,58	82,33 ± 2,45	74,13 ± 2,62				
Íleo	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	44,82 ± 8,35	60,22 ± 5,32	73,59 ± 5,95	59,78 ± 5,34	64,53 ± 3,20	0,4575	0,0017	0,6519
CC	46,14 ± 5,45	60,18 ± 5,34	72,94 ± 5,32	49,86 ± 6,88	60,99 ± 3,29			
Média geral	46,14 ± 5,45 ^b	60,20 ± 3,77 ^b	73,27 ± 3,99 ^a	54,82 ± 4,37 ^b				

^{ab}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre os horários experimentais pelo teste de Tukey (P<0,05)

CBL – animais que receberam colostro bovino liofilizado; CC – animais que receberam colostro caprino

No duodeno e jejuno, não foram verificadas diferenças significativas ($P>0,05$) para o Vv da mucosa absortiva entre os tratamentos, horários experimentais e não houve interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$). No íleo, não houve diferença para o Vv ocupado pela mucosa absortiva entre os tratamentos e para interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$). Houve efeito do horário experimental sobre o Vv ocupado pela mucosa absortiva ($P<0,05$), sendo que às 36 horas a mucosa absortiva apresentou maior Vv, diferindo significativamente dos cabritos nos demais horários. O Vv às 36 horas foi 38,8%, 17,8% e 25,2%, maior ($P<0,05$) que os cabritos à zero, 18 e 96 horas, respectivamente.

A diminuição do volume parcial ocupado pela mucosa absortiva também foi encontrada em bezerros aos sete dias de vida (PAULETTI et al., 2007). Os autores relacionaram esta diminuição com a fase de transição do epitélio intestinal, que ocorre logo nas primeiras horas de vida.

Independente dos tratamentos, CBL ou CC, o Vv da mucosa absortiva diferiu significativamente entre os segmentos intestinais ($P<0,05$), horários experimentais ($P<0,05$) e houve interação significativa entre segmento intestinal e horário experimental ($P<0,05$). Contudo, ao realizar a comparação entre as médias pelo teste de Tukey, não foi revelada a diferença entre as médias. As médias para os Vv da mucosa absortiva (%) por segmento intestinal e horário experimental, independente do tratamento, são ilustradas nas Figuras 7 e 8. Não houve efeito significativo para a co-variável peso ao nascimento ($P>0,05$).

^{AB} Médias seguidas de letras diferentes diferem entre os segmentos intestinais pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 7 - Volume parcial Vv (%) da mucosa absorptiva (média $\pm$ erro padrão) por segmento intestinal

^{ab} Médias seguidas de letras diferentes diferem entre os horários experimentais pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 8 - Volume parcial Vv (%) da mucosa absorptiva (média $\pm$ erro padrão) por horário experimental

Ao comparar os segmentos intestinais, independente do horário experimental, verificou-se que o jejuno apresentou o maior Vv da mucosa absorptiva ($P < 0,05$), sendo 30,5% e 22,9% maior que o duodeno e o íleo, respectivamente. Os maiores valores para o Vv da mucosa absorptiva no jejuno estão relacionados à intensa absorção de macromoléculas advindas do colostro e a fase de transição do epitélio entérico de células tipo fetais para células adultas. Segundo Bessi et al. (2002a), a superfície de absorção de anticorpos é aumentada no jejuno, pois as vilosidades jejunais apresentam tamanhos variados caracterizando diferentes estratos para a absorção.

Pauletti et al. (2007) ao avaliarem o Vv da mucosa intestinal de bezerros até os sete dias de vida, verificaram que o jejuno teve maior Vv da mucosa absorptiva ao nascer e aos sete dias, comparado aos outros segmentos. Aos dois dias de idade este segmento teve reduzido o Vv, não diferindo dos outros segmentos.

Menor Vv da mucosa absorptiva no duodeno, independente do estágio de desenvolvimento, também foi verificado por Van Ginneken et al. (2002) ao avaliarem o comportamento da mucosa intestinal de suínos no período fetal, neonatal e pós-desmama. Segundo os autores, as diferenças observadas na morfometria intestinal de leitões são temporariamente e funcionalmente relacionadas às mudanças na dieta e a fase transitória de maturação do trato gastrintestinal.

O Vv entre os horários experimentais, independente do segmento intestinal, foi significativamente maior às 36 horas quando comparado aos valores às 96 horas ($P < 0,05$), sendo 17,3% maior que às 96 horas. As diferenças no volume da mucosa intestinal nos primeiros dias de vida podem estar relacionadas ao consumo de colostro, a alterações nas taxas de transporte de nutrientes pelas células absorptivas e aos diferentes estágios da maturidade entérica (MAYHEW; MIDDLETON, 1985; PÁCHA, 2000; PAULETTI et al., 2007).

O volume parcial da mucosa absorptiva mais pronunciado, verificado no segmento jejuno, esta provavelmente relacionado com a função de absorção, que se dá em grande parte neste segmento, pois o processo de absorção envolve a internalização de macromoléculas presentes no lúmen e formação de vacúolos que demandam mais espaço no citoplasma.

6.2.5 Densidade de superfície da mucosa intestinal

As médias encontradas para as densidades de superfície da mucosa intestinal - Sv (mm^2/mm^3) no duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nos horários experimentais são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Densidade de superfície da mucosa intestinal (mm^2/mm^3) no duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida

Horários experimentais (média $\pm$ erro padrão)						Probabilidade		
Duodeno	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	0,0681 $\pm$ 0,0027	0,0710 $\pm$ 0,0020	0,0669 $\pm$ 0,0020	0,0676 $\pm$ 0,0020	0,0685 $\pm$ 0,0011	0,6810	0,1462	0,9260
CC	0,0681 $\pm$ 0,0027	0,0724 $\pm$ 0,0027	0,0680 $\pm$ 0,0023	0,0673 $\pm$ 0,0023	0,0693 $\pm$ 0,0014			
Média geral	0,0681 $\pm$ 0,0027	0,0717 $\pm$ 0,0017	0,0675 $\pm$ 0,0001	0,0674 $\pm$ 0,0015				
Jejuno	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	0,0694 $\pm$ 0,0021	0,0647 $\pm$ 0,0018	0,0678 $\pm$ 0,0016	0,0667 $\pm$ 0,0016	0,0664 $\pm$ 0,0010	0,0914	0,9894	0,2662
CC	0,0647 $\pm$ 0,0018	0,0704 $\pm$ 0,0016	0,0678 $\pm$ 0,0016	0,0686 $\pm$ 0,0018	0,0689 $\pm$ 0,0010			
Média geral	0,0647 $\pm$ 0,0018	0,0675 $\pm$ 0,0012	0,0678 $\pm$ 0,0011	0,0676 $\pm$ 0,0012				
Íleo	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	0,0689 $\pm$ 0,0020	0,0676 $\pm$ 0,0013	0,0702 $\pm$ 0,0014	0,0704 $\pm$ 0,0013	0,0694 $\pm$ 0,0007	0,6591	0,5266	0,4832
CC	0,0689 $\pm$ 0,0020	0,0689 $\pm$ 0,0013	0,0682 $\pm$ 0,0013	0,0695 $\pm$ 0,0017	0,0689 $\pm$ 0,0008			
Média geral	0,0689 $\pm$ 0,0020	0,0683 $\pm$ 0,0009	0,0692 $\pm$ 0,0009	0,0699 $\pm$ 0,0010				

CBL – animais que receberam colostro bovino liofilizado; CC – animais que receberam colostro caprino

A Sv da mucosa intestinal não foi influenciada pelos tratamentos, CBL ou CC, horários experimentais e também não houve interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$). Testou-se o peso ao nascimento inicialmente como co-variável, não sendo o mesmo significativo sobre o Sv ($P>0,05$).

As médias para Sv da mucosa absorptiva, independente do tratamento, não diferiram entre os segmentos intestinais, horários experimentais e não houve interação entre segmento intestinal e horário experimental ($P>0,05$).

Van Ginneken et al. (2002), estudando o desenvolvimento do intestino em leitões juntamente as mudanças estruturais das vilosidades, verificaram redução no volume da parede intestinal e na densidade de superfície da mucosa absorptiva durante o período pós-natal. Ainda segundo os autores, as vilosidades do jejuno apresentaram-se maiores e mais numerosas, apesar da existência de uma parede intestinal mais delgada, as quais proporcionam maior Sv no jejuno do que nos outros segmentos.

Constatamos no presente estudo, que houve padrão de comportamento entre a massa e o volume ocupado pelas vilosidades que representam a densidade da superfície da mucosa do intestino delgado. A ausência de diferença da densidade para os três segmentos resultou da dinâmica compensatória entre altura e área das vilosidades. Segundo Mayhew e Middleton (1985), a renovação epitelial é controlada pelo balanço entre o processo de mitose a apoptose das células entéricas, sendo acompanhada pela constância na manutenção das vilosidades. São necessários estudos complementares explorando este parâmetro de análise estereológica para o melhor entendimento dos processos absorptivos.

6.3 Células caliciformes

O número células caliciformes, produtoras de muco, presentes entre as células enterocíticas nos diferentes segmentos do intestino delgado dos cabritos nos horários experimentais encontram-se apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Células caliciformes presentes no duodeno, jejuno e íleo dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino nas primeiras 96 horas de vida

Horários experimentais (média ± erro padrão)						Probabilidade		
Duodeno	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	224,76 ± 41,94	221,15 ± 25,59	107,34 ± 25,70	117,12 ± 25,76	148,54 ± 14,78	0,2332	0,0659	0,1656
CC	224,76 ± 41,94	130,82 ± 33,70	135,68 ± 33,07	92,12 ± 29,18	119,54 ± 18,27			
Média geral	224,76 ± 41,94	175,98 ± 21,18	121,51 ± 20,98	104,62 ± 19,68				

Horários experimentais (média ± intervalos de confiança)						Probabilidade		
Jejuno*	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	104,95 ^{Aa}	104,71 ^{Aa}	80,35 ^{Aa}	79,07 ^{Aa}	86,30	0,2072	0,1393	0,0005
	(45,71 – 239,88)	(40,18 – 274,79)	(50,58 – 135,52)	(35,73 – 158,49)	(62,95 – 119,95)			
CC	104,95 ^{Aa}	22,39 ^{Bb}	76,74 ^{Aa}	174,18 ^{Ba}	65,92			
	(45,71 – 239,88)	(14,55 – 36,14)	(35,16 – 166,34)	(65,92 – 385,48)	(35,40 – 106,17)			
Média geral	104,95	47,97	77,70 ± 1,19	115,64 ± 1,21				
	(45,71 – 239,88)	(24,27 – 99,31)	(55,85 – 113,50)	(62,66 – 176,20)				

Horários experimentais (média ± erro padrão)						Probabilidade		
Íleo	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	Tratamento	Horário	Tratamento X Horário
CBL	366,19 ± 121,76	332,94 ± 54,00	434,17 ± 54,13	413,33 ± 54,46	393,48 ± 31,20	0,7570	0,1640	0,9815
CC	366,19 ± 121,76	341,87 ± 54,10	441,45 ± 54,01	443,60 ± 85,44	408,97 ± 38,22			
Média geral	366,19 ± 121,76	337,40 ± 38,21	437,81 ± 38,22	428,46 ± 50,56				

^{AB}Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05)

^{ab}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre os horários experimentais pelo teste de Tukey (P<0,05)

CBL – animais que receberam colostro bovino liofilizado; CC – animais que receberam colostro caprino

*Dados retransformados (10^x), (x-y) intervalo de confiança de 95%

No duodeno dos cabritos, o número de células caliciformes não diferiu entre os tratamentos, horários experimentais e não houve interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$). No jejuno não houve efeito de tratamento e horário experimental ($P>0,05$) e foi houve interação entre tratamento e horário experimental ($P<0,05$) sobre o número de células caliciformes. No íleo dos cabritos, o número de células caliciformes não diferiu entre os tratamentos, nos horários experimentais e não houve interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$). O peso dos cabritos ao nascer, testado inicialmente como co-variável, não influenciou o número de células caliciformes ($P>0,05$) em nenhum dos segmentos intestinais.

No jejuno, os animais que ingeriram colostro caprino, apresentaram número de células caliciformes 78,6% menor do que os animais que ingeriram colostro bovino liofilizado ($P<0,05$) às 18 horas de vida. A partir das 36 horas de vida verificou-se que o número de células caliciformes, no jejuno dos cabritos alimentados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino, tornaram-se próximos, 80,55 (CBL) e 76,74 (CC). Às 96 horas foram observadas 54,6% mais células caliciformes nos animais que ingeriram colostro heterólogo do que em animais que consumiram o colostro homólogo. Resultados semelhantes foram verificados no íleo de bezerros, sendo que a principal fonte de variação para o número de células caliciformes foi a dieta (BLÄTTLER et al., 2001). Em relação à diferença no número de células caliciformes verificada às 18 horas considerando os dois tratamentos e a relativa estabilidade destas células às 36 horas, pode ser resultado de uma dinâmica de acomodação do sistema entérico em relação às células secretoras de muco frente às diferentes dietas.

O aumento do número de células caliciformes cuja função é secretar muco, segundo Specian e Neutra (1980) e Schauffert et al. (2000), representam uma resposta à condição de desafio mecânico ou patogênico, uma vez que a camada de muco produzida protege e lubrifica o revestimento do intestino.

Ao comparar as médias do número de células caliciformes entre os segmentos intestinais e horários experimentais, independente dos tratamentos, verificou-se diferença entre os segmentos intestinais e houve efeito da interação entre segmento intestinal e horário experimental ($P<0,05$). Contudo, ao realizar a comparação entre as médias pelo teste de Tukey, não foi revelada a interação entre os fatores. As médias do

número de células caliciformes por segmento intestinal são apresentadas na Figura 9. O peso dos cabritos ao nascer, testado inicialmente como co-variável, não exerceu efeito sobre o número de células caliciformes ($P>0,05$).

^{AB} Médias seguidas de letras diferentes diferem entre os segmentos intestinais pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Dados retransformados (10^x)

Figura 9 - Número de células caliciformes (médias) por segmento intestinal

Nas vilosidades ileais, verificou-se maior número de células caliciformes, sendo 64,5% e 78,7% maior e diferente ($P<0,05$) do duodeno e jejuno, respectivamente (Figura 10). A maior quantidade de células caliciformes presentes na região distal do intestino delgado quando comparado à região proximal também foi verificado por Cheng e Le Blond (1974).

Figura 10 - Células caliciformes no íleo de cabritos, aumento de 10x (A), aumento de 20X (B). Barra= 100µm

Legenda - seta: células caliciformes

Segundo Walker et al. (1977), Plaisancié et al. (1998) e Schauffert et al. (2000) os principais fatores que atuam como indutores na produção de muco pelas células caliciformes, são: neuropeptídeos gastrintestinais, hormônios, aminas biogênicas, mediadores do sistema imune como os linfócitos, macrófagos e mastócitos, agressões mecânicas e patogênicas influenciando assim a capacidade absorptiva da mucosa intestinal. Foi constatado no presente estudo, que o fornecimento de colostro heterólogo não determinou alterações significativas no número células caliciformes, nas primeiras horas de vida dos cabritos.

6.4 Imunohistoquímica

A análise dos cortes histológicos revelou diferenças com relação à localização da IgG entre os três segmentos intestinais e distribuição ao longo das vilosidades nos diferentes horários experimentais. Contudo, não foi verificado efeito do tratamento, CBL ou CC.

Nos animais zero hora, não foi verificada, em nenhum dos três segmentos do intestino delgado, a presença de vacúolos com material absorvido imunomarcados para

IgG. Esta condição foi também observada em cordeiros, bezerros e cabritos recém-nascidos por Smeaton e Simpson-Morgan (1985), Bessi et al. (2002a) e Castro-Alonso et al. (2008).

Vacúolos presentes nas células enterocíticas têm a função de transporte de IgG proveniente do colostro, sendo que a presença destes vacúolos é um indicador da ocorrência de absorção de macromoléculas do colostro (KAUP et al., 1996; BAINTE, 2002; PÁCHA, 2000). Confirmando esta afirmativa, Clarke e Hardy (1971) encontraram correlação positiva entre absorção do marcador celular [125] polivinil pirrolidone e a presença de vacúolos.

Independente dos horários experimentais, não foi verificada presença de vacúolos vazios e vacúolos preenchidos com IgG no duodeno dos cabritos, indicando níveis insignificantes ou inexistência de absorção de macromoléculas neste segmento intestinal. Da mesma forma, Bittrich et al. (2003) e Kaup et al. (1996) não verificaram células vacuoladas no duodeno de bezerros recém-nascidos.

Smeaton e Simpson-Morgan (1985), ao avaliarem o duodeno de cordeiros até o terceiro dia de vida, verificaram a presença de vacúolos preenchidos com IgG ao longo das vilosidades nos dois primeiros dias de vida e ausência no terceiro dia. Da mesma forma, Bessi et al. (2002a), ao avaliarem a absorção de anticorpos pelo intestino delgado proximal de bezerros, verificaram a presença de vacúolos preenchidos com IgG três horas após a ingestão de colostro e vacúolos vazios aos três dias de idade. Castro-Alonso et al. (2008), ao estudarem a absorção de IgG pelos enterócitos no duodeno de cabritos, verificaram que no primeiro e segundo dia de vida havia IgG internalizada e transferida ao sistema vascular. Apesar das condições ideais para absorção de anticorpos pela mucosa intestinal, proporcionada pela reduzida produção de ácido clorídrico no abomaso e baixa atividade enzimática na mucosa intestinal (KRUSE, 1983), no duodeno, verificou-se uma reduzida atividade de absorção de macromoléculas.

No jejuno foram visualizadas células vacuoladas preenchidas com IgG às 18 e 36 horas de vida, resultado da elevada permeabilidade intestinal aos anticorpos, superior aos demais segmentos avaliados. Nestes horários experimentais, verificou-se grande

quantidade de vacúolos preenchidos e imunomarcados para IgG, identificados através da utilização do reagente 3'3 diaminobenzidina (DAB) (Figura 11).

Figura 11 - Imunomarcção das imunoglobulinas G presentes nas vilosidades do jejuno de cabritos. Adição de DAB comercial sem a coloração com azul de toluidina (A) e após a coloração (B), aumento de 10X. Barra=100µm

Legenda - seta: Imunomarcção das imunoglobulinas G

Na maioria dos cabritos às 18 horas os vacúolos imunomarcados para IgG estavam distribuídos ao longo de toda a vilosidade do jejuno (Figura 12), enquanto às 36 horas de vida, vacúolos preenchidos com IgG foram encontrados predominantemente da porção médio-superior das vilosidades (Figura 12). Neste segmento, principal região responsável pela absorção de imunoglobulinas, vacúolos com diferentes tamanhos foram encontrados no citoplasma basal e apical dos enterócitos distribuídos aleatoriamente ao longo das vilosidades. Vacúolos posicionados em diferentes posições dentro dos enterócitos também foram encontrados por Clarke e Hardy (1971) no intestino delgado de cabritos abatidos quatro horas após a alimentação com colostro. No presente estudo, apenas dois cabritos, um às 18 e outro às 36 horas de vida não apresentaram vacúolos preenchidos.

Figura 12 - Vacúolos preenchidos com IgG presentes ao longo de toda vilosidade do jejuno de cabritos às 18 horas de vida; e distribuídos na metade superior das vilosidades no jejuno de cabritos às 36 horas de vida, aumento de 10X. Barra=100µm

Legenda - seta: Vacúolos preenchidos com IgG
 - elipse: distribuição dos vacúolos com IgG ao longo das vilosidades

Em bezerros, Bessi et al. (2002a), utilizando proteína A conjugada a ouro como imunomarcção para identificação da presença de IgG, encontraram grandes vacúolos preenchidos por colostro no jejuno após as primeiras refeições. Do mesmo modo, Jensen et al. (2001), trabalhando com leitões, observaram células vacuoladas preenchidas com proteínas do colostro no epitélio dos recém-nascidos após o consumo de colostro suíno ou colostro bovino. Ainda, segundo os autores, após o consumo de leite como substituto do colostro, apenas vacúolos vazios estavam presentes nas células.

Foram visualizadas macromoléculas sendo absorvidas, às 18 e 36 horas de vida, estão de acordo com Brambell (1958). O autor relata que até 48 horas de vida as células do intestino delgado são capazes de absorver e transferir proteínas intactas para a

corrente sanguínea sem perda da função biológica. Após este período absorptivo, gradualmente os enterócitos do tipo fetal são substituídos por uma nova geração de células tipo adultas, impermeáveis às imunoglobulinas (SIMPSON; SMEATON, 1972; SMEATON; SIMPSON-MORGAN, 1985; TRAHAIK; ROBINSON, 1989; PÁCHA, 2000; KINDLEIN et al., 2008; MORETTI et al., 2010), condição também verificada no presente estudo às 96 horas, que relaciona fechamento com maturidade do epitélio intestinal.

Nos enterócitos do íleo foram verificados vacúolos vazios preenchendo o citoplasma dos enterócitos, predominantemente na metade superior das vilosidades, à zero, 18 e 36 horas de vida (Figura 13). Um número reduzido de vacúolos preenchidos com IgG foram observados em seis cabritos às 18 horas, quatro que receberam colostro bovino liofilizado e dois colostro caprino e, em apenas um às 36 horas, que consumiu colostro bovino liofilizado.

Figura 13 - Íleo de cabritos às 18 horas com vacúolos localizados médio-apicalmente, aumento de 10X. Barra=100µm

Clarke e Hardy (1971) sugerem que, independente da menor quantidade de proteínas no lúmen do íleo, a presença de vacúolos persiste por mais tempo quando comparada ao duodeno ou jejuno. Este fato indica que a absorção pelas células enterocíticas do íleo pode ocorrer por um tempo mais prolongado antes da renovação do epitélio. Contudo, é importante considerar que quanto mais rapidamente ocorrer a renovação celular por uma nova geração de células, mais protegido estará o cabrito,

pois a eficiente absorção de IgG e o precoce fechamento das células entéricas, confere, ao mesmo tempo, concentração sistêmica adequada de anticorpos ao recém-nascido e evita a absorção de substâncias e organismos indesejáveis.

6.5 Caracterização do intestino delgado dos cabritos

A histologia do intestino delgado de cabritos recém-nascidos variou entre os segmentos intestinais e entre os horários experimentais, contudo não foram verificadas diferenças entre os animais aleitados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino.

6.5.1 Histologia do duodeno

No duodeno dos cabritos à zero hora foram observadas vilosidades recobertas por uma camada de células epiteliais com núcleos ocupando a posição basal, média e apical dos enterócitos na região inferior, média e superior das vilosidades. Este mesmo padrão foi verificado às 18 e 36 horas de vida (Figura 14). Às 96 horas, verificou-se predominância de núcleos basais nos enterócitos e ao longo de toda a vilosidade, característica indicativa de maturidade do epitélio intestinal (Figura 14).

Figura 14 - Duodeno de cabritos às 18, 36 e 96 horas, com núcleos na região apical, média e basal dos enterócitos na parte superior, média e inferior das vilosidades, respectivamente, aumento de 20X. Barra=100µm

6.5.2 Histologia do jejuno

No jejuno dos cabritos à zero hora foram verificadas vilosidades com núcleos predominantemente apicais nos enterócitos e ao longo de toda a vilosidade (Figura 15). Às 18 e 36 horas, não foi verificado um padrão definitivo com relação à posição dos núcleos nas células enterocíticas e ao longo das vilosidades. Esta variação na posição dos núcleos esta relacionada à presença de grande quantidade de vacúolos preenchidos com colostro (Figura 15), característica dos períodos em que há intensa absorção de macromoléculas. Segundo Bessi et al. (2002ab), grandes vacúolos, ocupando parcialmente ou integralmente a célula, deslocam os núcleos e organelas para a região periférica do citoplasma. Segundo Smeaton e Simpson-Morgan (1985) e Kindlein et al. (2008ab), com a maturidade celular, o número de células com grandes vacúolos diminui, sendo substituídas por enterócitos não vacuolados. Às 96 horas, no presente estudo, verificou-se predomínio de núcleos basais nas células epiteliais absorptivas, localização mantida ao longo de toda a vilosidade.

Figura 15 - Jejuno de cabritos à 0 hora com núcleos na região apical, aumento de 10X; Jejuno de cabritos às 18 e 36 horas, ausência de padrão para posição dos núcleos, aumento de 20X e 10X, respectivamente. Barra=100µm

6.5.3 Histologia do íleo

Nas células enterocíticas e nas vilosidades ileais dos cabritos à zero hora, os núcleos foram observados principalmente na região basal. Nos animais às 18 e 36 horas, os núcleos estavam posicionados na porção médio-apical dos enterócitos, na metade superior das vilosidades (Figura 16). Às 96 horas, ao longo de toda a vilosidade, houve predominância de núcleos basais nas células absorptivas (Figura 16). Núcleos basais também foram verificados em cordeiros e bezerros, aos três dias de idade, por Smeaton e Simpson-Morgan (1985) e Bessi et al. (2002ab). O posicionamento basal dos núcleos e a ausência de células contendo vacúolos, características observadas também no duodeno e jejuno, indicam que o epitélio intestinal alcançou maturidade, com a presença de uma nova geração de células adultas.

Figura 16 - Íleo de cabritos às 18 e 36 horas, com núcleos na posição medio-apical, no terço superior das vilosidades, aumento de 40X e 20X, respectivamente; Íleo de cabritos às 96 horas com núcleos na região basal, aumento de 20X. Barra=100µm.

7 CONCLUSÕES

O colostro bovino liofilizado pode ser utilizado por caprinos recém-nascidos como fonte alternativa para aquisição de proteção inicial.

O IGF-I presente no colostro não influenciou a morfometria entérica.

O jejuno mostrou-se o segmento mais importante no processo absorptivo de imunoglobulinas.

A distribuição dos anticorpos internalizados pelo epitélio entérico mostrou-se relacionada aos segmentos do intestino e tempo de vida dos recém-nascidos, independente da fonte de anticorpos, bovina liofilizada ou caprina.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J.L.; McGUIRE, T.C.; GORHAM, J.R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.44, n.9, p.1670-1675, 1983.
- ARGÜELLO, A.; CASTRO, N.; CAPOTE, J.; GINÉS, R.; ACOSTA, F.; LÓPEZ, J.L. Effects of refrigeration, freezing-thawing and pasteurization on IgG goat colostrum preservation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.48, n.2, p.135-139, 2003.
- ARGÜELLO, A.; CASTRO, N.; ZAMORANO, M.J.; CASTRO-ALONSO, A.; CAPOTE, J. Passive transfer of immunity in kid goats fed refrigerated and frozen goat colostrum and commercial sheep colostrum. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.54, p.237-241, 2004.
- AVRECH, O.M.; SAMRA, Z.; LAZAROVICH, Z.; CASPI, E.; JACOBOVICH, A.; SOMPOLINSKY, B. Efficacy of the placental barrier for immunoglobulins: correlations between maternal, paternal and fetal immunoglobulins levels. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.103, n.8, p.160-165, 1994.
- BADDELEY, A.; GUNDERSEN, H.J.G.; CRUZ-ORIVE, L.M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, Oxford, v.42, n.3, p.259-276, 1986.
- BAGALDO, A.R.; PAULETTI, P.; DELGADO, E.F.; LANNA, D.P.D; KINDLEIN, L.; MACHADO NETO, R. Desenvolvimento intestinal de bezerros recém-nascidos aleitados com colostro de vacas tratadas com rbST. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.4, p.839-846, 2007.
- BARACAT, R.S.; MACHADO NETO, R.; DANIELE, C.; BESSI, R.; PACKER, I.U. Fornecimento prolongado de colostro e proteção passiva em bezerros recém-nascidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.32, n.11, p.215-220, 1997.
- BESSER, T.E.; GARMEDIA, A.E.; McGUIRE, T.C. Effects of colostral immunoglobulin G1 and immunoglobulin M concentrations on immunoglobulin absorption in calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p.2033-2037, 1985.

BESSI, R.; PAULETTI, P.; DANTAS D'ARCE, R.; MACHADO NETO, R. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. I. Estudo no intestino delgado proximal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.6, p.2314-2324, 2002a.

BESSI, R.; PAULETTI, P.; DANTAS D'ARCE, R.; MACHADO NETO, R. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. II. Estudo no intestino delgado distal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.6, p.2325-2331, 2002b.

BITTRICH, S.; PHILIPONA, C.; HAMMON, H.M.; V. ROMÉ, V.; GUILLOTEAU, P.; BLUM, J.W. Preterm as compared with full-term neonatal calves are characterized by morphological and functional immature of the small intestine. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.6, p.1786-1795, 2004.

BLACKLAWS, B.A.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; WATT, N.J.; ANDRES, D.; KLEIN, D.; HARKISS, G.D. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.101, p.199–208, 2004.

BLÄTTLER, U.; HAMMON, H.M.; MOREL, C.; PHILIPONA, C. Feeding colostrum, its composition and feeding duration variably modify proliferation and morphology of the intestine and digestive enzyme activities of neonatal calves. **American Society for Nutritional Sciences**, Philadelphia, v.131, n.4, p.1256-1263, 2001.

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

BLUM, J.W.; BAUMRUCKER, C.R. Colostral and milk insulin-like growth factors and related substances: Mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, n.23, p.101–110, 2002.

BRAMBELL, J.W.R. The passive immunity of the young mammal. **Biological Reviews**, Cambridge, v.33, n.4, p.488-531, 1958.

BÜHLER, C.; HAMMON, H.; ROSSI, G.L.; BLUM, J.W. Small intestinal morphology in eight-day-old calves fed colostrum for different durations or only milk replacer and treated with long-R3-insulin-like growth factor I and growth hormone. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.76, p.758–765, 1998.

BURGESS, A.W. Growth control mechanisms in normal and transformed intestinal cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v.353, p.903-909, 1998.

BURRIN, D.G.; WESTER, T.J.; DAVIS, T.A.; AMICK, S. Orally administered insulin-like growth factor-I increases mucosal growth in formula-fed neonatal pigs. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v.270, p.1085-1091, 1996.

BUTLER, J.E. Bovine immunoglobulins: A review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.52, n.12, p.1895-1909, 1969.

CALLADO, A.K.C.; SOARES de CASTRO, R.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v.21, n.3, 2001.

CAMPBELL, S.G.; SIEGEL, M.J.; KNOWLTON, B.J. Sheep immunoglobulins and their transmission to the neonatal lamb. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v.25, n.12, p.361-365, 1977.

CASTRO, N.; CAPOTE, J.; ÁLVAREZ, S.; ARGÜELLO, A. Effects of lyophilized colostrum and different colostrum feeding regimens on passive transfer of immunoglobulin G in majorera goat kids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, p.3650–3654, 2005.

CASTRO-ALONSO, N.; CASTRO, N.; CAPOTE, J.; MORALES-DELANUEZ, A.; MORENO-INDIAS, I.; SÁNCHEZ-MACIASS, D.; HERRAEZ, P.; ARGÜELLO, A. Short communication: Apoptosis regulates passive immune transfer in newborn kids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, p.2086–2088, 2008.

CASTRO, N.; CAPOTE, J.; MORALES-DELANUEZ, A.; RODRÍGUEZ, C.; ARGÜELLO, A. Effects of newborn characteristics and length of colostrums feeding period on passive immune transfer in goat kids. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.92, p.1616–1619, 2009.

CHENG, H.; LE BLOND, C.P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. **The American journal of anatomy**, New York, v.141, p.537, 1974.

CLARK, R.M.; HARDY, R.N. Structural changes and the uptake of polyvinyl pyrrolidone in the small intestine of the young goat. **Journal of Anatomy**, London, v.108, p.79-87, 1971.

CORDANO, P., H. M. HAMMON, C. MOREL, A. ZURBRIGGEN, AND J. W. BLUM. mRNA of insulin-like growth factor (IGF) quantification and presence of IGF binding proteins, and receptors for growth hormone, IGF-I, and insulin, determined by reverse transcribed polymerase chain reaction, in the liver of growing and mature male cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, New York, v.19, p.191-208, 2000.

DEPLANCKE, B.; GASKINS, E.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v.73, n.6, p.1131-1141, 2001.

DROZDOWSKI, L; THOMSON, A.B.R. Intestinal hormones and growth factors: Effects on the small intestine. **World Journal of Gastroenterology**, North Langxinzhuang, v.15, n.4, p.385-406, 2009.

DROZDOWSKI, L.A.; CLANDININ, T.; THOMSON, A.B.R. Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. **World Journal of Gastroenterology**, North Langxinzhuang, v.21, p.787-799, 2010.

EAST, N.E; ROWE, J.D.; DAHLBERG, J.E.; THEILEN, G.H.; PEDERSEN, N.C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.10, p.251-262, 1993.

FLEENOR, W.A.; STOTT, G.H. Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.63, n.6, p.973-977, 1979.

FEITOSA, F.L.F.; BIRGEL, E.H.B; MIRANOLA, R.M.S.; PERRI, S.H.V. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gama glutamil transferase no soro sanguíneo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.2, p.251-255, 2001.

FERNÁNDEZ, A.; RAMOS, J.J.; LOSTE, A.; FERRER, L.M.; FIGUERAS, L.; VERDE, M.T.; MARCA, M.C. Influence of colostrums treated by heat on immunity function in goat

kids. **Comparative Immunology Microbiology And Infectious Diseases**, Oxford, v.29, p.353-364, 2006.

FLAIBAN, K.K.M.C.; BALARIN, M.R.S.; RIBEIRO, E.L.A.; CASTRO, F.A.B.; MORI, R.M.; LISBOA, J.A.N. Transferência de imunidade passiva em cordeiros cujas mães receberam dietas com diferentes níveis de energia ou proteína no terço final da gestação. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, Supl 1, p.181-185, 2009 .

FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E. Availability, storage, treatment composition and feeding value of surplus colostrum: A Review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.61, n.8, p.1033-1060, Aug. 1978.

GODDEN, S.M.; HAINES, D. M.; KONKOL, K.; PETERSON, J. improving passive transfer of immunoglobulins in calves. II: Interaction between feeding method and volume of colostrum fed. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, p.1758–1764, 2009.

GODLEWSKI, M.M.; SLUPECKA, M.; WOLINSKI, J.; SKRZYPEK, T.; SKRZYPEK, H.; MOTYL, T.; ZABIELSKI, R. Into the unknown – The death pathways in the neonatal gut epithelium. **Journal of Physiology and pharmacology**, Jagiellonian, v.56, supp.3, p.724, 2005.

GRANT, T.D.; SPECIAN, R.D. Proliferation of goblet cells and vacuolated cells in the rabbit distal colon. **The anatomical Record**, Toronto, v.252, p.41–48, 1998.

HAMMON, H.M.; BLUM, F.W. Feeding different amounts of colostrum or only Milk replacer modify receptors of intestinal insulin-like growth factors and insulin in neonatal calves. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.22, p.155–168, 2002.

HOUGH, R.L.; MCCARTHY, F.D.; THATCHER, C.D.; KENT, H.D.; EVERSOLE, D.E. Influence of glucocorticoid on macromolecular absorption and passive immunity in neonatal lambs. **Journal Animal Science**, Champaign, v.68, n.8, p.2459-2464, 1990.

HOULE, V.M.; SCHROEDER, E.A.; ODLE, J.; DONOVAN, S.M. Small intestinal disaccharidase activity and ileal villus height are increased in piglets consuming formula containing recombinant human insulin-like growth factor-I. **Pediatric Research**, Baltimore, v.42, n.1, p.78-86, 1997.

JEFFCOTT, L.B. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. **Biological Reviews**, Cambridge, v.47, n.4, p.439-464, 1972.

JENSEN, A.R.; ELNIF, J.; BURRIN, D.G.; SANGILD, P.T. Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet dependent. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.131, p.3259–3265, 2001.

KAUP, F.J.; DORMMER, W.; JOCHIMS, K.; PICKEL, M. Ultrastructure of pre- and post-colostral enterocytes of the newborn calf. **Anatomia Histologia Embryologia**, Berlin, v.25, n.4, p.249-255, 1996.

KINDLEIN, L.; PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; MACHADO-NETO, R. Efeito do fornecimento adicional de colostro sobre as concentrações séricas de IgG, PT e IGF-I de bezerros neonatos. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, Salvador, v.8, n.4, p.375-385, out/dez, 2007.

KINDLEIN, L.; PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; MACHADO-NETO, R. Características ultra-estruturais da mucosa intestinal de bezerros recém-nascidos alimentados na segunda refeição com colostro enriquecido com IGF-I e IgG. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.1, p.122-128, 2008a.

KINDLEIN, L.; PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; RODRIGUES, A.P.O.; MACHADO-NETO, R. Efeito da suplementação de colostro enriquecido sobre as características morfológicas da mucosa intestinal de bezerros neonatos. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 36, p.31-34, 2008b.

KRUSE, P.E. The importance of colostral immunoglobulin and their absorption from the intestine of the newborn animals. **Annales de Recherches Veterinaries**, Bletchley, v.14, n.4, p.349-353, 1983.

LAGES, S. L. S.; VESCHI, J. L.; CASTRO, R. S.; BUZINARO, M. G.; ALEXANDRINO, B.; DUTRA, I. S.; SAMARA, S. I. Detecção de anticorpos heterólogos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em caprinos. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v.23, p.89-94, 2007.

LEECE, J.G.; MORGAN, D.O. Effect of dietary regimen on cessation of intestinal absorption of large molecules (closure) in the neonatal pig and lamb. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.78, p.263-268, 1962.

LIMA, A.L.; PAULETTI, P.; SUSIN, I.; MACHADO-NETO, R. Flutuação das variáveis séricas em cabras e estudo comparativo da absorção de anticorpos em cabritos recém-nascidos utilizando colostro bovino e caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, n.11, p.2211-2217, 2009.

LOGAN, E.F.; FOSTER, W.H.; IRWIN, D. A note on bovine colostrum as an alternative source of immunoglobulin for lambs. **Animal Production**, London, v.26, p.93-96, 1978.

MACHADO NETO, R.; PACKER, I.U. Flutuação de imunoglobulina sérica em bezerros da raça holandesa submetidos a diferentes regimes de aleitamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.15, n.5, p.439-447, 1986.

MACHADO NETO, R.; CASSOLI, L.D.; BESSI, R.; PAULETTI, P. Concentração de IgG sérica em bezerros das raças Nelore, Guzerá, Gir e Caracu. 2. Efeitos sobre o crescimento e mortalidade até desmama. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.26, n.5, p.920-923, 1997.

MACHADO NETO, R.; CASSOLI, L.D.; BESSI, R.; PAULETTI, P. Avaliação do fornecimento adicional de colostro para bezerros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.2, p.420-425, 2004a.

MACHADO NETO, R.; FARONI, C.E.; PAULETTI, P.; BESSI, R. Levantamento do manejo de bovinos leiteiros recém-nascidos: Desempenho e aquisição de proteção passiva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.6, p.2323-2329, 2004b.

MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.E. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodifusion. **Immunochemical**, Oxford, v.2, p.235-254, 1965.

McCOY, G.C.; RENEAU, J.K.; HUNTER, A.G.; WILLIAMS, J.B. Effects of diet and time on blood serum proteins in the newborn calf. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.53, n.3, p.358-362, 1970.

MEI, J.; ZHANG, Y.; WANG, T.; SANGILD, P.T.; XU, R.J. Oral ingestion of colostrum alters intestinal transforming growth factor-beta receptor intensity in newborn pigs. **Livestock Science**, Amsterdam, v.105, p.214-222.

MELLADO, M.; PITTROFF, W.; GARCÍA, J.E.; MELLADO, J. Serum IgG, blood profiles, growth and survival in goat kids supplemented with artificial colostrum on the first day of life. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v.40, p.141–145, 2008.

MORETTI, D.B.; PAULETTI, P.; KINDLEIN, L.; MACHADO-NETO, R. Enteric cell proliferation in newborn lambs fed bovine and ovine colostrums. **Livestock Science**, Amsterdam, v.127, p.262–266, 2010.

MORIN, D.E.; McCOY, G.C.; HURLEY, W.L. Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G1 absorption in holstein bull calves. **Journal Dairy of Science**, Champaign, v.80, n.4, p.747-753, Apr. 1997.

O'BRIEN, J.P.; SHERMAN, D.M. Serum immunoglobulin concentrations of newborn goat kids and subsequent kid survival through weaning. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.11, p.71-77, 1993.

ODLE, J.; ZIJLSTRA, R.T.; DONOVAN, S.M. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.74, p.2509-2522, 1996.

PÁCHA, J. Development of Intestinal Transport Function in Mammals. **Physiological Reviews**, Bethesda, v.80, n.4, p.234-238, Oct 2000.

PAULETTI, P. **Efeito de diferentes níveis iniciais de imunoglobulinas adquiridas do colostro sobre a flutuação de proteínas séricas e desempenho de bezerras da raça Holandesa**. 1999. 104p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

PAULETTI, P.; MACHADO NETO, R.; PACKER, I.U.; BESSI, R. Avaliação de níveis séricos de imunoglobulina, proteína e o desempenho de bezerras da raça holandesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.1, p.89-94, jan. 2002.

PAULETTI, P.; MACHADO NETO, R.; PACKER, I.U.; D'ARCE, R.D.; BESSO, R. Quality of colostral passive immunity and pattern of serum protein fluctuation in newborn calves. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, n.3, p.453-456, Jul./Sept. 2003.

PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; KINDLEIN, L.; PARO de PAZ, C.C.; LANNA, D.P.D.; MACHADO NETO, R. IGF-I e IgG séricos e nas secreções lácteas em vacas tratadas com rbST no período pré-parto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.3, p.976-986, 2005.

PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; KINDLEIN, L.; MACHADO NETO, R. Insulin-like growth factor-I, passive immunity transfer, and stereological characteristics of small intestine of newborn calves. **Animal Science Journal**, Tokyo, v.78, p.631-638, 2007.

PENCHEV GEORGIEV, I. Differences in chemical composition between cow colostrum and milk. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v.11, n.1, p.3-12, 2008.

PENCHEV GEORGIEV, I.; GEORGIEVA, T.M.; PFAFFL, M.; HAMMON., H.M.; BLUM, J.W. Insulin-like growth factor and insulin receptors in intestinal mucosa of neonatal calves. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v.176, p.121-132, 2003.

PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J.; HARKISS, G.; BERTONI, G.; AMORENA, A.; ELIASZEWICZ, M.; JUSTE, R.A.; KRAßNIG, R.; LAFONT, J.; LENIHAN, P.; PÉTURSSON, G.; PRITCHARDI, G.; THORLEY, J.; VITU, C.; MORNEX, j.; PÉPIN, M. Routes of transmission and consequences of small ruminat lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. **Veterinary Research**, Les Ulis, v.35, p. 257-274, 2004.

PLAISANCIÉ, P.; BARCELO, A.; MORO, F.; CLAUSTRE, J.; CHAYVIALLE, JA.; CUBER, JC. Effects of neurotransmitters, gut hormones, and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v.275, p.1073-1084, 1998.

PORTER, P. Immunoglobulin mechanisms in health and nutrition from birth to weaning. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v.35, n.3, p.273-282, 1976.

PORTER, P. Structural and functional characteristics of immunoglobulins of the common domestic species. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, San Diego, v.23, p.1-21, 1979.

RIBEIRO, M.F.B.; BELEM, P.A.D.; PATARROYO, J.H.S.; FARIA, J.E. de. Hipogamaglobulinemia em bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.537-546, ago. 1983.

ROFFLER, B.; FÄH, A.; SAUTER, S.N.; HAMMON, H.M.; GALLMANN, P.; BREM, G.; BLUM, J.W. Intestinal Morphology, Epithelial Cell Proliferation, and Absorptive Capacity in Neonatal Calves Fed Milk-Born Insulin-Like Growth Factor-I or a Colostrum Extract. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.1797–1806, 2003.

ROOKE, J.A.; BLAND, I.M. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. **Livestock Production Science**, Amsterdam, NL, v.78, p.13-23, 2002.

RUDOVSKY, A.; LOCHER, L.; ZEYNER, A.; SOBIRAJ, A.; WITTEK, T. Measurement of immunoglobulin concentration in goat colostrum. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.74, p.265–269, 2008.

SAUTER, S.N.; ROFFLER, B.; PHILIPONA, C.; MOREL, C.; ROMÉ, V.; GUILLOTEAU, P.; BLUM, J.W.; HAMMON, H.M. Intestinal development in neonatal calves: effects of glucocorticoids and dependence on colostrum feeding. **Biology of the Neonate**, Basel, v.85, p.94-104, 2004.

SCHAUFFERT, M.; SIMÕES, M.J.; JULIANO, y.; NOVO, N.F. ORTIZ, V. Long term histomorphometric evaluation of the villous and ileal goblet cells after Ileocystoplasty in female rats. **Brazilian Journal of Urology**, Rio de Janeiro, v.26, p.91-96, 2000.

SCHIMIDEK, A.; MERCADANTE, M.E.Z.; PARANHOS DA COSTA, M.J.; RAZOOK, A.G.; FIGUEIREDO, L.A. Falha na primeira mamada em bezerros Guzerá: fatores predisponentes e parâmetros genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.6, p.998-1004, 2008.

SIMMEM, F.A.; SIMMEM, R.C.M.; REIHNART, G. Maternal and neonatal somatomedin C/insulin like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins during early lactation in the pig. **Developmental Biology**, San Diego, v.130, n.1, p.16-27, 1988.

SIMPSON, M.M.W.; SMEATON, T.C. The transfer of antibodies by neonates and adults. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, San Diego, v.16, p.355-386, 1972.

SMEATON, T.C.; SIMPSON-MORGAN, M.W. Epithelial cell renewal and antibody transfer in the intestine of the foetal and neonatal lamb. **Australian Journal Experimental Biology Medical Science**, Adelaide, v.63, p.41-51, 1985.

SPECIAN, R.D.; NEUTRA, M.R. Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. **Journal of Cell Biology**, New York, v.85, p.626-640, 1980.

STOTT, G.H.; FLEENOR, W.A.; KLEESE, C. Colostral immunoglobulin concentration in two fractions of first milking postpartum and five additional milkings. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.64, p.459-465, 1981.

TRAHAIR, J.F.; PERRY, R.A.; SILVER, M.; ROBINSON, J.S. Autoradiographic localization of [³H] thymidine incorporation in the small intestinal epithelium of fetal sheep. **Journal of Pediatric and Gastroenterology Nutrition**, Philadelphia, v.5, p.648-654, 1986.

TRAHAIR, J.F.; ROBINSON, J.S. Enterocyte ultrastructure and uptake of immunoglobulins in the small intestine of the neonatal Lamb. **Journal of Anatomy**, London, v.166, p.103-111, 1989.

TRAHAIR, J.F.; DeBARRO, T.M.; ROBINSON, J.S.; OWENS, J.A. Restriction of nutrition in utero selectively inhibits gastrointestinal growth in fetal sheep. **American Society for Nutritional Sciences**, Bethesda, v.127, p.637-641, 1997.

TURQUINO, C. F. **Transferência da imunidade passiva e comportamento de cordeiros de corte recém-nascidos**. 2010. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

VAN GINNEKEN, C.; VAN MEIR, F.; SYS, S.; WEYNS, A. Stereologic characteristics of pig small intestine during normal development. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v.47, n.4, p.868-878, 2002.

VELAYUDHAN, B.T.; DANIELS, K.M.; HORRELL, D.P.; HILL, S.R.; MCGILLIARD, M.L.; CORL, B.A.; JIANG, H.; AKERS, R.M. Developmental histology, segmental expression, and nutritional regulation of somatotrophic axis genes in small intestine of pre-weaned dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, p.3343-3352, 2008.

VIHAN, V.S. immunoglobulin levels and their effect on neonatal survival in sheep and goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.1, p.135-144, 1988.

XU, R.J. Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: A review. **Reproduction Fertility and Development**, Melbourne, v.8, n.1, p.35-48, 1996.

WALKER, W.A.; WU, M.; BLOCH, K.J. Stimulation by Immune Complexes of Mucus Release from Goblet Cells of the Rat Small Intestine. **Science**, Washington, v.197, p.370-372, 1977.