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

Colostro bovino liofilizado como substituto do colostro caprino e o desenvolvimento do epitélio intestinal de cabritos durante o período de aquisição de proteção passiva

Débora Botéquio Moretti

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

**Piracicaba
2012**

Débora Botéquio Moretti
Bióloga

Colostro bovino liofilizado como substituto do colostro caprino e o desenvolvimento do epitélio intestinal de cabritos durante o período de aquisição de proteção passiva

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ciências
Animal e Pastagens

Piracicaba
2012

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

Moretti, Débora Botéquio

Colostro bovino liofilizado como substituto do colostro caprino e o desenvolvimento do epitélio intestinal de cabritos durante o período de aquisição de proteção passiva / Débora Botéquio Moretti. - - Piracicaba, 2012.
122 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cabritos 2. Colostro 3. Imunidade 4. Imunoglobulinas 5. Intestino delgado
6. Liofilização 7. Ruminantes I. Título

CDD 636.39
M845c

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

*À meu marido Edivaldo,
À minha filha Maria Luísa,
À minha mãe Maria Rosa,*

pelo amor, incentivo e compreensão

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Raul Machado Neto**, pela confiança, dedicação e pela insubstituível orientação e amizade;

À **Wiolene Montanari Nordi**, pelo companheirismo, paciência e amizade presentes em todos os momentos;

À **Anali Linhares Lima**, pela participação neste trabalho e companheirismo;

À estagiária **Mariana Caroline Furian Pontin**, pelos momentos de estudos, descontração e amizade;

À Dra. **Patrícia Pauletti** e à Profa. Dra. **Liris Kindlein**, pela amizade e disposição em colaborar com este trabalho;

À **Rosana Bessi**, pelo auxílio nos trabalhos de microscopia e pela amizade;

À **Maria Antônia L. Etchegaray**, pelo auxílio nas análises de biologia molecular e pela amizade;

À colega **Thais Paula de Souza** pelo apoio imprescindível nas análises de biologia molecular;

Ao funcionário do Departamento de Zootecnia, **José Luiz F. Piedade**, pela atenção e apoio;

Ao Sistema de Produção de Ovinos e Caprinos – SIPOC e à Prof. Dra. **Ivanete Susin**, pelo consentimento para realização deste trabalho, e aos alunos e funcionários, pela colaboração;

Ao **Núcleo de Apoio à Pesquisa à Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária** (NAP/MEPA), ESALQ/USP, pelo apoio e pelo consentimento para a realização das análises de microscopia eletrônica;

Ao professores Dr. **Dante Pazzanese Duarte Lanna** e Dr. **Márcio de Castro** pelo apoio e pelo consentimento para a realização das análises de biologia molecular;

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

À **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP** e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

MUITO OBRIGADA!

*"O dia está na minha frente esperando
para ser o que eu quiser. E aqui estou eu
o escultor que pode dar forma a este dia"*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Imunidade passiva.....	23
2.2 Imunoglobulinas.....	24
2.3 Colostro.....	26
2.4 Absorção de imunoglobulinas no trato intestinal.....	29
2.5 IGF-I e o desenvolvimento do trato intestinal.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Local do experimento.....	37
3.2 Formação dos bancos de colostro.....	37
3.3 Animais e tratamentos.....	37
3.4 Amostragem de sangue.....	38
3.5 Amostragem histológica.....	38
3.6 Análises laboratoriais.....	39
3.6.1 Bromatologia das refeições.....	39
3.6.2 Quantificação da imunoglobulina G sérica e no colostro.....	39
3.6.3 Quantificação da proteína total sérica	40
3.6.4 Quantificação do IGF-I sérico e no colostro.....	41
3.6.5 Quantificação da proteína total no tecido intestinal.....	41
3.6.6 Quantificação do DNA total no tecido intestinal.....	42
3.6.7 Quantificação do RNA total no tecido intestinal.....	43
3.6.8 Atividade enzimática extracelular no tecido intestinal.....	43
3.6.8.1 Peptidases.....	43
3.6.8.2 Dissacaridases.....	44
3.6.9 Microscopia óptica.....	45
3.6.10 Microscopia eletrônica.....	45
3.6.10.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	45

3.6.10.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	46
3.6.11 Expressão do receptor específico para o IGF-I no tecido.....	47
3.6.11.1 Extração do RNA total.....	47
3.6.11.2 Reação de transcrição reversa.....	47
3.6.11.3 Obtenção dos iniciadores.....	48
3.6.11.4 Otimização dos iniciadores por PCR.....	48
3.6.11.5 PCR em tempo real quantitativo.....	49
3.6.11.6 Eficiência de amplificação da reação de PCR.....	50
3.6.11.7 Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro.....	50
3.7 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
4.1 Bromatologia das refeições.....	53
4.2 Imunoglobulina G sérica.....	53
4.3 Proteína total sérica.....	57
4.4 IGF-I sérico.....	58
4.5 Concentrações de proteína, DNA e RNA total no tecido intestinal.....	61
4.6 Atividade enzimática extracelular no tecido intestinal.....	68
4.7 Atividade enzimática da fosfatase ácida no tecido intestinal.....	75
4.8 Análise morfológica das vilosidades no epitélio intestinal.....	79
4.9 Ultraestrutura das células do epitélio intestinal.....	88
4.10 Expressão do receptor específico para o IGF-I no tecido intestinal.....	95
5 CONCLUSÕES.....	105
5.1 Conclusões gerais.....	105
5.2 Conclusão final.....	106
REFERÊNCIAS.....	107
APÊNDICE.....	119

RESUMO

Colostro bovino liofilizado como substituto do colostro caprino e o desenvolvimento do epitélio intestinal de cabritos durante o período de aquisição de proteção passiva

O presente projeto teve como proposta estudar a utilização do colostro bovino liofilizado como manejo alternativo para caprinos recém-nascidos. Estudos relacionados com a aquisição de proteção passiva e o desenvolvimento do epitélio intestinal, como aspectos citológicos e histológicos, atividade celular e expressão do receptor específico para o IGF-I (IGF-IR), foram realizados. Às 0, 7 e 14 horas de vida, 15 machos recém-nascidos receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado (CBL) e 14 colostro caprino (CC), ambas as refeições com 55 mg/mL de IgG. Amostras de sangue foram coletadas às 0, 7, 14, 18, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de vida para a quantificação da imunoglobulina G (IgG), proteína total (PT) e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I). Amostras do duodeno, jejuno e íleo foram coletadas às 18, 36 e 96 horas de vida para análises utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura e transmissão. A atividade de enzimas extracelulares, quantificação da proteína, DNA e RNA total e expressão do IGF-IR também foram determinadas. Amostras de um grupo adicional (0 h), que não ingeriu colostro, foram coletadas. No grupo CBL, as concentrações séricas de IgG às 14, 18, 24 e 48 horas foram maiores que às 0 e 7 horas, enquanto no grupo CC, apenas às 18 horas a concentração sérica foi maior que às 0 e 7 horas ($P < 0,05$). A capacidade de absorção de IgG diminuiu entre 7 e 14 horas em CC ($P < 0,05$), enquanto em CBL, manteve-se sem alteração nestes horários ($P > 0,05$). As variáveis PT e IGF-I não foram influenciadas pela ingestão de colostro bovino liofilizado ($P > 0,05$). Os indicativos de atividade celular, concentração de proteína, DNA e RNA total, proteína/DNA, proteína/RNA e RNA/DNA, e a atividade das enzimas aminopeptidase N, dipeptidil peptidase IV, aminopeptidase A, lactase, maltase e sacarase diferiram nos horários experimentais e em relação ao grupo adicional ($P < 0,05$). Apenas as razões proteína/DNA, proteína/RNA no jejuno e a atividade da aminopeptidase A no íleo foram maiores no grupo CBL ($P < 0,05$). A atividade da fosfatase ácida foi observada nas primeiras horas de vida, especialmente no duodeno. Com relação à morfologia do epitélio intestinal e densidade das vilosidades, o fornecimento de colostro bovino liofilizado não determinou alterações. As variações na ultraestrutura dos enterócitos revelaram a presença, no segmento jejuno, de material absorvido e do complexo endocítico apical às 0, 18 e 36 horas. No duodeno, a expressão gênica do IGF-IR ao nascimento foi maior que às 18 e 36 horas nos grupos CC e CBL ($P < 0,05$). Enquanto, a expressão do receptor deste peptídeo bioativo no jejuno do grupo CBL foi maior às 18 e 36 horas em relação a 0 h ($P < 0,05$). Os resultados obtidos do presente trabalho contribuem para que a fonte alternativa de imunoglobulinas, colostro bovino liofilizado, seja utilizada como um substituto para o colostro caprino sem alterações significativas na aquisição de proteção passiva e nas características histofisiológicas do tecido epitelial do intestino delgado de cabritos.

Palavras-chave: Imunidade passiva; Intestino delgado; Pequenos ruminantes; Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I

ABSTRACT

Lyophilized bovine colostrum as a substitute of goat colostrum and the intestinal epithelium development of goat kids during the period of passive protection acquisition

This project was proposed to study the use of lyophilized colostrum as an alternative management for newborn goat kids. Studies related to the acquisition of passive protection and development of the intestinal epithelium, as cytological and histological aspects, cellular activity and expression of the receptor specific for IGF-I (IGF-IR), were performed. At 0, 7 and 14 hours of life, 15 newborn males received 5% of initial weight of lyophilized bovine colostrum (LBC) and 14 goat colostrum (GC), both meals with 55 mg/mL of IgG. Blood samples were collected at 0, 7, 14, 18, 24, 36, 48, 72 and 96 hours of life to quantification of immunoglobulin G (IgG), total protein (TP) and insulin like growth factor type I (IGF-I). Samples of the duodenum, jejunum and ileum were collected at 18, 36 and 96 hours of life for analysis using optical microscopy and scanning and transmission electron microscopy. The activity of extracellular enzymes, quantification of total protein, DNA and RNA and expression of the IGF-IR were also determined. Samples from an additional group (0 h), not suckling, were collected. In LBC group, serum IgG concentrations at 14, 18, 24 and 48 hours were higher than at 0 and 7 hours, while in the GC group, only at 18 hours serum concentration was higher than at 0 and 7 hours ($P < 0.05$). The capacity of IgG absorption decreased between 7 and 14 hours in GC ($P < 0.05$), while in LBC, remained unchanged at these times ($P > 0.05$). The variables TP and IGF-I were not influenced by ingestion of lyophilized bovine colostrum ($P > 0.05$). The indicators of cellular activity, total protein, DNA and RNA concentration, protein/DNA, protein/RNA and RNA/DNA, and the enzyme activity of aminopeptidase N, dipeptidyl peptidase IV, aminopeptidase A, lactase, maltase and sucrase differed in sampling times and in relation to the additional group ($P < 0.05$). Only the rations protein/DNA, protein/RNA in the jejunum and aminopeptidase A activity in the ileum were higher in the LBC group ($P < 0.05$). The acid phosphatase activity was observed in the first hours of life, especially in the duodenum. Regarding the intestinal epithelium morphology and villi density, the supply of lyophilized bovine colostrum did not determine alterations. Changes in enterocytes ultrastructure revealed the presence in the jejunum segment of absorbed material and apical endocytic complex at 0, 18 and 36 hours. In the duodenum, IGF-IR gene expression at birth was higher than at 18 and 36 hours in the GC and LBC ($P < 0.05$). While the expression of this bioactive peptide receptor in the jejunum of the LBC group was higher at 18 and 36 hours relative to 0 h ($P < 0.05$). The results of this work indicate that the alternative source of immunoglobulins, lyophilized bovine colostrum, can be used as a substitute for goat colostrum without significant changes in the acquisition of passive protection and histophysiology characteristics of the small intestine epithelium of goat kids.

Keywords: Passive immunity; Small intestine; Small ruminants; Insulin like growth factor type I

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura terciária do IGF-I.....	32
Figura 2 -	Representação simplificada dos receptores do IGF-I e IGF-II e dos componentes intracelulares do sistema IGF e suas ações.....	34
Figura 3 -	Concentração de imunoglobulina G (mg/mL) sérica dos cabritos.....	54
Figura 4 -	Eficiência aparente de absorção (%) dos cabritos (média) às 7, 14, 18 e 24 horas de vida (EAA7hr, EAA14hr, EAA18hr e EAAtotal, respectivamente).....	55
Figura 5 -	Concentração de proteína total (g /dL) sérica dos cabritos.....	57
Figura 6 -	(A) e (B) Atividade da fosfatase ácida no duodeno de cabritos às 36 horas de vida; (C) e (D) atividade da fosfatase ácida em enterócitos do segmento jejuno de cabritos às 36 horas de vida; (E) e (F) reação da fosfatase ácida em vacúolos vazios no segmento íleo de cabritos às 36 horas de vida.....	77
Figura 7 -	Enterócitos colunares no epitélio absortivo do intestino delgado de cabritos.....	81
Figura 8 -	(A) Vilosidades digitiformes, espessas e baixas, com diferentes alturas no duodeno dos cabritos; (B) dobras no duodeno dos cabritos	81
Figura 9 -	Anastomoses entre vilosidades duodenais.....	81
Figura 10 -	(A), (B) e (C) Vilosidades digitiformes espessas e delgadas e com diferentes alturas observadas no jejuno dos cabritos; (D) vilosidades em forma de folha observadas no jejuno dos cabritos.....	82
Figura 11 -	Jejuno dos cabritos às 18 horas de vida apresentando vacúolos de absorção.....	83
Figura 12 -	Enterócitos com vacúolos de absorção de colostro às 18 horas de vida dos cabritos.....	83
Figura 13 -	Processo de morte celular e extrusão nas vilosidades do jejuno dos cabritos.....	84
Figura 14 -	(A) Vilosidades ileais baixas e espessas observadas às 0 e 96 horas de vida dos cabritos; (B) diferentes alturas e espessuras das vilosidades ileais observadas às 18 e 36 horas de vida dos cabritos...	84

Figura 15 -	Sulcos nas vilosidades do íleo dos cabritos.....	85
Figura 16 -	Processo de extrusão celular no topo da vilosidade com um grupo de células e espaços vazios correspondentes a morte de células isoladas.....	85
Figura 17 -	Projeções das Placas de Peyer observadas entre as vilosidades ileais dos cabritos.....	86
Figura 18 -	Pólo apical de enterócito duodenal de cabrito às 18 horas de vida apresentando microvilosidades e extensões das microvilosidades em direção ao citoplasma.....	89
Figura 19 -	Duodeno de cabrito às 18 horas de vida revelando freqüente presença de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres no citoplasma dos enterócitos.....	90
Figura 20 -	Enterócitos do jejuno de cabritos. (A), (B), (C) e (D) Formação do complexo endocítico apical no enterócito do jejuno de cabrito a 0, 18 e 36 horas de vida; (E) e (F) vacúolos preenchidos por material elétron-denso no jejuno dos cabritos às 18 horas de vida, após a ingestão de colostro.....	93
Figura 21 -	Pequenas vesículas na região apical de enterócitos presentes no segmento íleo de cabrito às 18 horas de vida.....	94
Figura 22 -	Vacúolos de colostro imunomarcados para IgG no jejuno de cabritos às 18 horas de vida.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estrutura da molécula, função e distribuição relativa das imunoglobulinas séricas.....	23
Tabela 2 -	Principais componentes do colostro e leite bovino.....	27
Tabela 3 -	Propriedades físicas e biológicas das IGFBPs.....	33
Tabela 4 -	Seqüências senso e anti-senso dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real.....	48
Tabela 5 -	Composição bromatológica das refeições de colostro bovino liofilizado e colostro caprino.....	53
Tabela 6 -	Concentração sérica de IGF-I (ng/mL) dos cabritos (média ± erro padrão).....	59
Tabela 7 -	Concentração de proteína total, DNA, RNA (mg/g de tecido) e razão entre as variáveis no duodeno dos cabritos (média ± erro padrão).....	61
Tabela 8 -	Concentração de proteína total, DNA, RNA (mg/g de tecido) e razão entre as variáveis no jejuno dos cabritos (média ± erro padrão).....	63
Tabela 9 -	Concentração de proteína total, DNA, RNA (mg/g de tecido) e razão entre as variáveis no íleo dos cabritos (média ± erro padrão). 65	
Tabela 10 -	Atividade enzimática (U/grama de tecido) no duodeno dos cabritos (média ± erro padrão).....	69
Tabela 11 -	Atividade enzimática (U/grama de tecido) no jejuno dos cabritos (média ± erro padrão).....	71
Tabela 12 -	Atividade enzimática (U/grama de tecido) no íleo dos cabritos (média ± erro padrão).....	72
Tabela 13 -	Densidades das vilosidades (vilosidades/cm ²) nos segmentos intestinais dos cabritos (média ± erro padrão).....	79
Tabela 14 -	Temperaturas de melting dos genes analisados, em cada segmento intestinal.....	95
Tabela 15 -	Eficiências de amplificação dos genes analisados, em cada segmento intestinal.....	96
Tabela 16 -	Médias, desvio padrão e coeficiente de variação da expressão do gene GAPDH, descritas em unidades Ct não normalizados.....	97

Tabela 17 -	Médias, desvio padrão e coeficiente de variação da expressão do gene β -actina, descritas em unidades Ct não normalizados.....	98
Tabela 18 -	Médias, desvio padrão e coeficiente de variação da expressão do gene do receptor do IGF-I, descritas em unidades Ct não normalizados.....	99
Tabela 19 -	Comparações entre os grupos CC e CBL em cada horário experimental pelo teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso.....	100
Tabela 20 -	Comparações dentro de cada grupo entre os horários experimentais pelo teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso.....	101
Tabela 21 -	Comparações entre o grupo adicional, 0 hora, e os demais tratamentos pelo teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IGF-I	Insulin like growth factor type I – fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
IgG	Imunoglobulina G
mg	miligrama
mL	mililitro
$x\ g$	aceleração da gravidade

1 INTRODUÇÃO

Os ruminantes dependem da ingestão de colostro imediatamente após o nascimento para sua sobrevivência, uma vez que esta é a única fonte de imunoglobulinas para o recém-nascido e, portanto, de proteção passiva. A adequada aquisição de imunoglobulinas garante a higidez dos animais diminuindo a morbidade e mortalidade nos primeiros dias de vida.

O mesmo colostro que confere proteção aos recém-nascidos pode transmitir micro-organismos patogênicos, sendo o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAE) uma das principais preocupações do setor produtivo nacional de caprinos. Buscando prevenir a transmissão deste micro-organismo e garantir o adequado fornecimento de imunoglobulinas aos recém-nascidos, alternativas de manejo do colostro têm sido investigadas, sendo o fornecimento de colostro bovino na forma liofilizada promissora. Enquanto o colostro bovino é uma fonte rica em imunoglobulinas, de fácil obtenção e excedente em regiões leiteiras, a liofilização é um processo de desidratação que preserva as características bioquímicas do colostro, permite o seu armazenamento na temperatura ambiente por períodos prolongados e facilidade na reconstituição em água e em diluições desejadas.

Além de ser uma fonte rica em imunoglobulinas, o colostro possui um complexo de nutrientes, constituído por gorduras, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais e uma série de moléculas biologicamente ativas, entre eles o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), associados à maturação do trato digestivo e ao desenvolvimento do recém-nascido.

O estudo dos mecanismos celulares de absorção de macromoléculas do colostro, incluindo a atividade de enzimas intra e extracelulares envolvidas na digestão e a ação de moléculas bioativas, reveste-se de grande importância, pois se trata de um período crítico para a sobrevivência do recém-nascido, justificando a procura de informações que vão desde a avaliação de manejos alternativos até mecanismos histofisiológicos.

O presente projeto teve como proposta estudar a utilização do colostro bovino liofilizado como manejo alternativo para caprinos recém-nascidos. Dentro desta proposta, foram realizados estudos relacionados com a aquisição de proteção passiva e o desenvolvimento do epitélio intestinal, como aspectos citológicos e histológicos, atividade celular e expressão do receptor específico para o IGF-I.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Imunidade Passiva

Os cabritos, assim como os demais ruminantes, nascem agamaglobulinêmicos. Esta condição deve-se ao tipo de placenta, que impede a passagem de imunoglobulinas da circulação sanguínea materna para a fetal durante o período gestacional, e à inexperiência de seu sistema imunológico. Assim, o ruminante é dependente da ingestão de colostro imediatamente após o nascimento para sua sobrevivência. Esta secreção láctea é a única fonte de imunoglobulinas para o recém-nascido e, portanto, de proteção passiva, assim denominada por ser produzida na mãe. As imunoglobulinas presentes no colostro alcançam o intestino delgado do recém-nascido sem sofrer alteração na sua função biológica, atravessando a barreira epitelial e garantindo a proteção do animal até que este apresente um sistema imunológico competente (BRAMBELL, 1958; CAMPBELL; SIEGEL; KNOWLTON, 1977; HURLEY; THEIL, 2011; SALMON, 1999; SANGILD, 2003).

As concentrações máximas de imunoglobulinas exógenas, adquiridas do colostro, ocorrem entre 12 e 48 horas de vida, sendo que, após este pico, ocorre a transição da proteção passiva para a proteção ativa. Neste período, pode-se verificar diminuição na concentração das imunoglobulinas séricas como consequência do catabolismo protéico. Em seguida, gradativamente, inicia-se a síntese endógena destas proteínas até que níveis normais sejam atingidos, próximos de 30 mg/mL (BARACAT et al., 1997; LIMA et al., 2009; PAULETTI et al., 2002, 2005).

Falha na transferência de imunidade passiva é uma condição que ocorre quando os neonatos não conseguem absorver quantidades suficientes de imunoglobulinas e é caracterizada, de acordo com O'Brien e Sherman (1993), por concentrações séricas inferiores a 12 mg/mL nas primeiras 12 a 48 horas de vida dos caprinos. Baixa produção de colostro pela mãe, manejo inadequado do colostro, ingestão inadequada de colostro pelo recém-nascido em função de morte ou rejeição da mãe, baixo peso ao nascer, prematuridade ao nascer, número de crias são alguns fatores que podem determinar a falha na transferência de imunidade passiva (ARGÜELLO et al., 2004; CASTRO et al., 2005, 2009; FLAIBAN et al., 2009; ROOKE; BLAND, 2002; SANGILD, 2003; SCHMIDEK et al., 2008).

Baixas concentrações ou ausência de imunoglobulinas séricas estão relacionadas com elevados índices de mortalidade em ruminantes recém-nascidos

(CONSTANT et al., 1994; SCHMIDEK et al., 2008; TURQUINO, 2010). De acordo com Hodgson (1992), cordeiros privados de colostro apresentaram 80% e 67% de morbidade e mortalidade, respectivamente, enquanto os alimentados com colostro apresentaram índices inferiores, 20% e 13%, respectivamente. Segundo Argüello et al. (2004), a primeira ingestão de colostro deve ser de 5 a 7% do peso vivo nas primeiras horas de vida dos caprinos para garantir adequada absorção de imunoglobulinas e conseqüente higidez dos animais.

2.2 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas ou anticorpos são glicoproteínas globulares de alto peso molecular, sintetizadas e secretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B, os plasmócitos. Estas macromoléculas possuem em sua estrutura básica duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Pontes dissulfídicas unem cada uma das cadeias pesadas a uma cadeia leve e as duas cadeias pesadas entre si. As imunoglobulinas são classificadas como estruturas quartenárias e podem ser encontradas na forma de monômeros ou polímeros (BUTLER et al., 2009; TIZARD, 1998).

Existem cinco tipos de cadeias pesadas e estes tipos são caracterizados pela seqüência de aminoácidos na cadeia. Para cada tipo de cadeia pesada há uma classe de imunoglobulina, sendo elas a IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Cada classe se diferencia pela estrutura da molécula, função e distribuição relativa na circulação, Tabela 1 (BUTLER et al., 2009; TIZARD, 1998).

Tabela 1 – Estrutura da molécula, função e distribuição relativa das imunoglobulinas séricas

Propriedade	Classe Imunoglobulínica				
	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
Peso molecular (Daltons)	970.000	150.000	360.000	190.000	180.000
Cadeia pesada	μ	γ	α	ϵ	δ
Presença no soro sanguíneo (aproximadamente)	11%	75%	13%	<1%	1%
Estrutura da molécula	Pentâmero	Monômero	Monômero e dímero	Monômero	Monômero
Meia-vida	10 dias	21 dias	6 dias	2 dias	3 dias
Função	Resposta imune primária	Resposta imune secundária	Proteção dos tratos intestinal, respiratório e urogenital, glândula mamária e olhos	Defesa contra vermes parasitas invasores e respostas alérgicas	Receptor antigênico na superfície de linfócitos
Transferência placentária	-	+	-	-	-

Fonte: Nelson e Cox (2006) e Tizard (1998)

Independente da forma de aquisição de imunidade passiva nas diferentes espécies, via placenta ou colostro, IgG é priorizada no processo de transferência (Butler, 1974). Durante o período gestacional dos primatas, a placenta do tipo hemocorial permite que apenas a IgG seja transferida para o feto, enquanto nos ruminantes, cinco camadas de tecidos da placenta sindesmocorial impedem a mobilização de anticorpos maternos para a circulação fetal. Nestas espécies, a IgG é seletivamente transferida através do epitélio alveolar para a glândula mamária, formando o colostro que se constituirá no único veículo de transporte destas imunoglobulinas para os recém-nascidos (SALMON, 1999). Nas últimas semanas pré-parto, cerca de 700 gramas de imunoglobulinas podem ser mobilizadas para a glândula mamária (Butler, 1974).

As imunoglobulinas dos ruminantes apresentam homologia entre as espécies (BUTLER, 1983). Estudos evolutivos revelam que os genes que codificam a região variável da cadeia pesada das imunoglobulinas de ovinos e bovinos pertencem a um mesmo grupo e, provavelmente, menos de vinte genes variam nesta região (NEI; GU; SITNIKOVA, 1997). Esta homologia permite que imunoglobulinas bovinas confirmem proteção aos demais ruminantes domésticos, pois são reconhecidas pelo organismo, mantendo sua atividade biológica (BUTLER, 1983).

2.3 Colostro

O colostro é a primeira secreção láctea após o parto, sendo constituído de produtos secretados pela glândula mamária e elementos da corrente sangüínea, principalmente as imunoglobulinas (BLUM; HAMMON, 2000; GAUTHIER; POULIOT; MAUBOIS, 2006; PANDEY et al., 2011). Além de ser uma fonte rica de proteínas, gorduras, mineral e vitaminas, o colostro contém moléculas biologicamente ativas, que são essenciais para promover o crescimento e desenvolvimento do trato gastrointestinal dos recém-nascidos (BANCHERO et al., 2004; BLUM; HAMMOM, 2000; BOUDRY; THEWIS, 2009; PANDEY et al., 2011). Os mais importantes componentes do colostro incluem fatores imunes, de crescimento e antimicrobianos, conforme Tabela 2. A mudança de secreção da glândula mamária de colostro para leite ocorre de 3 a 5 dias. Neste período, o leite de transição possui composição intermediária em relação ao colostro e ao leite maduro.

Tabela 2 – Principais componentes do colostro e leite bovino

Componentes	Colostro bovino (/litro)	Leite bovino (/litro)	Referência
Matéria seca	153-245 g	122 g	Blum e Hammom, 2000
Proteína bruta	41-140 g	34 g	Gopal e Gill, 2000
Lactose	27-46 g	46 g	Gopal e Gill, 2000
Lipídeos	39-44 g	37 g	Gopal e Gill, 2000
Cinzas	5-20 g	7 g	Gopal e Gill, 2000
Fatores imunes			
IgG1	50-90 g	0,30-0,40 g	Elfstrand et al., 2002
IgG2	1,5-2 g	0,03-0,08 g	Elfstrand et al., 2002
IgA	3,0-6,5 g	0,04-0,06 g	Elfstrand et al., 2002
IgM	3,8-6g	0,03-0,06 g	Elfstrand et al., 2002
IL-1 β	840 μ g	3 μ g	Hagiwara et al., 2000
IL-ra	5,2 mg	27 μ g	Hagiwara et al., 2000
IL-6	77 μ g	0,15 μ g	Hagiwara et al., 2000
TNF- α	926 μ g	3,3 μ g	Hagiwara et al., 2000
IFN- γ	260 μ g	0,21 μ g	Hagiwara et al., 2000
Fatores de crescimento			
IGF-1	100-2000 μ g	<25 μ g	Elfstrand et al., 2002
IGF-2	200-600 μ g	<10 μ g	Pakkanen e Aalto, 1997
EGF	4-8 mg	2 μ g	Scammel, 2001
TGF- β	100-300 μ g	1-2 μ g	Elfstrand et al., 2002
Fatores antimicrobianos			
Lactoferrina	1,5-5 g	0,1-0,3 g	Korhonen, 1977
Lactoperoxidase	30 mg	20 mg	Korhonen, 1977
Lisozima	0,14-0,7 mg	0,07-0,6 mg	Korhonen, 1977

Fonte: Boudry e Thewis, 2009

A idade e raça da mãe, número de parições e número de crias por gestação são fatores que podem afetar a qualidade do colostro (GILBERT et al., 1988; MACHADO NETO, 2001). Concentrações mais elevadas de IgG foram encontradas no colostro de animais com idade superior a três anos (MACHADO NETO et al.,

1997). Com relação às parições, quanto maior o número de partos, maior a possibilidade do colostro apresentar elevada concentração de IgG (MACHADO NETO et al., 2001).

A forma de armazenamento do colostro também é um fator importante na qualidade imunológica desta secreção láctea. O congelamento, refrigeração, adição de substâncias com capacidade tamponante ou acidificante e a liofilização são os métodos de armazenamento mais utilizados (ARGÜELLO et al., 2004; CASTRO et al., 2009; KINDLEIN et al., 2007). De acordo com Argüello et al. (2003), o congelamento garante a integridade das imunoglobulinas, não comprometendo sua estrutura e concentração no colostro. A liofilização, por sua vez, é um processo de desidratação que preserva as características bioquímicas do colostro, permite o seu armazenamento na temperatura ambiente por períodos prolongados, facilidade na reconstituição em água e em diluições desejadas e facilidade de transporte (CASTRO et al., 2005).

Klobasa, Goel e Werhahn (1998), comparando dois métodos de armazenamento de colostro, liofilização e congelamento, não verificaram diferenças nas concentrações de imunoglobulinas séricas nas primeiras 72 horas de vida de bezerros, demonstrando que as duas formas de armazenamento garantem a qualidade imunológica do colostro. Kindlein et al. (2007) sugerem, ainda, a adição de colostro bovino liofilizado ao colostro bovino na forma natural como forma de enriquecer a qualidade imunológica desta secreção.

O fornecimento de um colostro com elevada qualidade imunológica para os animais recém-nascidos garante a higidez e diminuição dos índices de mortalidade e morbidade no rebanho (ARGÜELLO et al., 2004). Entretanto, o mesmo colostro que confere proteção, pode transmitir micro-organismos patogênicos. O vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAE), identificado como causador de mortes em cabritos, pode ser transmitido aos recém-nascidos no período de aleitamento (CALLADO, CASTRO, TEIXEIRA, 2001). A ocorrência de animais contaminados com o vírus tem sido registrada em vários estados, entre eles São Paulo e Minas Gerais (CALLADO, CASTRO, TEIXEIRA, 2001; OLIVEIRA et al., 2006). Assim, o combate à disseminação da CAE torna-se uma prática imprescindível.

O controle da CAE é realizado principalmente pela pasteurização do colostro caprino, prática de difícil operacionalização e de custo relativamente elevado para pequenos produtores. Em adição, este procedimento pode acarretar diminuição na

concentração de imunoglobulinas por desnaturação protéica (FERNANDEZ et al., 2006). Argüello et al. (2003) observaram queda de 35% na concentração de IgG no colostro caprino pasteurizado a 57°C por 10 minutos, enquanto Fernandez et al. (2006), realizando o procedimento a 56°C por 30 minutos verificaram queda de 29 % na concentração desta imunoglobulina.

Em pequenos ruminantes, a substituição de colostro materno por colostro bovino ou colostro caprino liofilizado tem sido utilizada como uma alternativa de manejo eficiente para evitar a transmissão deste micro-organismo, bem como, garantir o adequado fornecimento de imunoglobulinas aos recém-nascidos (CASTRO et al., 2005; LIMA et al., 2009; MORETTI et al., 2010a; MORETTI et al., 2010b; QUIGLEY; CARSON; POLO, 2002; ZADOKS et al., 2001). Mellado et al. (2008) encontraram resultados semelhante na transferência de anticorpos em caprinos recém-nascidos que receberam suplemento de colostro derivado de secreções lácteas de bovinos em relação aos animais que receberam colostro caprino. Castro et al. (2005), por sua vez, avaliando a viabilidade do processo de liofilização, observaram que a administração do colostro caprino nesta forma também é uma alternativa eficiente de manejo. A utilização de colostro bovino para caprinos e ovinos foi avaliado por Lima et al. (2009) e Moretti et al. (2010b), respectivamente, mostrando-se uma prática exeqüível. Dentre as alternativas de manejo, o fornecimento de colostro bovino na forma liofilizada pode ser considerada promissora.

2.4 Absorção de imunoglobulinas no trato intestinal

Nas primeiras 24 a 48 horas de vida, o epitélio do intestino delgado dos ruminantes é constituído por enterócitos fetais que possuem a capacidade de internalizar macromoléculas (BAINTNER, 2007; BRAMBELL, 1958; CAMPBELL; SIEGEL; KNOWLTON, 1977; SANGILD, 2003). Estes enterócitos possuem no citoplasma próximo a membrana apical uma grande quantidade de túbulos, o complexo endocítico apical. Esse complexo surge de invaginações da base das microvilosidades e são responsáveis pelo aparecimento de vacúolos citoplasmáticos, e conseqüentemente, pela internalização de anticorpos nas primeiras horas de vida dos ruminantes (BAINTNER, 2007; BESSI et al., 2002b; CAMPBELL; SIEGEL; KNOWLTON, 1977). O material absorvido é liberado por exocitose na membrana basolateral da célula alcançando, em seguida, a corrente sangüínea através do

sistema linfático (BAINTNER, 2007; CAMPBELL; SIEGEL; KNOWLTON, 1977; HURLEY; THEIL, 2011).

Vários autores descrevem a morfologia ultraestrutural das células do tipo fetal em bovinos, suínos e, principalmente, roedores (BABA et al., 2002; BESSI et al., 2002a; BESSI et al., 2002b; KAUP et al., 1996; SKRZYPEK et al., 2007). Entretanto, poucos estudos têm se dedicado à investigação dos mecanismos celulares de absorção em pequenos ruminantes. Clark e Hardy (1971) observaram absorção de macromoléculas do colostro apenas na região distal do intestino delgado de caprinos recém-nascidos. As células absorptivas desta região apresentaram núcleo apical e um grande vacúolo citoplasmático. Castro-Alonso et al. (2008), em contrapartida, observaram atividade absorptiva na região proximal, detectando a internalização de imunoglobulinas pelo duodeno de cabritos às 24 horas de vida. Em bovinos, estas células com capacidade absorptiva estão localizadas principalmente nos segmentos jejuno e íleo, sendo que o duodeno possui contribuição desprezível neste processo (BESSI et al., 2002a; BESSI et al., 2002b). Poole et al. (2003) sugerem que as longas vilosidades presentes no jejuno estão relacionadas com a maior condição de absorção neste segmento. Kaup et al. (1996) observaram que, 24 horas após a ingestão de colostro, a região distal do intestino delgado de bezerros apresentou maior frequência de vacúolos contendo material absorvido, sendo que o duodeno não apresentou sinais de absorção.

Baixa atividade da pepsina gástrica, baixa atividade de enzimas da parede da mucosa intestinal, pequena produção de ácido clorídrico no estômago e a presença de um fator inibidor de tripsina no colostro são características do trato gastrointestinal dos ruminantes recém-nascidos que determinam condições ideais para a absorção de macromoléculas (KRUSE, 1983). A baixa atividade de enzimas lisossomais também contribui para garantir a passagem de imunoglobulinas através dos enterócitos sem que ocorra degradação protéica durante o percurso intracelular (BESSI et al., 2002a, BESSI et al., 2002b).

A enzima fosfatase ácida, presente nos lisossomos, esta relacionada com a atividade digestiva intracelular e maturação do epitélio intestinal. Esta enzima se constitui num sistema auxiliar de digestão do animal lactente (BAINTNER, 1994). Em leitões recém-nascidos, observou-se que não há atividade da fosfatase ácida em vacúolos de colostro nas células epiteliais (BROWN; MOON, 1979). Wilson, Whitney e Neutra (1991) observaram a ativação da fosfatase ácida nas células da região

distal do intestino delgado um dia após o nascimento de roedores, permanecendo por todo o período de aleitamento. Os autores sugerem que ocorre degradação enzimática das proteínas absorvidas e que a transferência destas não é necessariamente proporcional ao seu acúmulo. Bessi et al. (2002b) descreveram, pela primeira vez em bezerros recém-nascidos, evidências do desenvolvimento de digestão intracelular nos vacúolos apicais de células da região distal do intestino delgado. Segundo os autores, atividade proteolítica significativa durante a transcitose de imunoglobulinas parece improvável, considerando a quantidade de proteína transportada e o período reduzido do processo de absorção.

O fechamento intestinal é o momento em que o enterócito não é mais capaz de transferir imunoglobulinas para o sistema circulatório do recém-nascido e marca o fim da aquisição de imunidade passiva (HURLEY; THEIL, 2011; SANGILD, 2003). Este processo ocorre nas primeiras 36 a 48 horas de vida e coincide com o período de renovação de todo o epitélio intestinal. As novas células geradas, enterócitos do tipo adulto, não possuem as mesmas características ultraestruturais dos enterócitos do tipo fetal e não são capazes de internalizar macromoléculas (CAMPBELL; SIEGEL; KNOWLTON, 1977; SMEATON; SIMPSON-MORGAN, 1985). Bessi et al. (2002b) observaram que células do intestino delgado distal de bezerros aos três dias de idade não possuem a mesma estrutura que células às três horas de vida, caracterizando a rápida renovação e fechamento do epitélio intestinal. A antecipação deste processo que determina a maturação das células epiteliais e capacita o trato para a digestão e absorção de nutrientes, também impossibilita a internalização de substâncias estranhas ao organismo do recém-nascido, entre elas, toxinas bacterianas e vírus (KELLY; COUTTS, 2000).

2.5 IGF-I e o desenvolvimento do trato intestinal

Os efeitos do colostro na maturação e desenvolvimento do trato gastrintestinal devem-se principalmente a presença dos fatores de crescimento, sendo o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) um dos mais investigados (BLUM; BAUMRUCKER, 2002; BLUM; HAMMOM, 2000; BÜHLER et al., 1998; GEORGIEVA et al., 2003; KINDLEIN et al., 2008a; PAULETTI et al., 2007). Trata-se de um polipeptídeo de cadeia simples, contendo aproximadamente 70 aminoácidos e peso molecular de 7647 daltons, Figura 1. A sua estrutura é homóloga a pró-insulina e a sua seqüência de aminoácido altamente conservada entre os mamíferos. Este fator

de crescimento participa do eixo hipotálamo-hipófise como mediador dos efeitos do hormônio do crescimento (GH), estimulando a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (GEORGIEV, 2008; HOSSNER; McCUSKER; DODSON, 1997; WERNER; WEINSTEIN, BENTOV, 2008).

Figura 1 – Estrutura terciária do IGF-I

Fonte: Hua et al. (2006)

Potencialmente todas as células do corpo são capazes de secretar o IGF-I, mas as concentrações séricas desta molécula provem principalmente do fígado, após este ser estimulado pelo GH. Na forma livre, o IGF-I possui meia-vida de apenas 20 minutos, mas existem pelo menos seis proteínas ligadoras do IGF-I (IGFBP) que podem aumentar a meia-vida deste fator de crescimento em até duas horas, Tabela 3. Estas proteínas também são secretadas pelo fígado e são responsáveis pela disponibilização e armazenamento do IGF-I, aproximadamente 95 a 99% do IGF-I sérico está ligado às IGFBP, principalmente a IGFBP-3 (HOSSNER; McCUSKER; DODSON, 1997; WERNER; WEINSTEIN, BENTOV, 2008).

Tabela 3 – Propriedades físicas e biológicas das IGFBPs¹

Propriedades	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6
Tamanho (kDa)	25,3	31,4	28,7	26,0	28,6	22,8
Cisteína (n°)	18	18	18	20	18	16
Sítio ligação heparina	+	+	+	-	+	+
Preferência de ligante	I e II	I < II	I e II	I e II	I < II	I << II
Nível sérico fetal (µL)	25	640	1000	?	?	?
Nível sérico adulto (µL)	12	180	3200	450	?	220

¹Informações referentes a proteínas de humanos; ? desconhecido; + presente; - ausente.

Fonte: Hossner, McCusker e Dodson (1997)

Para desencadear suas ações nas células, o IGF-I interage com receptores de membrana que são expressos em quase todos, senão todos os tecidos do corpo. Os receptores associados ao IGF-I são nomeados como tipo I (IGF-IR) e tipo II/ manose-6-fosfato. O IGF-IR é homólogo ao receptor da insulina e apresenta estrutura heterotetramérica com duas subunidades α e duas subunidades β ligadas por pontes dissulfídicas, Figura 2 (ADAMS et al., 2000; GEORGIEV, 2008; WERNER; WEINSTEIN, BENTOV, 2008). A fosforilação de resíduos intracelulares de tirosina desencadeia, conseqüentemente, uma cascata de reações enzimáticas intracelulares (SPINOLA e CASTRO; GUERRA-JÚNIOR, 2002). O receptor do tipo II/manose-6-fosfato, por sua vez, não contém atividade tirosina-quinase e reconhece fracamente o IGF-I (ADAMS et al., 2000; HOSSNER; MCCUSKER; DODSON, 1997). A expressão destes receptores pode variar conforme o tecido e a fase de desenvolvimento dos animais. Morgan et al. (1996), estudando a expressão de receptores para o IGF-I na mucosa do intestino delgado de leitões, verificaram um declínio na expressão dos receptores da mucosa entre o nascimento e a desmama. Schober et al. (1990), também estudando a presença de receptores para o IGF-I no intestino delgado de leitões recém-nascidos, verificaram que a ligação específica de ¹²⁵I-IGF-I às membranas ao nascimento foi quase duas vezes maior em comparação às membranas de animais com três e cinco dias de idade.

Figura 2 – Estrutura do receptor para o IGF-I do tipo I

Fonte: Adams et al. (2000)

A concentração de IGF-I no colostro bovino varia de 100 a 2000 ng/mL e, a cada sete dias de lactação, decresce para concentrações menores que 25 ng/mL (ELFSTRAND et al., 2002; SEJRSEN et al., 2001). Entretanto, os trabalhos revelam que este fator de crescimento não é absorvido pelas células intestinais (HAMMOM; BLUM, 1997; HAMMOM et al., 2002; SPARKS et al., 2003). Pauletti et al. (2007), estudando a flutuação sérica de IGF-I em bezerros recém-nascidos, não encontraram alteração dos níveis séricos dos animais nos primeiros sete dias de vida quando estes receberam colostro com diferentes concentrações do peptídeo, 500 a 3000 µg e 3000 a 6000 µg. Os autores sugerem que o mesmo não é absorvido pelas células intestinais e seu efeito principal é de mediador tópico do desenvolvimento.

De acordo com Houle et al. (1997), a atividade celular no epitélio intestinal também está associada com a ingestão de IGF-I. Os autores observaram que leitões suplementados oralmente com rhIGF-I (200 µg/Kg/dia) até o sétimo e décimo quarto dia de vida apresentaram aumento na atividade de dissacaridases intestinais em relação a animais privados de colostro. Nos primeiros dias de vida, ocorrem alterações na atividade de enzimas extracelulares, como o aumento da atividade específica da maltase, sacarase, aminopeptidases A e N e da dipeptidil peptidase IV e diminuição da atividade específica da lactase e, segundo Kelly e Coutts (2000), a privação de colostro pode diminuir ou atrasar a atividade enzimática neste período. Em ovinos e suínos, a atividade de glucosidases, entre elas a sacarase-isomaltase e

maltase-glucoamilase, não aumenta até o período pós-natal. Enquanto a aminopeptidase N aumenta sua atividade durante a gestação em ambas as espécies, a atividade específica da lactase aumenta em suínos e declina em cordeiros durante os últimos dias de gestação (SANGILD; FOWDEN; TRAHAIR, 2000). Sauter et al. (2004) observaram que a ingestão de colostro promove a ativação da enzima aminopeptidase N no íleo de bezerros no quinto dia de vida. Os autores sugeriram que o aumento na atividade desta enzima pode ser uma resposta a componentes nutricionais do colostro, como alto conteúdo protéico, ou a fatores não nutricionais como fatores de crescimento, entre eles o IGF-I, e hormônios. Estudos têm se dedicado a investigar a atividade específica de enzimas extracelulares do epitélio intestinal de suínos e cordeiros, mas pouco se sabe sobre desenvolvimento da capacidade digestiva durante o período de absorção de imunoglobulinas em caprinos neonatos.

Os efeitos específicos do colostro e de peptídeos bioativos sobre a atividade celular têm sido estudados no trato intestinal (BAGALDO et al., 2006, 2007; BLÄTTER et al., 2001; BÜHLER et al., 1998; KINDLEIN et al., 2008a). Segundo Bagaldo et al. (2007), o fornecimento de IGF-I à bezerros recém-nascidos pode determinar diminuição na taxa de apoptose, aumentando, conseqüentemente, a meia-vida dos enterócitos. Zhang, Malo e Buddington (1997) verificaram que o aumento no peso da mucosa intestinal foi acompanhado pelo aumento do conteúdo protéico e os autores sugerem três fatores relacionados a este fato. Endocitose de imunoglobulinas e outras proteínas do colostro, efeito estimulante do colostro na concentração de RNA intestinal e, conseqüentemente, síntese protéica pelos enterócitos e, por último, efeito estimulante do colostro na divisão celular de células das criptas intestinais. De acordo com a terceira hipótese, Moretti et al. (2010b) observaram que após a ingestão de colostro bovino ou ovino o epitélio intestinal de cordeiros às 24 horas de vida apresentou maior porcentagem de células em divisão, refletindo a provável influência desta secreção sobre a atividade mitótica nas criptas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

A parte experimental de campo foi conduzida no Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos, Departamento de Zootecnia, ESALQ/USP. As análises laboratoriais foram executadas no Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal (LAFA), Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal (LNCA), Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) e no Núcleo de Apoio à Pesquisa à Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA), ESALQ/USP.

3.2 Formação dos bancos de colostro

Aproximadamente oito litros de colostro caprino e 12 litros de colostro bovino foram obtidos de 14 cabras e duas vacas. Estes foram homogeneizados para a formação de dois *pools*, sendo um de colostro caprino e outro de colostro bovino, e armazenados a -20°C. O *pool* de colostro bovino foi encaminhado para o Laboratório de Bioquímica e Análise Experimental (LAN/ESALQ/USP), para o processo de liofilização. Após, o pó obtido foi homogeneizado e armazenado em um recipiente hermeticamente vedado a -20°C. As concentrações de IgG nos *pools* de colostro caprino e bovino foram determinadas por imunodifusão radial (Mancini et al., 1965, modificado por Besser, 1985), encontrando-se valores de 110 e 118 mg/mL, respectivamente.

No momento do fornecimento das refeições aos animais, o *pool* de colostro caprino foi diluído com leite integral na razão 1:1 para atingir a concentração de 55 mg/mL de IgG. O *pool* de colostro bovino liofilizado foi primeiramente reconstituído em água, realizando-se a diluição de 262,6 gramas de pó em 737,8 mL de água. Após, o *pool* de colostro bovino reconstituído em água foi diluído com leite integral na razão 1:1,15 para atingir a concentração de 55 mg/mL de IgG. Amostras das refeições finais fornecidas aos animais foram coletadas e mantidas a -20°C para posterior quantificação de IGF-I e análise bromatológica.

3.3 Animais e tratamentos

No presente projeto foram utilizados 32 cabritos mestiços Saanen x Boer. Após o nascimento, os mesmos foram separados de suas mães, submetidos à assepsia umbilical e pesados. Vinte e nove recém-nascidos foram distribuídos

aleatoriamente em dois grupos: 15 animais aleitados com colostro bovino liofilizado (CBL) e 14 com colostro caprino (CC). Os animais receberam colostro em quantidades correspondentes a 5% do peso inicial às 0, 7 e 14 horas de vida. Três animais foram abatidos logo após o nascimento sem a ingestão de colostro, constituindo um grupo adicional (0 hora). Os animais foram submetidos a procedimentos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (ESALQ/USP).

A média e desvio padrão do peso inicial dos animais dos grupos CBL, CC e 0 hora foram $3,84 \pm 0,642$, $3,70 \pm 0,644$ e $4,30 \pm 0,360$ Kg, respectivamente. Esta variável foi considerada inicialmente como co-variável nas análises estatísticas.

3.4 Amostragem de sangue

Amostras de sangue de cada cabrito foram retiradas da veia jugular (4 mL) e centrifugadas a $4000 \times g$ por 15 minutos. As amostras de soro foram transferidas para frascos identificados e mantidos a -20°C . As coletas seguiram o cronograma: 0, 7, 14, 18, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de vida.

3.5 Amostragem histológica

Os animais dos grupos CBL e CC foram eutanasiados aleatoriamente para coleta de amostras às 18, 36 e 96 horas de vida e os três animais do grupo 0 hora logo após o nascimento, sem a ingestão de colostro. Nos horários experimentais, os cabritos foram pesados, anestesiados com 15 mg/Kg de cloridrato de ketamina e 0,3 mg/Kg de xilazina, e exsangüinados através de corte da jugular. Em seguida, amostras do duodeno, jejuno médio e íleo foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido para determinação da atividade de enzimas extracelulares, quantificação de proteína, DNA e RNA total e quantificação da expressão relativa do IGF-IR.

Amostras dos segmentos intestinais também foram coletadas para análises utilizando-se microscopia óptica e eletrônica. Após o tecido ser aberto longitudinalmente e esticado em placas de petri com o auxílio de alfinetes, procedeu-se a lavagem com solução salina 0,9% a 5°C e fixação por imersão em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,2 por 30 minutos. Decorrido o tempo, amostras foram armazenadas em solução

paraformaldeído 4% em PBS ou em solução Karnowsky (2,5% glutaraldeído, cacodilato de sódio 0,1 M e CaCl_2 0,001 M).

3.6 Análises laboratoriais

3.6.1 Bromatologia das refeições

As amostras das refeições de colostro bovino liofilizado e caprino foram analisadas para umidade e voláteis, matéria seca e proteína bruta, segundo a metodologia descrita pela A.O.A.C (2000).

A matéria seca e umidade e voláteis foram determinados após perda por secagem em estufa. Esta foi calculada após quatro horas de secagem em estufa a 105°C, sendo o resultado expresso em porcentagem de matéria seca e porcentagem de umidade e voláteis. Para a análise de proteína bruta, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas. Adicionaram-se 10 mL de ácido sulfúrico e um grama de catalisador a 1 g da amostra para digestão do material. Este processo reduz e transforma o nitrogênio da amostra em sulfato de amônio. Procedeu-se destilação do material e adição de ácido bórico 20%, formando borato de amônio. Este composto formado foi dosado com ácido clorídrico (1 M) padronizado.

3.6.2 Quantificação da imunoglobulina G sérica e no colostro

A fração IgG sérica foi quantificada por imunodifusão radial (MANCINI; CARBONARA; HERMANS, 1965). Para a quantificação da IgG nos *pools* de colostro bovino e caprino também foi utilizado o método de imunodifusão radial descrito por Mancini, Carbonara e Hermans (1965) e modificado por Besser et al. (1985).

A técnica de imunodifusão radial baseia-se na leitura do diâmetro formado pela reação da IgG da amostra com anti-IgG em meio ágar, comparando-se com diâmetros padrões pré-estabelecidos. O ágar foi preparado com concentração de 1,2% de agarose em tampão TRIS-HCl (pH 8,0) com anti-IgG bovino ou caprino (Sigma Chemicals Company, USA) e para as curvas padrão foram utilizadas IgG bovina e caprina (Sigma Chemicals Company, USA), respectivamente. Além das placas para as curvas padrão, todas as placas continham duas concentrações padrão para avaliar variações entre placas.

As amostras de soro e colostro foram diluídas 1:10 e 1:50 em TRIS-HCl (pH 8,0), respectivamente, e 5 µL foi aplicado, em duplicata, nas placas. Após incubação em câmara úmida por 24 horas a 4°C, os diâmetros de precipitação foram medidos e

registrados em milímetros. As repetições cujas duplicatas variaram acima de 5% foram novamente analisadas.

As equações obtidas seguiam o modelo abaixo:

$$Y = aX + b$$

Em que:

Y = log concentração de IgG em mg/mL;

X = diâmetro da reação em mm.

Também foi avaliada a eficiência aparente de absorção (EAA) da IgG às 7, 14, 18 e 24 horas de vida utilizando-se a fórmula estabelecida por Husband, Brandon e Lascelles (1973) e modificada por Besser e Osborn (1993).

$$EAA (\%) = \frac{[\text{concentração de IgG no soro} \times \text{volume plasmático}]}{[\text{concentração de IgG no colostro} \times \text{volume colostro ingerido}]} \times 100$$

Para o volume plasmático foi utilizado o valor de 8% em relação ao peso inicial (BESSER; OSBORN, 1993) e para a concentração de IgG no colostro o valor de 55 mg/mL. Para o cálculo da eficiência aparente de absorção às 7, 14 e 18 horas de vida (EAA_{7hr} , EAA_{14hr} e EAA_{18hr} , respectivamente) foram utilizadas as concentrações de IgG em mg/mL às 7, 14 e 18 horas de vida, respectivamente, e o volume de uma, duas e três refeições de colostro (5% do peso inicial), respectivamente. A eficiência aparente de absorção às 24 horas, denominada EAA total (EAA_{total}) foi calculada utilizando-se a concentração de IgG, em mg/mL, às 24 horas e o volume de três refeições de colostro (5% do peso inicial).

3.6.3 Quantificação da proteína total sérica

A concentração da proteína total (PT) sérica foi determinada pelo método de biureto (REINHOLD, 1953). Foram misturados 100 µL de soro com 4900 µL de 0,75 M NaOH e 1000 µL de biureto reativo, solução de sulfato de cobre (II), citrato de sódio e carbonato de sódio. Após 20 minutos de reação protegida da luz, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 545 nm. Para cada bateria de amostras, foi estabelecida uma curva

padrão que relaciona concentrações de albumina bovina padrão (Sigma Chemicals Company) a valores de absorbância. As amostras foram analisadas em duplicata, porém quando foi observada variação acima de 5%, a análise foi repetida.

3.6.4 Quantificação do IGF-I sérico e no colostro

A concentração do IGF-I sérico nos cabritos, bem como nas amostras de colostro, foi determinada por ensaio imunoenzimático pós-extração, utilizando-se o kit IGF-1 EIASIA KAP1581 (DiaSource Immunoassays S.A.). Para tal, 100 µL da amostra e 400 µL de solução de pré-tratamento (etanol ácido) foram incubados por 30 minutos e, em seguida, centrifugados por dois minutos a 4.400 x g. Do sobrenadante, 100 µL foram separados e neutralizados com 600 µL de solução de neutralização, tampão fosfato com caseína bovina e azida sódica (<0,1%).

Os padrões, controles e amostras extraídas (50 µL) foram adicionados aos poços das microplacas revestidos com anti-IGF-I. Imediatamente, 100 µL de IGF-I-HRP (IGF-I conjugado com a enzima horseradish peroxidase) foram dispensados, seguindo-se incubação por uma hora em temperatura ambiente. As placas foram, então, lavadas três vezes com 400 µL de solução de lavagem (Tris-HCl) e 100 µL de solução cromogênica (solução de tetrametilbenzidina - TMB) foram adicionados a cada poço, em até 15 minutos. Após 30 minutos de reação protegida da luz a temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de solução de parada (HCl 1 N). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 450 nm. Para cada microplaca, foi estabelecida uma curva padrão que relacionou concentrações de IGF-I (kit IGF-1 EIASIA KAP1581, DiaSource Immunoassays S.A.) a valores de absorbância. As amostras foram analisadas em duplicata, porém quando observada variação acima de 5%, a análise foi repetida. Duas amostras controle fornecidas pelo kit também foram analisadas em cada microplaca.

3.6.5 Quantificação da proteína total no tecido intestinal

A concentração da proteína total nos segmentos intestinais foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) modificado por Hartree (1972). Amostras dos segmentos (1 g) foram descongeladas e homogeneizadas em água destilada (10 mL) utilizando-se ultra-turrax (Polytron®-Kinematica GnbH) por um minuto a 11000 rpm. O homogeneizado (1 mL) foi incubado com 1 mL de hidróxido de sódio 1 M,

adicionado de 0,2% triton, *overnight* a 2°C. Posteriormente, 80 µL da solução protéica anterior foi homogeneizada com 400 µL de solução contendo carbonato de sódio, hidróxido de sódio, citrato de sódio e sulfato de cobre. Após um minuto de reação em temperatura ambiente, adicionou-se 40 µl do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Co.) diluído na proporção 1:1 com água destilada. A leitura da absorbância foi realizada após 30 minutos de reação protegida da luz em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 600 nm. Para cada bateria de amostras, foi estabelecida uma curva padrão que relaciona concentrações de albumina bovina padrão (Sigma-Aldrich Co.) a valores de absorbância. As amostras foram analisadas em duplicata, porém quando foi observada variação acima de 5% a análise foi repetida.

3.6.6 Quantificação do DNA total no tecido intestinal

A determinação do DNA total nos segmentos intestinais foi realizada de acordo com o método estabelecido por Labarca e Paigen (1980). Para a extração do DNA total, 19 mL de água destilada foram adicionados a 1 g de tecido e homogeneizados por um minuto utilizando-se ultra-turrax (Polytron®-Kinematica GnbH). O homogeneizado (1 mL) foi transferido para um microtubo e 0,5 mL de ácido perclórico (PCA) 0,6 M foi adicionado. Após incubação *overnight* a 4°C, a solução foi homogeneizada com vortex e novamente incubada a 4°C por 10 minutos. Seguiu-se centrifugação por 15 minutos a 4°C e 3306 x g. O sobrenadante foi descartado e o pelete lavado duas vezes com 0,4 mL de PCA 0,2 M. Cada lavagem foi procedida de centrifugação nas condições citadas anteriormente. O material precipitado foi homogeneizado com 0,8 mL de hidróxido de potássio 0,3 M e incubado a temperatura ambiente e 150 rpm por uma hora. As amostras foram, então, resfriadas por cinco minutos no gelo e por dez minutos com 0,4 mL de PCA 1,2 M gelado e, em seguida, centrifugadas a 3306 x g, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo e utilizado para posterior quantificação do RNA total. O pelete foi lavado duas vezes com 1 mL de PCA 0,2 M gelado. A cada lavagem, o sobrenadante contendo o RNA total foi adicionado ao anterior e o pelete resultante foi congelado a -20°C.

Para a quantificação do DNA, o pelete foi descongelado, dissolvido em 1 mL de hidróxido de potássio 0,1 M e incubado *overnight* a 4°C. Posteriormente, 1 mL de solução contendo 1 µL/mL de corante Hoechst (bis-bensimida H33258, Sigma-

Aldrich Co.), 1 mM EDTA, 2 M NaCl e 10 mM Tris, foram adicionados a 40 µL da amostra de DNA e 60 µL de água destilada. Essa solução foi quantificada em fluorímetro HOEFER DyNA Quanti 200 (Amersham Biosciences). DNA de timo de bezerro (Sigma-Aldrich Co.) foi utilizado para a curva padrão. Os resultados são apresentados como mg de DNA/g de tecido.

3.6.7 Quantificação do RNA total no tecido intestinal

O RNA total resultante do protocolo descrito anteriormente foi descongelado e 3 mL de PCA 0,2 M foram adicionados. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 260 nm. Os resultados são apresentados como mg de RNA/g de tecido.

3.6.8 Atividade enzimática extracelular no tecido intestinal

3.6.8.1 Peptidases

Amostras da mucosa intestinal (aproximadamente 1 g) foram descongeladas, homogeneizadas em água destilada (10 mL) utilizando-se ultra-turrax (Polytron®-Kinematica GnbH) por um minuto a 11000 rpm. Para a avaliação da atividade das enzimas aminopeptidase N e dipeptidil peptidase IV, o homogeneizado foi diluído para 5 mg/mL de tecido e para a avaliação da atividade da aminopeptidase A para 20 mg/mL de tecido. Soluções de tampão glicina (71 mM pH 8,0) contendo 1,5 mM dos substratos *L*-leucine-*p*-nitroanilide, glicil-*L*-prolil-*p*-nitroanilide hydrochloride e *L*-glutamic acid 1-(4-nitroanilide) (Sigma-Aldrich Co.) foram utilizadas para a atividade enzimática da aminopeptidase N (EC 3.4.11.2), dipeptidil peptidase IV (EC 3.4.14.5) e aminopeptidase A (EC 3.4.11.7), respectivamente (MAROUX; LOUVARD; BARATTI, 1973; NAGATSU et al., 1976).

Foram misturados 300 µL do homogeneizado da mucosa intestinal com 200 µL de tampão glicina contendo substrato das enzimas (pré-aquecido a 37°C por cinco minutos). Após 30 minutos a 37°C, a reação foi inibida com 3 mL de tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5,0). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 385 nm. Para cada bateria de amostras foi estabelecida uma curva padrão que relaciona concentrações de *p*-nitroanilide (Sigma-Aldrich Co.) a valores de absorbância. A atividade enzimática final foi calculada subtraindo-se valor obtido do branco, em que o homogeneizado foi adicionado após a adição do tampão acetato de sódio. As

amostras foram analisadas em duplicata, porém quando foi observada variação acima de 5%, a análise foi repetida. A atividade enzimática foi calculada como unidades internacionais (U) por grama de tecido. Uma U corresponde a um μmol de substrato hidrolisado por minuto a 37°C.

3.6.8.2 Dissacaridases

Amostras da mucosa intestinal (aproximadamente 1 g) foram descongeladas, homogeneizadas em água destilada (10 mL) em ultra-turrax (Polytron®-Kinematica GnbH) por um minuto a 11000 rpm e diluídas para 30 mg/mL de tecido. Os substratos d-lactose monohidratada, d-maltose monohidratada e sacarose (56 mM) (Sigma-Aldrich Co.) diluídos em tampão maleato (0,1 M, pH 6,0) foram utilizados para a atividade enzimática da lactase (EC 3.2.1.23), maltase (EC 3.2.1.20) e sacarase (EC 3.2.1.48), respectivamente (DAHLQVIST, 1964).

Foram misturados 40 μL do homogeneizado da mucosa intestinal com 200 μL de tampão maleato contendo o substrato (pré-aquecido a 37°C por cinco minutos). Após 60 minutos a 37°C, a reação foi inibida imergindo os tubos de ensaio em banho-maria a 100°C por um minuto. A dosagem da glicose liberada da reação enzimática foi realizada utilizando-se o kit Glicose BioLiquid (Biodiagnóstica Ltda.). Foram adicionados 2 mL do reagente enzimático contendo solução de 4-aminofenazona, hidroxibenzoato e glicose oxidase a 80 μL do sobrenadante obtido anteriormente. Após incubação a 37°C por 20 minutos, evitando luz direta, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 505 nm. Para cada bateria de amostras, foi estabelecida uma curva padrão que relaciona concentrações de glicose (kit “Glicose BioLiquid”, Biodiagnóstica) a valores de absorbância. A atividade enzimática final foi calculada subtraindo-se uma amostra em branco em que o homogeneizado foi inativado a 100°C antes da incubação com o substrato. As amostras foram analisadas em duplicata, porém quando observada uma variação acima de 5% a análise foi repetida. A atividade enzimática foi calculada como unidades internacionais (U) por grama de tecido. Uma U corresponde a um μmol de substrato hidrolisado por minuto a 37°C.

3.6.9 Microscopia óptica

Para a análise histoquímica da atividade da enzima fosfatase ácida, os tecidos armazenados em solução de paraformaldeído 4% em PBS foram lavados quatro vezes consecutivas com PBS (0,1 M, pH 7,2) e armazenados nesta solução *overnight* a 3°C. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70% e 90% uma vez por dez minutos e 100% duas vezes por dez minutos).

Na etapa seguinte, o material histológico foi pré-infiltrado por quatro horas com solução de resina glicol metacrilato (JB-4, Polyscience Inc.) diluída em etanol 100% na proporção 1:1. Após pré-infiltração, os tecidos passaram para a resina pura e, em seguida, foram embebidos em resina plástica a temperatura ambiente. Os blocos, contendo os tecidos incluídos, foram seccionados por navalha de aço em um micrótomo Leica RM 2125RT (Leica Microsystems), obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. Foram obtidos no mínimo cinco cortes por segmento intestinal. Os cortes foram, então, estirados na água e colocados em lâminas.

Para a localização da atividade da fosfatase ácida, as secções foram incubadas em meio Gomori, solução contendo tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 0,5), nitrato de chumbo e o substrato da enzima (β -glicerofosfato de sódio), por 90 minutos a 37°C. As lâminas foram lavadas com água destilada e incubadas com sulfato de amônio 1% por dois minutos (BANCROFT; STEVENS, 1996). Os tecidos foram pós-corados com azul de toluidina O e examinados. Amostras de baço de rato foram utilizadas como controle positivo.

3.6.10 Microscopia eletrônica

3.6.10.1 Microscopia eletrônica de varredura

Os segmentos intestinais armazenados em solução Karnovsky foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1 M duas vezes por cinco minutos e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por duas horas. Procederam-se três lavagens consecutivas com água destilada e desidratações em soluções de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70 e 90% uma vez por dez minutos e 100% duas vezes por 15 minutos). Após a secagem ao ponto crítico (Blazers CPD-030), os espécimes foram metalizados com ouro paládio (40 nm) a vácuo utilizando o equipamento Blazers MED-010 e examinados ao microscópio eletrônico (LEO 435 VP, Carl Zeiss). Dez imagens por segmento

intestinal foram captadas para a determinação da densidade de vilosidades (vilosidades/cm²), bem como para análises morfológicas dos segmentos.

3.10.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Em outro segmento do projeto, Nordi (2010) observou, por imunohistoquímica, que a localização da IgG nos diferentes segmentos intestinais e ao longo das vilosidades foi a mesma nos grupos CBL e CC. Assim, em função do custo do procedimento, foram selecionados os animais dos grupos 0 hora e CC para as análises ultraestruturais e de imunocitoquímica utilizando microscopia eletrônica de transmissão.

Para a análise ultraestrutural do epitélio intestinal, os tecidos armazenados no Karnovsky foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, desidratados em soluções de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70 e 90% uma vez por dez minutos e 100% duas vezes por 15 minutos) e embebidos em resina Spurr. Os blocos obtidos foram seccionados por navalha de semi-cristal em um ultra-micrótomo para a obtenção de cortes ultra-finos (70 nm). Após contrastação em acetato de uranila por 25 minutos e citrato de chumbo por 15 minutos, os tecidos foram observados no microscópio eletrônico EM 900 (Carl Zeiss).

Para a realização da técnica de imunocitoquímica, amostras armazenadas no paraformaldeído 4% em PBS foram desidratadas em soluções crescentes de etanol (30, 50, 70 e 90% uma vez por dez minutos e 100% duas vezes por 15 minutos) e embebidas em resina LR White. Cortes ultra-finos (70 nm) foram coletados em telas de níquel e incubados com tampão glicina 0,05 M por 15 minutos. Posteriormente, as grades contendo os cortes foram incubadas por 30 minutos com tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA). As grades foram lavadas com tampão de incubação (PBS 20 mM, pH 7,4, 0,01% BSA) e incubadas *overnight* a 4°C com anti-IgG caprino diluído na razão 1:500 em PBS. Após lavagens com tampão de incubação, os cortes foram incubados com proteína A conjugada a ouro coloidal (Electron Microscopy Science), com partículas de 10 nm por duas horas. Após lavagens com tampão de incubação e água destilada, procedeu-se a contrastação em acetato de uranila por 25 minutos e em citrato de chumbo por 15 minutos. As amostras foram, então, observadas ao microscópio eletrônico EM 900 (Carl Zeiss).

3.6.11 Expressão do receptor específico para o IGF-I no tecido intestinal

3.6.11.1 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total, 50 a 100 mg dos tecidos foram adicionados em tubos de reação contendo 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen Corporation). O tecido foi cortado, macerado com o auxílio de pistilos, homogeneizado e incubado por cinco minutos em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram centrifugadas por dez minutos, a 12000 x *g* e 4°C. Acrescentou-se ao sobrenadante 200 µL de clorofórmio e, após agitação vigorosa, incubou-se esta solução por três minutos em temperatura ambiente. As amostras foram, então, centrifugadas a 12000 x *g* por 15 minutos a 4°C, removendo-se, a seguir, a fase aquosa (fase superior). Adicionou-se a esta fase 500 µL de álcool isopropílico e, após incubação por dez minutos em temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 12000 x *g* por 10 minutos a 4°C. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e, ao precipitado, adicionou-se 1 mL de etanol 75%. Centrifugou-se o material por cinco minutos a 7500 x *g* e 4°C, descartando-se o sobrenadante. O pelete foi seco em temperatura ambiente, por dez a 15 minutos, dissolvido em H₂O tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenado a -80°C.

Após a extração, o material foi quantificado em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 260 nm, avaliando-se também a pureza do material pela relação A₂₆₀/A₂₈₀. Eletroforese das amostras em gel de agarose 1% foi realizada para verificar a qualidade das amostras de RNA total extraídas. A integridade do material foi avaliada pela presença e relação das bandas do RNA ribossômico (28S e 18S).

3.6.11.2 Reação de transcrição reversa

O RNA extraído foi utilizado na síntese do DNA complementar (DNAC) por reação de transcrição reversa. Anteriormente à reação, o DNA genômico das amostras de RNA foi removido incubando-se 1 µg de RNA com 1 µL de tampão de reação contendo MgCl₂, 1 µL de DNase I, livre de RNase (Fermentas Inc.) e 10 µL de água livre de nuclease a 37°C por 30 minutos e, posteriormente a adição de 1 µL de tampão EDTA 50 mM, a 65°C por dez minutos.

A síntese da primeira fita de DNAC foi catalisada pela enzima Transcriptase Reversa (RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas Inc.). Na

reação, utilizou-se uma alíquota de 11 µL do RNA tratado com DNase I, 1 µL de primers random hexamers, 4 µL de tampão de reação (5X), 1 µL de RiboBlock™ RNase Inhibitor (20u/µL), 2 µL de dNTP (10 mM) e 1 µL de RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µL). O total de 20 µL de reação foi homogeneizado e incubado a 25°C por cinco minutos, a 42°C por 60 minutos e a 70°C por cinco minutos e, finalmente, resfriado em gelo. O produto da reação foi armazenado a -20°C.

3.6.11.3 Obtenção dos iniciadores

A sequência de iniciadores senso (direto) e anti-senso (reverso) específicos para amplificação da sequência do gene que codifica o IGF-IR foram obtidos a partir do trabalho de Xing et al. (2007). A sequência de iniciadores senso e anti-senso específicos para amplificação dos genes que codificam o gliceraldeído trifosfato desidrogenase (GAPDH) e a β -actina, utilizados como referência, foram obtidas a partir do trabalho de Xing et al. (2007) e Zaros, Bricarello e Amarante (2007), respectivamente.

As seqüências dos iniciadores utilizados, tamanho dos produtos amplificados e temperatura de anelamento são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Seqüências senso e anti-senso dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real

Gene	Seqüência do primer (5'→3')	Tamanho do produto amplificado (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
Receptor do IGF-I	Senso: GCGGTTCTGTTGATAGTGG	287	63,8
	Anti-senso: ACATCTCCAGCCTCCTCA		
β -actina	Senso: CACCACACCTTCTACAACGAGC	382	67,2
	Anti-senso: CCTTGATGTCACGGACGATTTC		
GAPDH	Senso: GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	194	59
	Ansti-senso: CCCTCCACGATGCCAAAGT		

3.6.11.4 Otimização dos iniciadores por PCR

Os iniciadores foram otimizados por meio de reações de PCR com gradiente de temperatura no aparelho RoboCycler® Gradient 96 (Stratagene). Foram realizadas reações de PCR com amostras do duodeno, jejuno e íleo utilizando-se o kit (2X) PCR Master Mix (Fermentas Inc.). A reação padrão de amplificação de 0,8 µL de DNAc foi estabelecida com 12,5 µL de PCR Master Mix (2X), 1,25 µL de iniciador direto (concentração final de 0,5 µM), 1,25 µL de iniciador reverso

(concentração final de 0,5 μ M) e 9,2 μ L de água livre de nuclease, completando para um volume final de 25 μ L. O padrão básico de amplificação seguiu uma desnaturação inicial a 95°C por dois minutos; seguindo-se de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores por 30 segundo (gradiente de temperatura variando de 52 a 67°C, com 1°C de diferença entre as temperaturas), e extensão da fita de DNA a 72°C por um minuto. Seguiu-se uma extensão final a 72°C por cinco minutos, finalizando a reação de amplificação a 6°C.

A especificidade dos produtos amplificados para cada gene foi verificada em gel de agarose 1,5% para visualização do tamanho dos fragmentos amplificados. O tamanho das bandas foi comparado a um marcador de peso molecular conhecido, o Φ X174 RF DNA/HaeIII (Invitrogen Corporation).

3.6.11.5 PCR em tempo real quantitativo

Vários sistemas podem ser usados na técnica de PCR em tempo real, um deles é a utilização de corantes como SYBR Green, que se liga ao DNA dupla fita que esta sendo sintetizado emitindo fluorescência. Assim, a detecção e quantificação do marcador fluorescente é proporcional a quantidade de produto de PCR da reação.

Para as reações, foram utilizados: 6 μ L de água livre de nuclease, 1,25 μ L de iniciador direto e reverso (concentração final de 0,5 μ M) e 12,5 μ L do mix contendo o corante fluorescente Sybr Green (Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), Fermentas Inc.). As reações foram preparadas adicionando-se 21 μ L do *mix* em cada pocinho da placa, seguidos de 4 μ L de DNAc em cada reação. As placas foram centrifugadas por um minuto a 700 x g e o equipamento utilizado para as análises foi o StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems). As condições iniciais de amplificação foram: 50°C por dois minutos e 95°C por dez minutos. Seguindo-se 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos. Ao término da reação, a curva de *melting* foi determinada para cada gene entre as temperaturas 59 e 95°C. A reação foi finalizada após dois minutos a 25°C. As amostras foram analisadas em triplicata e todo o experimento de PCR em tempo real incluiu uma amostra como controle negativo (sem DNAc). Os resultados da expressão gênica foram gerados e registrados como valores de Ct (*Threshold Cycle*).

3.6.11.6 Eficiência de amplificação da reação de PCR

Para calcular a eficiência de amplificação dos genes em cada segmento do intestino delgado, *pools* das amostras de DNAc do duodeno, jejuno e íleo foram formados. Curvas de diluição em série de DNAc (0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) foram realizadas. A partir dos dados obtidos, uma regressão linear foi realizada entre C_t e o $\log_{10}$ da diluição em série do DNAc para determinar o coeficiente angular da reta e a eficiência de amplificação utilizando a fórmula determinada por Rasmussen (2001):

$$\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{coeficiente angular da reta})}$$

De acordo com Meijerink et al. (2001), o valor da eficiência de amplificação deve ser próxima de 2.0. Este valor significa que a cada ciclo de amplificação 100% do material genômico foi duplicado.

3.6.11.7 Quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro

O método de quantificação relativa descrito por Pfaffl et al. (2001) baseia-se na diferença de expressão de genes entre grupos estudados. Dois métodos de quantificação relativa estão disponíveis e publicados: sem correção com a eficiência de amplificação e com correção com a eficiência de amplificação (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). Este último método envolve a quantificação do gene de interesse em relação a um gene referência, um gene constitutivo, que neste trabalho foram os genes GAPDH e β -actina.

O programa *Relative Expression Software Tool* (REST-384©) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002; <http://rest.gene-quantification.info/>) permite a comparação entre uma amostra desconhecida (tratamento) *versus* um controle, levando-se em consideração as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene referência bem como os resultados de crossing point (CP) das amostras:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{P\text{alvo}}(\text{média controle} - \text{média amostra})}}{(E_{\text{ref.}})^{\Delta C_{P\text{ref.}}(\text{média controle} - \text{média amostra})}}$$

Neste modelo, a expressão do gene alvo é normalizada pela expressão de um gene referência não regulado, classificado como gene constitutivo.

No presente trabalho, a expressão do IGF-IR foi analisado pelo programa REST-384©. Para tal procedimento, foram considerados os ciclos Ct do gene alvo e dos genes referência e as eficiências de amplificação destes.

3.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. As variáveis séricas, concentração da proteína total, concentração de IgG, eficiência aparente de absorção da IgG e concentração do IGF-I, foram analisadas através do procedimento PROC MIXED do programa SAS® (2008) como medidas repetidas no tempo, sendo o efeito de tratamento aplicado às parcelas e as medidas repetidas no tempo às subparcelas. Para a concentração da proteína total e do IGF-I, utilizou-se a matriz de covariância autoregressiva e para a concentração da IgG e eficiência aparente de absorção da IgG, a matriz de covariância de simetria composta heterogênea e a matriz de covariância não estruturada, respectivamente. O peso inicial dos animais foi considerado inicialmente como co-variável no modelo estatístico. Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Os valores da proteína total sérica e do IGF-I sérico são apresentados como média dos quadrados mínimos e erro padrão. Os dados originais da concentração sérica da IgG e da eficiência aparente de absorção da IgG, entretanto, não atenderam a pressuposição da normalidade e foram transformados utilizando-se a função raiz quadrada e a função logarítmica na base dez, respectivamente. Os resultados destas variáveis transformadas são apresentados como médias dos quadrados mínimos retransformadas (x^2 e 10^x , respectivamente) e intervalo de confiança de 95%.

Análise de correlação de Pearson, utilizando o procedimento PROC CORR do programa SAS® (2008), foi realizada entre as variáveis IgG e PT sérica.

As variáveis histológicas, proteína, DNA e RNA total, atividade enzimática e densidade de vilosidades, foram analisadas em cada segmento intestinal através do procedimento PROC MIXED do programa SAS® (2008) em um arranjo fatorial 2 x 3, tendo como efeitos principais o colostro fornecido e os horários experimentais. O peso inicial foi considerado inicialmente como co-variável no modelo estatístico. Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Os dados dos animais abatidos a 0 hora

foram analisados como um grupo adicional por contrastes ortogonais utilizando-se o programa PROC GLM e comparados pelo teste F ($\alpha=0,05$).

Análises de correlação de Pearson, utilizando o procedimento PROC CORR do programa SAS[®] (2008), foram realizadas para verificar associações de interesse entre a atividade das enzimas extracelulares.

O programa REST-384© foi utilizado para a análise estatística da expressão do IGF-IR. Este programa calcula as variações do Ct e na expressão relativa a partir de um teste não paramétrico de modo pareado fixo de relocação ao acaso (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test), descrito por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002), considerando-se a probabilidade de 5%

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Bromatologia das refeições

Os resultados da composição bromatológica e da concentração de IGF-I das refeições de colostro bovino liofilizado e colostro caprino são apresentados na Tabela 5. Os resultados encontrados para a porcentagem de matéria seca no colostro bovino liofilizado, $18,9 \pm 0,19\%$, e caprino, $20,1 \pm 0,18\%$, foram inferiores aos valores encontrados por Csapó et al. (1994) em vacas e cabras com gestão simples, 25,03 e 26,38% de matéria seca, respectivamente. Os mesmos autores também avaliaram a porcentagem de proteína bruta encontrando valores superiores ao do presente trabalho 14,50% e 15,28% no colostro bovino e caprino, respectivamente. Valores semelhantes foram observados por Hadjipanayiotou (1995) e Chen et al. (1998), 16,0 e 16,5% de proteína bruta, respectivamente.

No presente trabalho, as concentrações de IGF-I no colostro bovino liofilizado e caprino, que podem ser considerados baixos, estão dentro do espectro de variação encontrado por Boudry e Thewis (2009) e Sejrsen et al. (2001), 100 a 2000 ng/mL.

Tabela 5 – Composição bromatológica das refeições de colostro bovino liofilizado e colostro caprino

	Colostro bovino liofilizado	Colostro caprino
Umidade e voláteis (%)	$81,1 \pm 0,19$	$79,9 \pm 0,18$
Matéria seca (%)	$18,9 \pm 0,19$	$20,1 \pm 0,18$
Proteína bruta (%)	$9,4 \pm 0,07$	$9,8 \pm 0,06$
IGF-I (ng/mL)	$158,7 \pm 23,04$	$356,3 \pm 0,97$

4.2 Imunoglobulina G sérica

Os resultados das concentrações de IgG (mg/mL) são apresentados na Figura 3 e no Apêndice A. Para esta variável, verificou-se efeito de tratamento, horário experimental e interação entre tratamento e horário experimental ($P < 0,05$).

Figura 3 – Concentração de imunoglobulina G (mg/mL) sérica dos cabritos

^{ab}médias seguidas de letras diferentes no mesmo tratamento diferem entre horários experimentais pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida; *Não foi verificada diferença estatística pelo teste de Tukey entre os tratamentos dentro de cada horário experimental ($P > 0,05$); Dados retransformados (x^2).

Os resultados da EAA (%) são apresentados na Figura 4 e no Apêndice B. Verificou-se efeito de horário experimental e interação entre tratamento e horário experimental ($P < 0,05$).

Figura 4 – Eficiência aparente de absorção (%) dos cabritos (média) às 7, 14, 18 e 24 horas de vida (EAA_{7hr} , EAA_{14hr} , EAA_{18hr} e EAA_{total} , respectivamente)

^{ab}médias seguidas de letras diferentes no mesmo tratamento diferem entre horários experimentais pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida; *Não foi verificada diferença estatística pelo teste de Tukey entre os tratamentos dentro de cada horário experimental ($P > 0,05$); Dados retransformados (10^x).

A interação entre colostro e horário experimental, detectado pela análise de variância, indica diferença no comportamento da flutuação sérica da IgG entre CBL e CC. Foi possível observar que no grupo CBL às 14, 18, 24 e 48 horas as concentrações séricas de IgG foram maiores que às 0 e 7 horas, enquanto no grupo CC, apenas às 18 horas a concentração sérica foi maior que às 0 e 7 horas. A diferença no padrão de flutuação da IgG entre os grupos, indica uma tendência para a manutenção de níveis séricos mais elevados de IgG após a ingestão do colostro bovino liofilizado, revelando vantagem na utilização deste manejo.

O'Brien e Sherman (1993) estabelecem o valor de 12 mg/mL de IgG como mínimo para os caprinos não apresentarem falha na transferência de imunidade passiva. Mellado et al. (1998), por sua vez, definem concentrações acima de 8 mg/mL de IgG às 24 horas de vida de caprinos como significativas para resultar em menores índices de mortalidade no rebanho. Os valores séricos de IgG no grupo CBL mantiveram-se acima de 12 mg/mL entre 14 e 48 horas de vida, enquanto no grupo CC, a concentração sérica de IgG foi menor que este valor. De acordo com Castro et al. (2005), a ingestão de 4 g de IgG/kg de peso corporal é suficiente para

garantir a absorção adequada de imunoglobulinas do colostro. No entanto, no presente estudo, os animais ingeriram, até as 14 horas de vida, aproximadamente 8,25 gramas de IgG bovina ou caprina/kg de peso inicial e mesmo assim apresentaram absorção inadequada de imunoglobulinas.

Os valores de IgG sérico às 96 horas de vida foram 9,85 e 7,59 mg/mL para CBL e CC, respectivamente. Neste mesmo horário, valores semelhantes foram encontrados por Castro et al. (2005), 5,38 e 7,6 mg/mL, em cabritos alimentados com quatro refeições de colostro de cabra armazenados na forma congelada ou liofilizada e com concentrações de 16 e 22,88 mg/mL de IgG, respectivamente. Lima et al. (2009), por sua vez, oferecendo quatro refeições de colostro de cabra de alta qualidade (89,34 mg/mL de IgG) no prazo de 36 horas de vida dos cabritos, observaram concentração elevada de IgG sérica no quinto dia de vida, aproximadamente 24 mg/mL, valor próximo ao observado em animais adultos, aproximadamente 30 mg/mL.

A quantidade de imunoglobulinas transferidas para os recém-nascidos pode ser influenciada por vários fatores, incluindo o tempo decorrido entre o nascimento e o fornecimento de colostro e a concentração de imunoglobulinas nesta secreção láctea (ARGÜELLO et al., 2004; FLAIBAN et al., 2009). No presente estudo, a capacidade de absorção de IgG diminui entre 7 e 14 horas em CC, enquanto em CBL, a EAA_{7hr} foi igual a EAA_{14hr} , resultado que pode estar relacionado com os valores séricos de IgG acima de 12 mg/mL entre 14 e 48 horas de vida neste último grupo.

A EAA_{7hr} , que representa uma capacidade máxima de absorção de imunoglobulinas da primeira refeição (EAA_{max}), foi superior a EAA_{total} em ambos os grupos, CBL e CC, indicando que o processo de absorção de IgG nas primeiras 24 horas de vida dos cabritos sofre alterações. Kindlein et al. (2007), trabalhando com bezerros suplementados com colostro contendo diferentes concentrações de IgG, também observaram valores de EAA_{max} superior a EAA_{total} . Os autores justificam que na fase inicial da primeira geração de enterócitos há uma maior intensidade dos mecanismos de absorção de macromoléculas. Durante as primeiras 24 horas de vida, o epitélio intestinal dos cabritos revelou diminuição na capacidade de internalização de IgG, confirmando que a primeira refeição de colostro deve ser fornecida o mais rapidamente possível após o nascimento.

Apesar do diferente comportamento da EAA entre os grupos, a EAA_{total} foi a mesma para CBL e CC, 9,55 e 8,02%, respectivamente, mostrando que as imunoglobulinas heterólogas, de bovinos, foram absorvidas pelos mesmos mecanismos celulares que absorvem as imunoglobulinas homólogas, caprinas.

4.3 Proteína total sérica

As concentrações de PT (média $\pm$ erro padrão) expressas em g/dL são apresentadas no APÊNDICE C. Para esta variável, verificou-se efeito de horário experimental ($P < 0,05$). A flutuação sérica da PT nos horários experimentais pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 – Concentração de proteína total (g/dL) sérica dos cabritos

^{abc}Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os valores médios para a PT observados no presente estudo estão de acordo com os observados por Ahmad et al. (2000) e Moretti et al. (2010b), que trabalharam com ovinos, Kindlein et al. (2007) e Pauletti et al. (2003), com bovinos, e Lima et al. (2009) com caprinos.

O aumento significativo nas concentrações séricas PT entre 0 e 14 horas de vida, revela a presença da IgG exógena na flutuação desta variável. No presente

estudo, a IgG sérica representou cerca de 20,37% e 16,11% da PT em CBL e CC, respectivamente, e a correlação entre as duas variáveis foi de 0,63 e 0,60, respectivamente. Moretti et al. (2010b), por sua vez, observaram que 34,76% da PT sérica de cordeiros alimentados com colostro bovino ou ovino correspondeu a fração IgG e a correlação entre as variáveis foi de 0,81. Assim, provavelmente em função da menor participação da IgG bovina ou caprina na PT sérica dos cabritos, diferença na flutuação da PT entre CBL e CC não foi observada até às 96 horas de vida.

4.4 IGF-I sérico

As concentrações de IGF-I (média $\pm$ erro padrão) expressas em ng/mL são apresentadas na Tabela 6. Para esta variável, não se verificou efeito de tratamento, horário experimental e interação entre os parâmetros ($P > 0,05$). A concentração inicial do IGF-I sérico contribuiu significativamente ($P < 0,05$) como co-variável para o modelo estatístico.

Tabela 6 – Concentração sérica de IGF-I (ng/mL) dos cabritos (média ± erro padrão)

	Horário experimental									Probabilidades ¹			
	0 hora	7 horas	14 horas	18 horas	24 horas	36 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Média Geral	T	H	T x H
CBL	44,3 ± 4,50	30,2 ± 4,37	28,0 ± 4,37	37,5 ± 4,48	27,8 ± 5,31	23,6 ± 7,45	19,9 ± 8,71	20,9 ± 8,61	29,4 ± 7,84	29,1 ± 2,93	NS	NS	NS
CC	40,0 ± 4,34	43,0 ± 4,34	46,0 ± 4,45	41,4 ± 4,45	43,8 ± 5,30	35,2 ± 7,23	29,4 ± 8,72	27,5 ± 10,69	24,3 ± 11,10	36,7 ± 3,39			
Média Geral	42,2 ± 3,11	36,6 ± 3,06	37,0 ± 3,10	39,5 ± 3,15	35,8 ± 3,74	29,4 ± 5,15	24,7 ± 6,21	24,2 ± 6,90	26,8 ± 6,86				

NS=P>0,05; ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida.

Não foram observadas diferenças na concentração de IGF-I sérico entre os grupos e horários experimentais. Houve, no entanto, variação considerável na concentração deste peptídeo bioativo ao nascimento, 13 a 93 ng/mL. Resultados semelhantes foram observados em bovinos por Gallo e Block (1990) e Pauletti et al. (2007). Sparks et al. (2003) sugerem que as concentrações séricas de IGF-I nas primeiras 48 horas de vida dependem dos níveis séricos registrados ao nascimento. No entanto, no presente trabalho, a variação sérica do IGF-I ao nascimento não afetou os valores até as 96 horas.

Independente do tratamento, as concentrações séricas de IGF-I dos cabritos ao nascimento foram consideravelmente baixas, 44,3 e 40,0 ng/mL para os grupos CBL e CC, respectivamente. Hashizume et al. (1999) observaram um valor superior, de aproximadamente 250 ng/mL de IGF-I sérico, em cabritos após o nascimento, sendo que este valor diminuiu para 100 ng/mL até a sexta semana de vida. Os autores sugerem que as concentrações séricas deste peptídeo bioativo nas primeiras semanas de vida estão relacionadas com o desenvolvimento pós-natal dos animais.

A quantidade de IGF-I ingerida pelo grupo CBL e CC foi aproximadamente 91 e 198 µg, respectivamente. Apesar do segundo grupo ter ingerido 2,17 vezes a mais de IGF-I, não foram observadas variações séricas. Pauletti et al. (2007), fornecendo quantidades mais elevadas que a do presente trabalho, 500 a 3000 µg e 3000 a 6000 µg também não identificaram diferenças séricas de IGF-I nos primeiros sete dias de vida de bezerros. Assim, o resultado deste estudo, como outros (BAUMRUCKER; HADSELL; BLUM, 1994; BLUM; BAUMRUCKER, 2002; HAMMOM; BLUM, 2002; PAULETTI et al., 2007; SPARKS et al., 2001), indica que a concentração de IGF-I sérico não é afetada pela quantidade desse peptídeo bioativo disponível no colostro e que seu principal efeito é de atuar topicamente no desenvolvimento do trato gastrintestinal. Estudos realizados por Donovan et al. (1997) e Vacher, Bestetti e Blum (1995), os quais verificaram que ¹²⁵I-IGF-I administrado para leitões recém-nascidos não contribuiu significativamente para o aumento do IGF-I sérico circulante, suportam esta hipótese.

4.5 Concentrações de proteína total, DNA e RNA total no tecido intestinal

As concentrações de proteína total, DNA, RNA e as razões entre estas variáveis no segmento duodeno são apresentadas na Tabela 7. Neste segmento, foram observadas diferenças apenas nas razões proteína/DNA e RNA/DNA. Para a razão proteína/DNA, o grupo 0 hora apresentou maior razão que nos tratamentos CBL 18 h, CC 18 h e CC 36 h ($P<0,05$). Para a razão DNA/RNA, foi observado efeito de horário experimental, sendo que às 96 horas a razão foi maior que às 18 horas ($P<0,05$).

Tabela 7 – Concentração de proteína total, DNA, RNA (mg/g de tecido) e razão entre as variáveis no duodeno dos cabritos (média $\pm$ erro padrão)

Proteína (mg/g tecido)	Horário experimental				Probabilidades ¹				
	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	T	H	T x H	GA
CBL		51,1 $\pm$ 4,74	51,6 $\pm$ 4,90	50,0 $\pm$ 4,80	50,9 $\pm$ 2,74	NS	NS	NS	NS
CC		42,4 $\pm$ 4,75	51,8 $\pm$ 4,74	40,2 $\pm$ 6,20	44,8 $\pm$ 3,04				
Média geral	54,1 $\pm$ 11,96	46,7 $\pm$ 3,35	51,7 $\pm$ 3,40	45,1 $\pm$ 3,97					
DNA (mg/g tecido)									
CBL		1,2 $\pm$ 0,22	0,7 $\pm$ 0,21	1,0 $\pm$ 0,20	1,0 $\pm$ 0,12	NS	NS	NS	NS
CC		1,6 $\pm$ 0,20	1,4 $\pm$ 0,20	0,7 $\pm$ 0,26	1,2 $\pm$ 0,13				
Média geral	0,8 $\pm$ 0,29	1,4 $\pm$ 0,15	1,1 $\pm$ 0,14	0,9 $\pm$ 0,17					
RNA (mg/g tecido)									
CBL		4,3 $\pm$ 0,46	3,9 $\pm$ 0,42	4,5 $\pm$ 0,42	4,2 $\pm$ 0,25	NS	NS	NS	NS
CC		4,0 $\pm$ 0,41	4,4 $\pm$ 0,46	3,5 $\pm$ 0,54	4,0 $\pm$ 0,27				
Média geral	4,8 $\pm$ 0,77	4,2 $\pm$ 0,31	4,2 $\pm$ 0,31	4,0 $\pm$ 0,34					
Proteína/DNA (mg/mg)									
CBL		41,3 $\pm$ 8,43 ^y	65,9 $\pm$ 8,53	51,1 $\pm$ 7,61	52,8 $\pm$ 4,69	NS	NS	NS	*
CC		28,3 $\pm$ 7,53 ^y	41,1 $\pm$ 7,52 ^y	56,0 $\pm$ 11,89	41,8 $\pm$ 5,32				
Média geral	97,8 $\pm$ 41,80 ^x	34,8 $\pm$ 5,64	53,5 $\pm$ 5,68	53,6 $\pm$ 7,04					
Proteína/RNA (mg/mg)									
CBL		11,2 $\pm$ 1,79	14,0 $\pm$ 1,65	11,8 $\pm$ 1,62	12,4 $\pm$ 0,96	NS	NS	NS	NS
CC		11,1 $\pm$ 1,60	12,4 $\pm$ 1,79	11,3 $\pm$ 2,09	11,6 $\pm$ 1,05				
Média geral	11,0 $\pm$ 0,69	11,2 $\pm$ 1,20	13,2 $\pm$ 1,23	11,6 $\pm$ 1,34					
RNA/DNA (mg/mg)									
CBL		3,9 $\pm$ 0,83	6,1 $\pm$ 0,77	4,3 $\pm$ 0,75	4,8 $\pm$ 0,45	NS	*	NS	NS
CC		2,5 $\pm$ 0,74	3,9 $\pm$ 0,83	6,3 $\pm$ 0,97	4,2 $\pm$ 0,49				
Média geral	4,9 $\pm$ 0,13	3,2 $\pm$ 0,56 ^b	5,0 $\pm$ 0,57 ^{ab}	5,3 $\pm$ 0,62 ^a					

* $P<0,05$; NS= $P>0,05$; ^{ab}médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre horários pelo teste de Tukey ($P<0,05$); ^{xy}médias com letras diferentes diferem pelo teste F ($P<0,05$); ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; GA= efeito do grupo adicional analisado por contrastes ortogonais, teste F ($P<0,05$); CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida.

As concentrações de proteína total, DNA, RNA e as razões entre estas variáveis no segmento jejuno são apresentadas na Tabela 8. Neste segmento, a concentração de proteína total foi influenciada pelo tratamento e horário experimental ($P < 0,05$), maiores níveis foram observados no grupo CBL e às 18 horas. Para esta variável, também foi observado efeito do grupo adicional ($P < 0,05$), a 0 hora os níveis de proteína total foram menores que os níveis nos grupos CBL 18 h e CC 18 h. A concentração de RNA foi influenciada pelo horário experimental ($P < 0,05$), maior nível foi observado às 96 horas. Para a razão proteína/DNA apenas efeito de tratamento foi observado, sendo que o grupo CBL apresentou maior razão ($P < 0,05$). A razão proteína/RNA foi influenciada pelo tratamento e horário experimental ($P < 0,05$), o grupo CBL apresentou maior razão em relação ao grupo CC e a razão foi maior às 18 horas e menor às 96 horas. Para esta variável, também foi observado efeito do grupo adicional ($P < 0,05$), a 0 hora a razão proteína/DNA foi menor que a razão no grupo CBL 18 h. Para a razão DNA/RNA, foi observado efeito de horário experimental, sendo que às 96 horas a razão foi maior que às 18 horas ($P < 0,05$).

Tabela 8 – Concentração de proteína total, DNA, RNA (mg/g de tecido) e razão entre as variáveis no jejuno dos cabritos (média $\pm$ erro padrão)

Proteína (mg/g tecido)	Horário experimental				Probabilidades ¹			
	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	T	H	T x H
CBL		94,6 $\pm$ 5,06 ^y	75,2 $\pm$ 5,20	58,0 $\pm$ 5,13	75,9 $\pm$ 2,92 ^A	*	**	NS
CC		80,9 $\pm$ 5,06 ^y	61,1 $\pm$ 5,06	57,0 $\pm$ 8,00	66,3 $\pm$ 3,57 ^B			
Média geral	63,9 $\pm$ 2,17 ^x	87,7 $\pm$ 3,57 ^a	68,2 $\pm$ 3,61 ^b	57,5 $\pm$ 4,77 ^b				
DNA (mg/g tecido)								
CBL		1,4 $\pm$ 0,17	1,2 $\pm$ 0,19	1,3 $\pm$ 0,17	1,3 $\pm$ 0,10	NS	NS	NS
CC		1,7 $\pm$ 0,17	1,3 $\pm$ 0,17	1,4 $\pm$ 0,22	1,5 $\pm$ 0,11			
Média geral	1,1 $\pm$ 0,23	1,5 $\pm$ 0,12	1,3 $\pm$ 0,13	1,3 $\pm$ 0,14				
RNA (mg/g tecido)								
CBL		3,4 $\pm$ 0,35	4,0 $\pm$ 0,40	5,3 $\pm$ 0,35	4,2 $\pm$ 0,21	NS	**	NS
CC		3,9 $\pm$ 0,35	4,5 $\pm$ 0,35	5,7 $\pm$ 0,55	4,7 $\pm$ 0,25			
Média geral	4,3 $\pm$ 0,39	3,7 $\pm$ 0,25 ^b	4,2 $\pm$ 0,26 ^b	5,5 $\pm$ 0,33 ^a				
Proteína/DNA (mg/mg)								
CBL		72,1 $\pm$ 6,95	71,7 $\pm$ 7,88	47,4 $\pm$ 7,03	63,7 $\pm$ 4,17 ^A	*	NS	NS
CC		50,7 $\pm$ 6,96	46,1 $\pm$ 6,94	39,2 $\pm$ 10,99	45,3 $\pm$ 4,91 ^B			
Média geral	58,8 $\pm$ 11,10	61,4 $\pm$ 4,91	58,9 $\pm$ 5,25	43,3 $\pm$ 6,54				
Proteína/RNA (mg/mg)								
CBL		29,1 $\pm$ 2,20 ^y	20,4 $\pm$ 2,49	11,1 $\pm$ 2,22	20,2 $\pm$ 1,32 ^A	*	**	NS
CC		21,1 $\pm$ 2,20	14,1 $\pm$ 2,20	10,1 $\pm$ 3,48	15,1 $\pm$ 1,55 ^B			
Média geral	14,6 $\pm$ 0,99 ^x	25,1 $\pm$ 1,55 ^a	17,2 $\pm$ 1,66 ^b	10,6 $\pm$ 2,07 ^c				
RNA/DNA (mg/mg)								
CBL		2,6 $\pm$ 0,48	3,6 $\pm$ 0,54	4,4 $\pm$ 0,49	3,5 $\pm$ 0,29	NS	*	NS
CC		2,5 $\pm$ 0,48	3,3 $\pm$ 0,48	3,9 $\pm$ 0,76	3,2 $\pm$ 0,34			
Média geral	4,0 $\pm$ 0,49	2,5 $\pm$ 0,34 ^b	3,4 $\pm$ 0,36 ^{ab}	4,1 $\pm$ 0,45 ^a				

*P<0,05; **P<0,001; NS=P>0,05; ^{abc}médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre horários pelo teste de Tukey (P<0,05); ^{AB}médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre tratamento pelo teste de Tukey (P<0,05); ^{xy}médias com letras diferentes diferem pelo teste F (P<0,05); ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; GA= efeito do grupo adicional analisado por contrastes ortogonais, teste F (P<0,05); CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida.

As concentrações de proteína total, DNA, RNA e as razões entre estas variáveis no segmento íleo são apresentadas na Tabela 9. A concentração de proteína total foi influenciada pelo horário experimental ($P<0,05$), maior nível foi observado às 18 horas. Para esta variável, também foi observado efeito do grupo adicional ($P<0,05$), a 0 hora os níveis de proteína total foram menores que os níveis nos grupos CBL 18 h, CBL 36 h, CC 18 h, CC 36 h. A concentração de RNA foi influenciada pelo horário experimental ($P<0,05$), o maior nível foi observado às 96 horas. A razão proteína/RNA foi influenciada pelo horário experimental ($P<0,05$), sendo às 18 horas o maior valor de razão encontrado. Para esta variável, também foi observado efeito do grupo adicional ($P<0,05$), a razão a 0 hora foi menor que a razão às 18 horas nos grupos CBL e CC. Para a razão DNA/RNA, foi observado efeito de horário experimental ($P<0,05$), sendo a maior razão observada às 96 horas.

Tabela 9 – Concentração de proteína total, DNA, RNA (mg/g de tecido) e razão entre as variáveis no íleo dos cabritos (média ± erro padrão)

Proteína (mg/g tecido)	Horário experimental				Probabilidades ¹				
	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	T	H	T x H	GA
CBL		72,2 ± 3,91 ^y	54,4 ± 4,08 ^y	48,5 ± 4,55	58,4 ± 2,35	NS	**	NS	**
CC		59,7 ± 3,92 ^y	51,7 ± 3,91 ^y	51,9 ± 5,11	54,4 ± 2,50				
Média geral	37,6 ± 3,42 ^x	65,9 ± 2,77 ^a	53,0 ± 2,83 ^b	50,2 ± 3,49 ^b					
DNA (mg/g tecido)									
CBL		0,7 ± 0,19	0,7 ± 0,18	1,1 ± 0,22	0,8 ± 0,11	NS	NS	NS	NS
CC		0,9 ± 0,19	0,9 ± 0,19	1,1 ± 0,22	1,0 ± 0,11				
Média geral	0,7 ± 0,10	0,8 ± 0,13	0,8 ± 0,13	1,1 ± 0,16					
RNA (mg/g tecido)									
CBL		3,4 ± 0,35	4,7 ± 0,37	5,3 ± 0,47	4,5 ± 0,22	NS	**	NS	NS
CC		4,0 ± 0,35	4,3 ± 0,39	6,0 ± 0,46	4,7 ± 0,23				
Média geral	4,6 ± 0,78	3,7 ± 0,25 ^b	4,5 ± 0,27 ^b	5,6 ± 0,34 ^a					
Proteína/DNA (mg/mg)									
CBL		100,4 ± 17,12	90,6 ± 17,93	47,4 ± 22,76	79,5 ± 10,92	NS	NS	NS	NS
CC		82,3 ± 19,17	71,9 ± 19,21	45,8 ± 22,42	66,7 ± 11,70				
Média geral	55,9 ± 11,60	91,34 ± 12,85	81,3 ± 13,31	46,6 ± 16,30					
Proteína/RNA (mg/mg)									
CBL		22,3 ± 1,55 ^y	11,8 ± 1,60	9,9 ± 2,06	14,7 ± 0,99	NS	**	NS	*
CC		15,3 ± 1,55 ^y	12,3 ± 1,73	9,0 ± 2,03	12,2 ± 1,02				
Média geral	9,0 ± 2,22 ^x	18,8 ± 1,09 ^a	12,0 ± 1,19 ^b	9,4 ± 1,48 ^b					
RNA/DNA (mg/mg)									
CBL		0,05 ± 0,015	0,06 ± 0,016	0,11 ± 0,020	0,07 ± 0,010	NS	**	NS	NS
CC		0,06 ± 0,017	0,07 ± 0,017	0,14 ± 0,020	0,09 ± 0,010				
Média geral	0,09 ± 0,036	0,06 ± 0,011 ^b	0,06 ± 0,012 ^b	0,12 ± 0,014 ^a					

*P<0,05; **P<0,001; NS=P>0,05; ^{ab}médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre horários pelo teste de Tukey (P<0,05); ^{xy}médias com letras diferentes diferem pelo teste F (P<0,05); ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; GA= efeito do grupo adicional analisado por contrastes ortogonais, teste F (P<0,05); CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida.

Os valores da concentração de proteína, DNA e RNA total e as relações entre estas variáveis se constituem em importantes indicativos da atividade celular no tecido (BLÄTTER et al., 2001; BAGALDO et al., 2006, 2007). De acordo com Blätter et al., (2001), Burrin et al. (1992) e Zhang, Malo e Buddington (1997) o aumento do conteúdo protéico no epitélio intestinal nas primeiras horas de vida de bezerros pode ocorrer em função da intensa atividade de internalização de imunoglobulinas. Na mesma direção desta hipótese, maiores níveis de proteína total nos segmentos jejuno e íleo foram observados às 18 horas de vida dos cabritos, horário com elevada absorção de macromoléculas. No jejuno, maior conteúdo protéico foi observado nos animais do grupo CBL em relação ao grupo

CC, bem como maior razão proteína/DNA, variável que indica a quantidade de proteína por célula. Estes resultados sugerem que no grupo CBL o processo de internalização de imunoglobulinas foi mais intenso.

A relação proteína/RNA revela a atividade de tradução. Entretanto, os resultados observados, maior razão às 18 horas nos segmentos jejuno e íleo e maior razão no jejuno do grupo CBL, sugerem que estas diferenças também estão relacionadas com o processo de absorção de imunoglobulinas do colostro. Assim, a maior razão às 18 horas parece não indicar maior atividade de tradução, uma vez que, grande quantidade do conteúdo protéico intracelular é proveniente do colostro e não da atividade de tradução. Burrin et al. (1992) também observaram que o aumento na síntese endógena de proteína, ou seja, a atividade de tradução, teve pouca contribuição para o aumento do conteúdo protéico intestinal de leitões aleitados com colostro.

Não foram observadas diferenças no conteúdo de DNA em nenhum segmento do epitélio intestinal, indicando que a densidade celular não foi influenciada pelo tratamento e horas de vida. Este resultado sugere que as taxas de proliferação e morte celular foram equivalentes, contribuindo com a manutenção da densidade celular. Blätter et al. (2001) também não observaram diferenças no conteúdo de DNA de bezerros sob diferentes regimes de aleitamento. Entretanto, os autores verificaram diferentes taxas de proliferação sugerindo que a taxa de apoptose também se alterou resultando na manutenção da densidade celular. Uma das possibilidades de atuação do IGF-I é no aumento da taxa de divisão, bem como na sobrevivência celular, aumentando, conseqüentemente, o número de células no tecido (HOSSNER; McCUSKER; DODSON, 1997). No entanto, foi observado que a massa de IGF-I ingerida pelos animais do grupo CBL e CC não foi elevada o suficiente para determinar diferenças na densidade celular. O fornecimento de elevada massa de IGF-I, 200 µg/Kg/d, para leitões também não determinou alterações no conteúdo de DNA e RNA no 7º e 14º dia de vida dos animais (HOULE et al., 1997).

Aumento nos níveis de RNA foi verificado apenas nos segmentos jejuno e íleo às 96 horas. Schönhusen et al. (2007) observaram que a substituição da caseína do leite por proteína de soja determina diminuição na síntese de RNA no jejuno de cabritos, indicando a importância da ingestão de proteínas do leite para

o metabolismo de RNA na mucosa do intestino delgado de cabritos. Assim como sugerido por Zhang, Malo e Buddington (1997), estes resultados sugerem que a ingestão do colostro pode ter efeito estimulante na concentração de RNA intestinal.

Através da relação RNA/DNA obtém-se um indicativo da capacidade de síntese protéica. Nos três segmentos intestinais foi observada maior relação RNA/DNA às 96 horas de vida em relação às 18 horas. Este resultado sugere maior capacidade de produzir proteínas intracelulares pela segunda geração de células. Uma das características do epitélio intestinal de ruminantes nas primeiras horas de vida é a presença de enterócitos em diferentes estágios de maturação (JOCHIMS; KAUP; DORMMER, 1994). Durante este período, origina-se nas criptas intestinais, por atividade mitótica, um tipo diferenciado de célula, que determina a renovação do epitélio em dois ou três dias após o nascimento (CAMPBELL; SIEGEL; KNOWLTON, 1977; SMEATON; SIMPSON-MORGAN, 1985). Esta nova geração celular não possui as mesmas características dos enterócitos fetais como a capacidade de absorver imunoglobulinas, mas apresentam capacidade de absorver nutrientes da luz intestinal (CAMPBELL; SIEGEL; KNOWLTON, 1977; SMEATON; SIMPSON-MORGAN, 1985). Este trabalho sugere que uma das características da nova geração de células é a maior capacidade de sintetizar proteínas intracelulares, verificada pela maior razão RNA/DNA, e conseqüentemente maior maturidade celular em relação às células fetais.

As respostas dos indicadores de atividade celular intestinal nos cabritos que receberam colostro bovino liofilizado e colostro caprino sugerem que houve maior absorção de proteínas do colostro bovino. Entretanto, esta maior capacidade de absorção não refletiu em maior perda de células, uma vez que a densidade celular se manteve. Os resultados também indicam maior maturidade nas células de segunda geração, com maior capacidade de síntese protéica, em relação aos enterócitos fetais.

4.6 Atividade enzimática extracelular no tecido epitelial

Os valores para a atividade das peptidases e dissacaridases no duodeno são apresentados na Tabela 10. A atividade das enzimas aminopeptidase N e dipeptidil peptidase IV apresentaram efeito apenas de horário experimental ($P < 0,05$), maior atividade foi observada às 36 horas. Não foi observada atividade enzimática da aminopeptidase A neste segmento intestinal. A correlação observada entre a atividade das enzimas aminopeptidase N e dipeptidil peptidase IV foi de $r = 0,76$ ($P < 0,05$).

Neste segmento, a atividade das enzimas lactase e maltase também apresentaram efeito de horário experimental ($P < 0,05$). A atividade enzimática da lactase foi maior às 36 horas em relação às 18 horas, enquanto que a atividade enzimática da maltase foi maior às 96 horas em relação às 18 horas. Não foi observada correlação significativa entre a atividade das dissacaridases ($P > 0,05$).

Tabela 10 – Atividade enzimática (U/grama de tecido) no duodeno dos cabritos (média ± erro padrão)

Aminopectidase N	Horário experimental				Probabilidades ¹				
	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	T	H	T x H	GA
CBL		1,18 ± 0,277	1,66 ± 0,286	0,72 ± 0,280	1,19 ± 0,160	NS	**	NS	NS
CC		1,07 ± 0,277	2,12 ± 0,277	0,77 ± 0,362	1,32 ± 0,177				
Média geral	1,64 ± 0,363	1,13 ± 0,196 ^b	1,89 ± 0,199 ^a	0,75 ± 0,232 ^b					
Dipeptidil peptidase IV									
CBL		0,33 ± 0,103	0,64 ± 0,106	0,27 ± 0,104	0,41 ± 0,059	NS	**	NS	NS
CC		0,29 ± 0,103	0,79 ± 0,103	0,20 ± 0,134	0,43 ± 0,066				
Média geral	0,43 ± 0,069	0,31 ± 0,072 ^b	0,71 ± 0,074 ^a	0,23 ± 0,086 ^b					
Aminopectidase A²									
CBL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média geral	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactase									
CBL		4,91 ± 0,655	6,51 ± 0,677	6,76 ± 0,663	6,06 ± 0,379	NS	*	NS	NS
CC		4,29 ± 0,656	6,46 ± 0,655	4,97 ± 0,857	5,24 ± 0,420				
Média Geral	4,79 ± 0,331	4,60 ± 0,463 ^b	6,49 ± 0,470 ^a	5,86 ± 0,548 ^{ab}					
Maltase									
CBL		0,61 ± 0,044	0,68 ± 0,045	0,75 ± 0,050	0,68 ± 0,027	NS	*	NS	NS
CC		0,61 ± 0,044	0,70 ± 0,044	0,82 ± 0,058	0,71 ± 0,028				
Média Geral	0,63 ± 0,021	0,61 ± 0,031 ^b	0,69 ± 0,032 ^{ab}	0,79 ± 0,038 ^a					
Sacarase									
CBL		0,25 ± 0,056	0,15 ± 0,058	0,22 ± 0,056	0,20 ± 0,032	NS	NS	NS	NS
CC		0,18 ± 0,056	0,25 ± 0,056	0,34 ± 0,073	0,26 ± 0,036				
Média Geral	0,20 ± 0,085	0,21 ± 0,039	0,20 ± 0,040	0,28 ± 0,047					

*P<0,05; **P<0,001; NS=P>0,05; ^{ab}médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre horários pelo teste de Tukey (P<0,05); ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; GA= efeito do grupo adicional analisado por contrastes ortogonais, teste F (P<0,05); ²Não foi observada atividade enzimática desta peptidase neste segmento; CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida; U – um µmol de substrato hidrolisado por minuto a 37°C.

Os valores para a atividade das peptidases e dissacaridases no jejuno são apresentados na Tabela 11. A atividade das enzimas aminopeptidase N e dipeptidil peptidase IV apresentaram efeito significativo de horário experimental ($P < 0,05$), sendo a menor atividade observada às 96 horas. Efeito do grupo adicional também foi observado para a dipeptidil peptidase IV, o grupo 0 hora apresentou maior atividade que o tratamento CBL 96 horas ($P < 0,05$). A correlação observada entre a atividade das enzimas aminopeptidase N e dipeptidil peptidase IV foi de $r = 0,75$ ($P < 0,05$). A atividade da enzima aminopeptidase A não apresentou correlação significativa ($P > 0,05$) com as outras peptidases.

Neste segmento, as atividades das enzimas lactase e sacarase apresentaram efeito significativo de horário experimental ($P < 0,05$). A maior atividade da lactase foi observada às 96 horas, enquanto que a atividade da sacarase foi maior às 18 horas em relação às 36 horas. Não foi observada correlação significativa entre a atividade das dissacaridases ($P > 0,05$).

Tabela 11 – Atividade enzimática (U/grama de tecido) no jejuno dos cabritos (média $\pm$ erro padrão)

Aminopectidase N	Horário experimental				Probabilidades ¹				
	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	T	H	T x H	GA
CBL		3,33 $\pm$ 0,260	3,40 $\pm$ 0,267	2,59 $\pm$ 0,263	3,11 $\pm$ 0,150	NS	*	NS	NS
CC		3,50 $\pm$ 0,259	3,40 $\pm$ 0,259	2,62 $\pm$ 0,410	3,17 $\pm$ 0,183				
Média geral	3,82 $\pm$ 0,730	3,41 $\pm$ 0,183 ^a	3,40 $\pm$ 0,185 ^a	2,60 $\pm$ 0,245 ^b					
Dipeptidil peptidase IV									
CBL		2,03 $\pm$ 0,257	2,38 $\pm$ 0,264	1,12 $\pm$ 0,260 ^y	1,84 $\pm$ 0,148	NS	*	NS	*
CC		2,38 $\pm$ 0,257	2,10 $\pm$ 0,257	1,69 $\pm$ 0,406	2,05 $\pm$ 0,181				
Média geral	2,83 $\pm$ 0,437 ^x	2,20 $\pm$ 0,181 ^a	2,24 $\pm$ 0,183 ^a	1,40 $\pm$ 0,242 ^b					
Aminopectidase A									
CBL		0,27 $\pm$ 0,076	0,39 $\pm$ 0,079	0,16 $\pm$ 0,086	0,27 $\pm$ 0,046	NS	NS	NS	NS
CC		0,22 $\pm$ 0,076	0,40 $\pm$ 0,076	0,44 $\pm$ 0,182	0,35 $\pm$ 0,070				
Média geral	0,38 $\pm$ 0,024	0,25 $\pm$ 0,054	0,40 $\pm$ 0,055	0,30 $\pm$ 0,102					
Lactase									
CBL		2,76 $\pm$ 0,758	4,30 $\pm$ 0,780	7,57 $\pm$ 0,769	4,88 $\pm$ 0,437	NS	**	NS	NS
CC		3,13 $\pm$ 0,758	4,96 $\pm$ 0,757	9,32 $\pm$ 1,200	5,81 $\pm$ 0,536				
Média Geral	3,69 $\pm$ 0,231	2,95 $\pm$ 0,535 ^b	4,63 $\pm$ 0,541 ^b	8,45 $\pm$ 0,715 ^a					
Maltase									
CBL		0,75 $\pm$ 0,061	0,76 $\pm$ 0,062	0,80 $\pm$ 0,068	0,77 $\pm$ 0,036	NS	NS	NS	NS
CC		0,83 $\pm$ 0,060	0,79 $\pm$ 0,061	0,82 $\pm$ 0,096	0,81 $\pm$ 0,043				
Média Geral	0,72 $\pm$ 0,040	0,79 $\pm$ 0,043	0,77 $\pm$ 0,043	0,81 $\pm$ 0,059					
Sacarase									
CBL		0,56 $\pm$ 0,056	0,33 $\pm$ 0,057	0,31 $\pm$ 0,058	0,40 $\pm$ 0,032	NS	*	NS	NS
CC		0,40 $\pm$ 0,056	0,31 $\pm$ 0,063	0,51 $\pm$ 0,130	0,40 $\pm$ 0,051				
Média Geral	0,28 $\pm$ 0,103	0,48 $\pm$ 0,040 ^a	0,32 $\pm$ 0,042 ^b	0,41 $\pm$ 0,069 ^{ab}					

*P<0,05; **P<0,001; NS=P>0,05; ^{ab}médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre horários pelo teste de Tukey (P<0,05); ^{xy}médias com letras diferentes diferem pelo teste F (P<0,05); ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; GA= efeito do grupo adicional analisado por contrastes ortogonais, teste F (P<0,05); CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida; U – um μ mol de substrato hidrolisado por minuto a 37°C.

Os valores para a atividade das peptidases e dissacaridases no íleo são apresentados na Tabela 12. A atividade da enzima dipeptidil peptidase IV apresentou efeito significativo apenas de horário experimental ($P<0,05$), sendo a atividade enzimática às 36 horas maior que às 96 horas. A atividade da enzima aminopeptidase A apresentou efeito significativo de tratamento e horário experimental ($P<0,05$), sendo que a maior atividade desta enzima foi observada às 36 horas e a menor às 96 horas. O grupo CBL apresentou maior atividade desta enzima em relação ao grupo CC. A correlação observada entre a atividade da enzima aminopeptidase N e a dipeptidil peptidase IV foi de $r=0,46$ e de $r=0,37$ com a aminopeptidase A ($P<0,05$), enquanto que a correlação entre a dipeptidil peptidase IV com a aminopeptidase A foi de $r=0,62$ ($P<0,05$).

Neste segmento, as atividades das enzimas lactase e sacarase apresentaram efeito significativo de horário experimental ($P<0,05$). A maior atividade da lactase foi observada às 36 horas, enquanto que a atividade da sacarase foi maior às 36 horas em relação às 96 horas. Efeito do grupo adicional também foi observado para a sacarase, o grupo 0 hora apresentou menor atividade que o tratamento CBL 18 horas e CBL 36 horas ($P<0,05$). A correlação observada entre a atividade da enzima lactase foi de 0,36 com a maltase e de 0,44 com a sacarase ($P<0,05$), enquanto que a correlação entre a maltase com a sacarase não foi significativa ($P>0,05$).

Tabela 12 – Atividade enzimática (U/grama de tecido) no íleo dos cabritos (média $\pm$ erro padrão)

Aminopectidase N	Horário experimental				Probabilidades ¹				
	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas	Média geral	T	H	T x H	GA
CBL		2,30 $\pm$ 0,346	2,57 $\pm$ 0,361	2,30 $\pm$ 0,405	2,39 $\pm$ 0,208	NS	NS	NS	NS
CC		2,32 $\pm$ 0,347	2,80 $\pm$ 0,388	1,70 $\pm$ 0,454	2,27 $\pm$ 0,229				
Média geral	1,96 $\pm$ 0,186	2,31 $\pm$ 0,245	2,68 $\pm$ 0,268	2,00 $\pm$ 0,311					
Dipeptidil peptidase IV									
CBL		2,27 $\pm$ 0,384	3,16 $\pm$ 0,397	1,58 $\pm$ 0,454	2,34 $\pm$ 0,231	NS	*	NS	NS
CC		2,49 $\pm$ 0,384	3,01 $\pm$ 0,429	1,62 $\pm$ 0,606	2,37 $\pm$ 0,279				
Média geral	2,19 $\pm$ 0,702	2,38 $\pm$ 0,271 ^{ab}	3,08 $\pm$ 0,294 ^a	1,60 $\pm$ 0,378 ^b					
Aminopectidase A									
CBL		0,43 $\pm$ 0,065	0,57 $\pm$ 0,067	0,12 $\pm$ 0,086	0,38 $\pm$ 0,041 ^A	*	**	NS	NS
CC		0,19 $\pm$ 0,065	0,48 $\pm$ 0,065	0,08 $\pm$ 0,085	0,25 $\pm$ 0,041 ^B				
Média geral	0,30 $\pm$ 0,056	0,31 $\pm$ 0,046 ^b	0,53 $\pm$ 0,047 ^a	0,10 $\pm$ 0,062 ^c					
Lactase									
CBL		1,13 $\pm$ 0,199	1,76 $\pm$ 0,209	1,14 $\pm$ 0,277	1,34 $\pm$ 0,128	NS	*	NS	NS
CC		1,24 $\pm$ 0,200	1,78 $\pm$ 0,199	0,87 $\pm$ 0,260	1,29 $\pm$ 0,127				
Média Geral	1,07 $\pm$ 0,277	1,18 $\pm$ 0,141 ^b	1,77 $\pm$ 0,145 ^a	1,00 $\pm$ 0,195 ^b					
Maltase									
CBL		0,60 $\pm$ 0,060	0,65 $\pm$ 0,063	0,71 $\pm$ 0,070	0,65 $\pm$ 0,036	NS	NS	NS	NS
CC		0,63 $\pm$ 0,060	0,69 $\pm$ 0,060	0,68 $\pm$ 0,079	0,67 $\pm$ 0,038				
Média Geral	0,60 $\pm$ 0,091	0,62 $\pm$ 0,044	0,67 $\pm$ 0,044	0,69 $\pm$ 0,054					
Sacarase									
CBL		0,33 $\pm$ 0,061 ^y	0,43 $\pm$ 0,064 ^y	0,14 $\pm$ 0,082	0,30 $\pm$ 0,039	NS	*	NS	*
CC		0,28 $\pm$ 0,061	0,23 $\pm$ 0,061	0,13 $\pm$ 0,080	0,21 $\pm$ 0,039				
Média Geral	0,09 $\pm$ 0,062 ^x	0,30 $\pm$ 0,043 ^{ab}	0,33 $\pm$ 0,044 ^a	0,13 $\pm$ 0,058 ^b					

*P<0,05; **P<0,001; NS=P>0,05; ^{ab}médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre horários pelo teste de Tukey (P<0,05); ^{xy}médias com letras diferentes diferem pelo teste F (P<0,05); ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; GA= efeito do grupo adicional analisado por contrastes ortogonais, teste F (P<0,05); CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida; U – um μ mol de substrato hidrolisado por minuto a 37°C.

Nos três segmentos intestinais foi verificado aumento ou manutenção da atividade proteolítica às 36 horas e conseqüente queda às 96 horas. Este comportamento pode estar relacionado ao fato de que entre 18 e 36 horas, enterócitos presentes nas vilosidades intestinais estão progressivamente aumentando a atividade de peptidases na membrana da célula em resposta a vários estímulos, principalmente em relação às proteínas presentes nos alimentos. Bühler et al. (1998), Playford, MacDonald e Johnson (2000), Sauter et al. (2004) e Zhang, Malo e Buddington (1997) sugerem que o aumento da atividade enzimática pode ser uma resposta aos componentes nutricionais do

colostro, tais como proteínas, ou fatores não-nutricionais, como fatores de crescimento e hormônios. A queda na atividade enzimática às 96 horas, por sua vez, pode ser consequência da substituição dos enterócitos fetais por um novo tipo de célula que não possui a capacidade de absorver macromoléculas e que ainda não está totalmente madura e estimulada.

A atividade da aminopeptidase A, enzima de membrana dependente de zinco que catalisa a quebra de resíduos de glutamato e aspartato da região N-terminal da cadeia polipeptídica, foi influenciada pela alimentação com colostro bovino liofilizado. Este resultado sugere que a concentração desses aminoácidos no colostro bovino liofilizado foi superior em relação ao colostro caprino ou que componentes específicos que estimulam a atividade desta enzima estavam presentes.

A atividade das dissacaridases teve um comportamento diferente entre os segmentos e as enzimas estudadas. A lactase, enzima responsável pela degradação do principal açúcar presente no leite, a lactose, aumentou sua atividade entre 18 e 36 horas no duodeno e no íleo e entre 36 e 96 horas no jejuno, revelando o aumento da capacidade de degradação deste açúcar no epitélio intestinal dos cabritos nas primeiras horas de vida. Zhang, Malo e Buddington (1997) também observaram aumento da atividade da lactase em suínos até 24 horas de vida. O íleo foi o único segmento que apresentou diminuição na atividade da lactase entre 36 e 96 horas de vida, resultado que pode ser consequência da menor quantidade de lactose que alcança este segmento intestinal, constituindo-se em menor estímulo para a nova geração de células epiteliais.

A atividade da maltase aumentou no duodeno entre 18 e 96 horas de vida e não se alterou nos demais segmentos intestinais. A atividade das sacarase não foi detectada no duodeno e diminuiu entre 18 e 36 horas no jejuno e entre 36 e 96 horas no íleo. A menor quantidade de substratos destas enzimas, maltose e sacarose, presente nas secreções lácteas, pode ter determinado menor estímulo para a atividade dessas dissacaridases, resultado também observado por Zhang, Malo e Buddington (1997).

Efeito do grupo adicional não foi observado para a maioria das enzimas nos diferentes segmentos intestinais, revelando que até o quarto dia de vida dos

cabritos uma incompleta condição digestiva estava presente. O surgimento de uma nova geração de células não indica necessariamente que estas são células totalmente maduras. Estes enterócitos ainda precisam ser estimulados a desenvolver a capacidade digestiva. Assim, maiores cuidados devem ser tomados neste período, já que a oferta precoce de sólidos ou uma dieta rica em açúcares pode determinar uma condição de diarreia nesses animais (ZHANG; MALO; BUDDINGTON, 1997).

4.7 Atividade enzimática da fosfatase ácida no tecido intestinal

A análise histológica relacionada à atividade da fosfatase ácida nos diferentes segmentos do intestino delgado não revelou diferenças entre os animais aleitados com colostro bovino liofilizado ou caprino. O duodeno apresentou a maior atividade desta enzima intracelular, especialmente às 36 horas de vida (Figura 6). No jejuno, região de elevada absorção, a ocorrência de lisossomos com atividade enzimática aumentou durante as primeiras horas de vida. Neste mesmo segmento, dois animais, um às 18 horas e outro às 36 horas, mostraram elevada atividade enzimática em células que estavam absorvendo colostro. Porém, os lisossomos observados não se fundiam com os vacúolos preenchidos com colostro. No íleo, foi observada uma baixa atividade desta enzima, apenas dois animais foram positivos para a reação em vacúolos não preenchidos de colostro às 36 horas. A atividade da fosfatase ácida foi observada nas microvilosidades dos enterócitos em todos os segmentos intestinais e datas experimentais.

A atividade da fosfatase ácida no intestino delgado dos cabritos foi observada antes e após a ingestão do colostro, especialmente nos segmentos proximais do intestino delgado. Estes resultados revelam que a atividade de digestão intracelular está presente nas primeiras horas de vida desses animais, condição também encontrada por Blätter et al. (2001) e Bittrich, Philipona, Hammon (2004) nas primeiras 24 horas de vida de bovinos. No jejuno, a atividade proteolítica não se mostrou significativa. Apesar da presença de lisossomos ativos no intestino delgado dos cabritos nas primeiras horas de vida, a atividade da fosfatase ácida não interferiu com o processo de absorção de macromoléculas do

colostro, uma característica importante, especialmente para esses animais que adquirem imunidade passiva após o nascimento.

Figura 6 – (A) e (B) Atividade da fosfatase ácida no duodeno de cabritos às 36 horas de vida; (C) e (D) atividade da fosfatase ácida em enterócitos do segmento jejuno de cabritos às 36 horas de vida; (E) e (F) reação da fosfatase ácida em vacúolos vazios no segmento íleo de cabritos às 36 horas de vida. Seta vermelha: reação positiva para a reação da fosfatase ácida em lisossomos; seta amarela: vacúolos contendo colostro; seta branca: reação positiva para a reação da fosfatase ácida em vacúolos vazios; barra=10μm.

4.8 Análise morfológica das vilosidades do epitélio intestinal

Os valores da densidade das vilosidades (média $\pm$ erro padrão) expressas em vilosidades/cm² são apresentados na Tabela 13. Não foi observado efeito de tratamento, horário experimental e interação entre tratamento e horário experimental ($P>0,05$) em nenhum segmento intestinal.

Tabela 13 – Densidades das vilosidades (vilosidades/cm²) nos segmentos intestinais dos cabritos (média $\pm$ erro padrão)

DUODENO	Horário experimental				Média geral	Probabilidades ¹			
	0 hora	18 horas	36 horas	96 horas		T	H	T x H	GA
CBL		8.797 $\pm$ 1.798	7.354 $\pm$ 1.854	7.531 $\pm$ 1.821	7.894 $\pm$ 1.038	NS	NS	NS	NS
CC		9.256 $\pm$ 1.799	10.591 $\pm$ 2.010	6.395 $\pm$ 2.353	8.747 $\pm$ 1.188				
Média Geral	6.927 $\pm$ 700	9.027 $\pm$ 1.271	8.972 $\pm$ 1.372	6.963 $\pm$ 1.507					
JEJUNO									
CBL		6.513 $\pm$ 532	7.049 $\pm$ 550	8.271 $\pm$ 538	7.278 $\pm$ 307	NS	NS	NS	NS
CC		8.068 $\pm$ 533	7.893 $\pm$ 532	7.592 $\pm$ 696	7.851 $\pm$ 341				
Média Geral	7.003 $\pm$ 274	7.290 $\pm$ 376	7.471 $\pm$ 382	7.931 $\pm$ 445					
ÍLEO									
CBL		7.124 $\pm$ 747	6.393 $\pm$ 772	7.145 $\pm$ 756	6.887 $\pm$ 432	NS	NS	NS	NS
CC		7.382 $\pm$ 748	7.533 $\pm$ 747	7.738 $\pm$ 977	7.551 $\pm$ 478				
Média Geral	6.567 $\pm$ 627	7.253 $\pm$ 528	6.963 $\pm$ 536	7.442 $\pm$ 625					

NS= $P>0,05$; ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; GA= efeito do grupo adicional analisado por contrastes ortogonais, teste F ($P<0,05$); CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida.

De acordo com Kindlein (2006), a quantidade de IGF-I do colostro pode influenciar a densidade das vilosidades intestinais. O autor observou que, às 24 horas de vida, bezerros que ingeriram 0 a 500, 500 a 1500 e 1500 a 2000 ng/mL de IGF-I apresentaram densidade das vilosidades do jejuno distal 56, 58 e 76% maior em relação aos animais a 0 hora. No presente trabalho, a quantidade de IGF-I ingerida pelos animais que receberam colostro bovino liofilizado e colostro caprino foi muito baixa, aproximadamente 91 e 198 μ g, respectivamente, o que pode ter determinado ausência de diferenças na densidade das vilosidades nos diferentes tratamentos, horários experimentais e segmentos intestinais. Sabe-se, no entanto, que a capacidade de absorção não depende apenas da densidade

das vilosidades. A altura destas estruturas e das microvilosidades presentes nas células também tem uma influência significativa (KINDLEIN et al., 2008b).

No presente trabalho, a análise morfológica das vilosidades não revelou diferenças entre os grupos CBL e CC. Em todos os segmentos intestinais enterócitos colunares foram observados no epitélio absortivo (Figura 7).

No duodeno, as vilosidades apresentaram-se digitiformes, espessas e curtas em todos os horários experimentais (Figura 8). Dobras duodenais e freqüente presença de anastomoses entre duas, três e até quatro vilosidades foram observadas (Figura 9).

No jejuno, as vilosidades apresentaram-se digitiformes, tanto delgadas como espessas, e de diferentes alturas em todos os períodos experimentais (Figura 10). Vilosidades em forma de folha também foram verificadas. A estrutura da mucosa absortiva apresentou-se alta em comparação com os outros segmentos intestinais. Foi possível visualizar no jejuno dos cabritos amostrados às 18 horas de vida vacúolos de absorção de colostro (Figuras 11 e 12). A Figura 13 mostra células com orifícios na membrana celular e ausência de microvilosidades, indicando uma condição de morte celular. Também é possível observar uma região de extrusão, originada da perda celular.

No íleo, vilosidades digitiformes foram verificadas em todos os horários experimentais. Às 0 e 96 horas de vida, vilosidades espessas e baixas foram observadas, enquanto que às 18 e 36 horas, as vilosidades apresentaram diferentes alturas e espessuras (Figura 14). Anastomoses foram visualizadas neste segmento intestinal, porém com menor freqüência em comparação ao duodeno. Também se verificou em alguns animais a presença de sulcos, determinando aspecto rochoso às vilosidades (Figura 15). Em todos os horários experimentais, processos de extrusão celular, tanto no ápice como ao longo das vilosidades foram observados (Figura 16). A perda celular observada no ápice das vilosidades ocorreu freqüentemente com um grupo de células, enquanto ao longo das vilosidades verificou-se morte de células isoladas. Neste segmento intestinal, também foi observado em todos os animais, projeções das placas de Peyer e nódulos linfáticos entre as vilosidades (Figura 17).

Figura 7 – Enterócitos colunares no epitélio absorptivo do intestino delgado de cabritos. Barra=40μm.

Figura 8 – (A) Vilosidades digitiformes, espessas e baixas, com diferentes alturas no duodeno dos cabritos; (B) dobras no duodeno dos cabritos. Barra=100μm.

Figura 9 – Anastomoses entre vilosidades duodenais. Barra=100μm.

Figura 10 – (A), (B) e (C) Vilosidades digitiformes espessas e delgadas e com diferentes alturas observadas no jejuno dos cabritos; (D) vilosidades em forma de folha observadas no jejuno dos cabritos. Barra=100 μ m.

Figura 11 – Jejuno dos cabritos às 18 horas de vida apresentando vacúolos de absorção. Seta: vacúolos de absorção de colostro; m: microvilosidades; barra=5 μ m.

Figura 12 – Enterócitos com vacúolos de absorção de colostro às 18 horas de vida dos cabritos. Seta: vacúolos de absorção de colostro; n: núcleo; barra=10 μ m.

Figura 13 – Processo de morte celular e extrusão nas vilosidades do jejuno dos cabritos. Barra=10 μ m.

Figura 14 – (A) Vilosidades ileais baixas e espessas observadas às 0 e 96 horas de vida dos cabritos; (B) diferentes alturas e espessuras das vilosidades ileais observadas às 18 e 36 horas de vida dos cabritos. Barra=100 μ m.

Figura 15 – Sulcos nas vilosidades do íleo dos cabritos. Barra=100 μ m.

Figura 16 – Processo de extrusão celular no topo da vilosidade com um grupo de células e espaços vazios correspondentes a morte de células isoladas. Seta branca: espaços vazios; seta preta: extrusão de um grupo de células; barra=40 μ m.

Figura 17 – Projeções das placas de peyer observadas entre as vilosidades ileais dos cabritos. Barra=10µm.

No duodeno dos cabritos, a estrutura das vilosidades não se modificou nas primeiras horas de vida. Bessi et al. (2002a) e Kindlein et al. (2008b), por sua vez, observaram diferenças morfológicas entre as vilosidades do duodeno de bezerros recém-nascidos e animais de 24 horas e três dias de idade. A presença de anastomoses intestinais neste segmento está de acordo com resultados encontrados por Bessi et al. (2002a) e Kindlein et al. (2008b) em bezerros e por Skrzypek et al. (2005) em suínos. No entanto, a frequência dessas estruturas no duodeno dos cabritos foi maior do que a encontrada em bovinos e suínos, o que pode ter determinado a presença de dobras duodenais nesta espécie.

No jejuno, vilosidades altas e digitiformes foram observadas, o que está de acordo com a literatura (BESSI et al., 2002a; BESSI et al., 2002b; KINDLEIN et al., 2008b; POOLE et al., 2003). Vilosidades em forma de folha, tais como as observados neste estudo, também foram detectadas por Kindlein et al. (2008b) em bezerros com três dias de idade. A maior altura das vilosidades presentes no jejuno está relacionada com aumento da área superficial e, conseqüentemente, com maior condição de absorção neste segmento do intestino delgado. Nos ruminantes recém-nascidos, a maior área superficial possui importância significativa, uma vez que, a absorção de imunoglobulinas nas primeiras horas de vida ocorre principalmente neste segmento (BESSI et al., 2002a; BESSI et al., 2002b; POOLE et al. 2003).

Vacúolos de absorção contendo colostro foram verificados em enterócitos do jejuno de cabritos amostrados às 18 horas de vida, período de intensa atividade de internalização de macromoléculas. Estes vacúolos são formados por pinocitose e podem aparecer no sangue do recém-nascido dentro de uma a três horas após sua ingestão (CASTRO et al., 2009; LIMA et al., 2009; MORETTI et al., 2010b; PAULETTI et al., 2007). No entanto, após 36 a 48 horas de vida, as membranas dos enterócitos perdem a capacidade de absorver macromoléculas, resultando em fechamento intestinal (CAMPBELL; SIEGEL; KNOWLTON, 1977; SMEATON; SIMPSON-MORGAN, 1985; BESSI et al., 2002b). Às 36 e 96 horas de vida, em função da menor internalização de macromoléculas, vacúolos de absorção não foram observados por microscopia eletrônica de varredura.

Mudanças na morfologia do epitélio do íleo dos cabritos foram observadas às 18 e 36 horas de vida e este foi o segmento que apresentou maior frequência

de células em processo de morte. Sabe-se que as células epiteliais migram para o topo das vilosidades onde sofrem apoptose e são extrusadas para o lúmen intestinal (SIMPSON-MORGAN; SMEATON, 1985). No entanto, o presente estudo mostra que a perda de células também pode ocorrer ao longo das vilosidades, indicando que outros componentes que chegam a este segmento podem influenciar a integridade das células intestinais estimulando o processo apoptótico.

A ausência de diferenças morfológicas nas vilosidades de cabritos aleitados com colostro bovino liofilizado ou colostro caprino indica que a fonte heteróloga de anticorpos não causa prejuízos ao desenvolvimento do epitélio intestinal destes ruminantes. Assim, os resultados do presente estudo contribuem positivamente para que essa fonte de imunoglobulinas seja utilizada como um substituto para o colostro caprino.

4.9 Ultraestrutura das células do epitélio intestinal

Todos os cortes analisados revelaram a presença de enterócitos colunares, com microvilosidades bem desenvolvidas e com extensões das mesmas em direção ao citoplasma (Figura 18). As variações na ultra-estrutura celular foram relacionadas com a posição do núcleo, maior ou menor presença de mitocôndrias, ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso no citoplasma, presença de vacúolos e do complexo endocítico apical.

No duodeno, os enterócitos apresentaram grande quantidade de mitocôndrias, ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso (Figura 19). Às 0, 18 e 36 horas de vida foi possível visualizar tanto enterócitos com núcleos basais como apicais e, às 96 horas, apenas células com núcleos basais. Não foi observado complexo endocítico apical neste segmento intestinal, apenas dois animais, um a 0 hora e outro às 18 horas apresentaram pequena formação de túbulos apicais. Material elétron-denso foi observado em um animal às 36 horas e outro às 96 horas. A grande quantidade de organelas citoplasmáticas revela que este segmento pode ter maior atividade celular, como atividade digestiva, em detrimento da capacidade absorptiva.

Figura 18 – Pólo apical de enterócito duodenal de cabrito às 18 horas de vida apresentando microvilosidades e extensões das microvilosidades em direção ao citoplasma. Seta: extensões das microvilosidades; barra=1μm.

Figura 19 – Duodeno de cabrito às 18 horas de vida revelando freqüente presença de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres no citoplasma dos enterócitos. Seta branca: retículo endoplasmático rugoso; seta preta: mitocôndrias; barra=2 μ m.

No jejuno, diferenças ultraestruturais foram observadas nos diferentes horários experimentais. A presença de mitocôndrias no citoplasma dos enterócitos foi considerável, entretanto em menor frequência que no duodeno, assim como ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso, características celulares também verificada por Bessi et al. (2002a) e Bessi et al. (2002b). Ao nascimento, 0 hora, foram observados enterócitos com núcleos apicais, sendo que os mesmos tomaram a posição basal até às 96 horas de vida. Às 0, 18 e 36 horas de vida, a região apical dos enterócitos apresentou microvilosidades e uma densa rede de estruturas caniculares, o complexo endocítico apical (Figura 20, A, B, C e D). Esse complexo de túbulos, também verificado por Bessi et al. (2002b) nos primeiros dias de vida de bovinos, surge de invaginações da base das microvilosidades e são responsáveis pelo aparecimento de vacúolos citoplasmáticos que contem anticorpos internalizados nas primeiras horas de vida (SIMPSON-MORGAN; SMEATON, 1972; CAMPBELL; SIEGEL; KNOWLTON, 1977). Ao nascimento, foi possível verificar apenas grandes vacúolos sem material elétron-denso, entretanto às 18 horas de vida, após os animais terem ingerido três refeições de colostro, estes vacúolos apresentaram-se de diferentes tamanhos e preenchidos por material elétron-denso (Figura 20, E e F). Às 36 horas de vida, ainda foi possível observar a presença de enterócitos com grandes vacúolos de absorção na região basal, bem como vacúolos menores na região apical. Às 96 horas, uma estrutura rudimentar de túbulos foi observada.

No íleo, menor presença de mitocôndrias, ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso foi observada, bem como enterócitos com núcleos basais. Neste segmento, pequenas vesículas no citoplasma estavam presentes, porém as mesmas não formavam uma rede complexa de túbulos (Figura 21). Apenas um animal, às 18 horas de vida, apresentou complexo endocítico apical e vacúolos com material elétron-denso.

A análise de imunocitoquímica não revelou marcação da IgG em nenhum segmento intestinal coletado a 0 hora de vida, indicando, portanto, que os animais não ingeriram colostro materno. Nos segmentos duodeno e íleo, raros pontos elétron-densos no citoplasma apical das células foram visualizados. Apenas uma amostra do íleo que apresentava vacúolos de colostro às 18 horas revelou marcação mais acentuada. No jejuno, muitos pontos imunomarcados foram

observados nos vacúolos contendo colostro e no citoplasma apical (Figura 22). Marcação também foi observada na região basal das microvilosidades e na membrana das mesmas. Às 96 horas de vida, raros pontos marcados foram observados no citoplasma apical dos enterócitos deste segmento.

Estas observações revelam que, apesar dos segmentos duodeno e íleo não apresentarem a formação do complexo endocítico apical, internalização de pequena quantidade de IgG pode ocorrer. O jejuno foi o segmento responsável pela aquisição inicial de imunoglobulinas, sendo que no quarto dia de vida, os enterócitos não foram mais capazes de absorver macromoléculas, indicando o fechamento intestinal.

Figura 20 – Enterócitos do jejuno de cabritos. (A), (B), (C) e (D) Formação do complexo endocítico apical no enterócito do jejuno de cabrito a 0, 18 e 36 horas de vida; (E) e (F) vacúolos preenchidos por material elétron-denso no jejuno dos cabritos às 18 horas de vida, após a ingestão de colostro. Seta branca: processo de pinocitose na região da trama terminal; seta preta: grandes vacúolos de absorção contendo material elétron-denso; barra=1 μ m.

Figura 21 – Pequenas vesículas na região apical de enterócitos presentes no segmento íleo de cabrito às 18 horas de vida. Barra=1 μ m.

Figura 22 – Vacúolos de colostro imunomarcados para IgG no jejuno de cabritos às 18 horas de vida. Seta: imunomarcção da imunoglobulina G. Barra=0,5 μ m.

4.10 Expressão do receptor específico para o IGF-I no tecido intestinal

As condições ótimas de amplificação para cada um dos genes foram estabelecidas e a especificidade da reação para cada um dos iniciadores foi verificada por eletroforese em gel de agarose. Por este procedimento, foi observada a presença de uma única banda correspondente ao tamanho esperado do produto amplificado de cada um dos genes. Também foi confirmada a especificidade pela análise da curva de *melting*, realizada de 59°C a 95°C a 1°C/s. Esta análise foi realizada pelo software do equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) e permitiu verificar a qualidade da reação, a ausência de contaminantes ou a geração de produtos inespecíficos. A curva de *melting* avalia a dissociação da fita dupla de DNA com o aumento da temperatura e o produto presente na reação é considerado específico quando apenas um pico ou temperatura de *melting* (T_m) é gerado. As T_m em cada segmento intestinal são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 – Temperaturas de *melting* dos genes analisados, em cada segmento intestinal

Segmento	Gene	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
Duodeno	GAPDH	82,12
	β -actina	87,54
	Receptor do IGF-I	85,57
Jejuno	GAPDH	82,09
	β -actina	87,02
	Receptor do IGF-I	85,54
Íleo	GAPDH	81,36
	β -actina	86,64
	Receptor do IGF-I	84,21

A eficiência de amplificação dos genes GAPDH, β -actina e do IGF-IR em cada segmento intestinal foi calculada pelo programa REST-384© a partir de curvas de diluições em série de DNAc. Os genes apresentaram eficiências entre 1,83 e 1,99, Tabela 15.

Tabela 15 – Eficiências de amplificação dos genes analisados, em cada segmento intestinal

Segmento	Gene	Eficiência de amplificação
Duodeno	GAPDH	1,96
	β -actina	1,90
	Receptor do IGF-I	1,89
Jejuno	GAPDH	1,99
	β -actina	1,89
	Receptor do IGF-I	1,99
Íleo	GAPDH	1,83
	β -actina	1,99
	Receptor do IGF-I	1,92

A partir do DNAc sintetizado, reações de PCR quantitativo foram realizadas, onde se obteve os valores de Ct. A estatística descritiva do banco de dados foi realizada para verificar o nível de variação dos genes referência e alvo, Tabelas 16, 17 e 18.

Tabela 16 – Médias, desvio padrão e coeficiente de variação da expressão do gene GAPDH, descritas em unidades Ct não normalizados

Segmento	Grupos	N	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Duodeno	0 h	9	24,41	0,09	2,28
	CC 18 h	12	24,35	0,12	1,64
	CC 36 h	15	25,03	0,13	2,01
	CC 96 h	12	25,26	0,07	1,00
	CBL 18 h	14	24,74	0,15	2,28
	CBL 36 h	15	25,04	0,24	3,72
	CBL 96 h	12	25,32	0,18	2,42
Jejuno	0 h	9	24,53	0,18	2,25
	CC 18 h	9	26,78	0,19	2,07
	CC 36 h	15	25,04	0,21	3,30
	CC 96 h	9	24,74	0,42	5,07
	CBL 18 h	11	26,29	0,38	4,77
	CBL 36 h	9	25,71	0,10	1,22
	CBL 96 h	14	25,57	0,13	1,93
Íleo	0 h	6	23,61	0,11	1,16
	CC 18 h	13	23,71	0,20	3,10
	CC 36 h	10	24,18	0,53	6,90
	CC 96 h	6	23,80	0,27	2,77
	CBL 18 h	11	24,81	0,23	3,09
	CBL 36 h	15	23,29	0,16	2,63
	CBL 96 h	15	23,81	0,13	2,11

Tabela 17 – Médias, desvio padrão e coeficiente de variação da expressão do gene β -actina, descritas em unidades Ct não normalizados

Segmento	Grupos	N	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Duodeno	0 h	9	22,17	0,18	2,40
	CC 18 h	6	22,57	0,10	1,10
	CC 36 h	9	23,30	0,23	3,03
	CC 96 h	6	22,33	0,02	0,27
	CBL 18 h	6	22,94	0,42	4,49
	CBL 36 h	6	22,07	0,05	0,54
	CBL 96 h	9	23,56	0,20	2,55
Jejuno	0 h	8	22,48	0,25	3,11
	CC 18 h	9	25,01	0,28	3,38
	CC 36 h	15	22,85	0,31	5,22
	CC 96 h	9	22,97	0,21	2,72
	CBL 18 h	12	24,72	0,44	6,18
	CBL 36 h	9	23,39	0,20	2,61
	CBL 96 h	15	23,09	0,11	1,83
Íleo	0 h	6	22,08	0,16	1,79
	CC 18 h	17	22,32	0,14	2,62
	CC 36 h	12	22,17	0,31	4,89
	CC 96 h	6	22,54	0,26	2,87
	CBL 18 h	12	24,24	0,25	3,54
	CBL 36 h	14	23,62	0,78	12,38
	CBL 96 h	14	21,98	0,22	3,83

Tabela 18 – Médias, desvio padrão e coeficiente de variação da expressão do gene do receptor do IGF-I, descritas em unidades Ct não normalizados

Segmento	Grupos	N	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Duodeno	0 h	6	26,59	0,12	1,12
	CC 18 h	10	28,83	0,58	6,41
	CC 36 h	6	29,59	0,62	5,15
	CC 96 h	8	27,96	0,87	8,82
	CBL 18 h	10	29,4	0,37	3,97
	CBL 36 h	13	30,28	0,42	5,03
	CBL 96 h	8	27,79	0,53	5,38
Jejuno	0 h	8	28,48	0,69	6,85
	CC 18 h	8	29,28	1,16	11,19
	CC 36 h	15	27,8	0,55	7,63
	CC 96 h	8	26,91	0,81	8,54
	CBL 18 h	9	26,64	0,62	6,99
	CBL 36 h	7	26,58	0,77	7,63
	CBL 96 h	14	29,11	0,6	7,69
Íleo	0 h	5	26,51	0,57	4,83
	CC 18 h	13	26,26	0,53	7,31
	CC 36 h	8	25,69	0,62	6,8
	CC 96 h	5	26,18	0,23	1,86
	CBL 18 h	11	25,12	0,92	12,15
	CBL 36 h	11	27,08	0,19	2,36
	CBL 96 h	11	24,35	1,04	14,15

O programa REST-384© realiza a comparação entre uma amostra desconhecida (tratamento) *versus* um controle. No presente trabalho, comparações entre o grupo CC e o grupo CBL foram realizadas em cada horário experimental, considerando o grupo CC como controle, Tabela 19. No íleo, a expressão gênica do IGF-IR no grupo CBL 18 h foi 5,653 vezes superior em relação ao grupo CC 18 h.

Tabela 19 – Comparações entre os grupos CC e CBL em cada horário experimental pelo teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso¹

Segmento intestinal				
Grupos ²	Grupos ³	Duodeno	Jejuno	Íleo
CC 18 h	CBL 18 h	NS	NS	*
CC 36 h	CBL 36 h	NS	NS	NS
CC 96 h	CBL 96 h	NS	NS	NS

* $P < 0,05$; NS= $P > 0,05$. ¹O teste foi realizado no programa *Relative Expression Software Tool* (REST-384©) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002) que permite a comparação entre uma amostra desconhecida (tratamento) versus um controle, considerando as eficiências de amplificação do gene alvo e dos genes referência e os valores de crossing point (CP); ²grupos incluídos no programa como controle; ³grupos incluídos no programa como tratamento.

Diferenças na expressão gênica dentro de cada grupo entre os horários experimentais também foram investigadas, considerando como controle o horário experimental anterior, Tabela 20. No duodeno, a expressão gênica no grupo CBL às 96 horas foi 4,073 e 8,576 vezes superior em relação às 18 e 36 horas, respectivamente. No jejuno, em contrapartida, a expressão gênica neste grupo às 96 horas foi 11,834 e 6,598 vezes inferior em relação às 18 e 36 horas, respectivamente. No íleo, a expressão gênica no grupo CBL às 36 horas foi 7,036 vezes inferior em relação às 18 horas.

Tabela 20 – Comparações dentro de cada grupo entre os horários experimentais pelo teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso¹

Segmento intestinal				
Grupos ¹	Grupos ²	Duodeno	Jejuno	Íleo
CC 18 h	CC 36 h	NS	NS	NS
CC 18 h	CC 96 h	NS	NS	NS
CC 36 h	CC 36 h	NS	NS	NS
CBL 18 h	CBL 36 h	NS	NS	*
CBL 18 h	CBL 96 h	*	*	NS
CBL 36 h	CBL 96 h	*	**	NS

*P<0,05; **P<0,001; NS=P>0.05. ¹O teste foi realizado no programa *Relative Expression Software Tool* (REST-384©) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002) que permite a comparação entre uma amostra desconhecida (tratamento) versus um controle, considerando as eficiências de amplificação do gene alvo e dos genes referência e os valores de crossing point (CP); ²grupos incluídos no programa como controle; ³grupos incluídos no programa como tratamento.

Comparações entre o grupo adicional, 0 hora, e os outros grupos também foram realizadas, Tabela 21. No duodeno, a expressão gênica nos grupos CC 18 h, CC 36 h, CBL 18 h e CBL 36 h foi 3,721, 5,36, 4,13 e 8,696 vezes, respectivamente, inferior em relação ao grupo 0 h. No jejuno, a expressão gênica nos grupos CBL 18 h e CBL 36 h foi 13,342 e 7,439 vezes, respectivamente, superior em relação ao grupo 0 h.

Tabela 21 – Comparações entre o grupo adicional, 0 hora, e os demais tratamentos pelo teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso¹

Segmento intestinal				
Grupos ¹	Grupos ²	Duodeno	Jejuno	Íleo
0 h	CC 18 h	*	NS	NS
0 h	CC 36 h	*	NS	NS
0 h	CC 96 h	NS	NS	NS
0 h	CBL 18 h	*	*	NS
0 h	CBL 36 h	*	*	NS
0 h	CBL 96 h	NS	NS	NS

* $P < 0,05$; NS= $P > 0,05$. ¹O teste foi realizado no programa *Relative Expression Software Tool* (REST-384©) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002) que permite a comparação entre uma amostra desconhecida (tratamento) versus um controle, considerando as eficiências de amplificação do gene alvo e dos genes referência e os valores de crossing point (CP); ²grupos incluídos no programa como controle; ³grupos incluídos no programa como tratamento.

A atuação do IGF-I no desenvolvimento pós-natal do trato intestinal depende de receptores específicos presentes na membrana celular que podem variar quanto ao número conforme o tecido e a fase de desenvolvimento dos animais (BLUM; BAUMRUCKER, 2002; BÜHLER et al., 1998; KELLY; COUTTS, 2000; PLAYFORD; MACDONALD; JOHNSON, 2000). Schober et al. (1990) verificaram, pela ligação específica de ¹²⁵I-IGF-I às membranas do epitélio intestinal de leitões, uma presença duas vezes maior de receptores ao nascimento em comparação às membranas de animais com três e cinco dias de idade. No presente trabalho, a expressão gênica do IGF-IR no duodeno, primeiro segmento a receber o colostro, foi maior ao nascimento em relação às 18 e 36 horas nos grupos CC e CBL. Para os autores Bagaldo et al. (2006), Georgieva et al. (2003) e Morgan et al. (1996), a idade se constitui num fator determinante para a expressão do IGF-IR no intestino e a maior expressão deste gene no período perinatal sugere que o intestino do animal está preparado para receber o peptídeo bioativo, IGF-I, presente no colostro.

A ligação com os receptores específicos presente na membrana epitelial estimula o crescimento e maturação do tecido intestinal (BLUM; HAMMON, 2000). Entretanto, elevados níveis do ligante na luz intestinal podem diminuir a

expressão de seus receptores, bem como baixos níveis podem estimular a expressão dos mesmos (NISSLEY; RECHLER, 1984). No presente trabalho, a baixa concentração de IGF-I no colostro bovino liofilizado, 158,7 ng/mL, pode ter determinado a maior expressão do receptor deste peptídeo bioativo no jejuno do grupo CBL às 18 e 36 horas, garantindo o estímulo para o crescimento, diferenciação ou sobrevivência celular. Contribuindo com esta hipótese, verificou-se às 18 horas de vida dos cabritos maior expressão do IGF-IR no íleo dos animais do grupo CBL, em relação ao grupo CC, o qual ingeriu maior quantidade de IGF-I. De acordo com Bagaldo et al. (2006), Baumrucker, Hadsell e Blum (1994) e Hammom e Blum (2002), o número de IGF-IR no intestino delgado de bezerros com sete dias de idade é maior no íleo em relação ao jejuno e com valores intermediários no duodeno. Assim, em função da menor quantidade de IGF-IR no jejuno, sugere-se que este é o segmento mais influenciado pela diferença na concentração de IGF-I presente no colostro bovino liofilizado e no colostro caprino.

Contraditoriamente a estes resultados, Baumrucker, Radsell e Blum (1994) verificaram que a ingestão de IGF-I regula positivamente a expressão de seu receptor específico a longo prazo. Hammom e Blum (2002) observaram maior expressão de IGF-IR no íleo de bezerros que ingeriram colostro rico em IGF-I nos três primeiros dias de vida, em relação a animais que ingeriram substituto de leite. No entanto, os autores enfatizam que os IGF-IR são regulados negativamente pela maior presença do IGF-I e que, possivelmente outros componentes bioativos presentes no colostro bovino, como o fator de crescimento do fibroblasto ou o fator de crescimento derivado de plaquetas, podem modificar a expressão dos IGF-IR.

O intestino delgado também está exposto ao IGF-I circulante na corrente sanguínea e o produzido pelas próprias células intestinais, que atuam de forma endócrina, parácrina e autócrina. A importância do IGF-I produzido localmente para o crescimento intestinal é atribuída pela associação entre os níveis do RNAm do IGF-I e de seu receptor com a proliferação celular nas criptas do intestino delgado (BLÄTTER et al., 2001). Bagaldo et al. (2006) observaram maior expressão do IGF-I no segmento íleo comparado ao jejuno, indicando que no íleo, último segmento a receber o alimento, o IGF-I produzido localmente parece ter significativa contribuição na ligação com receptores específicos.

5 CONCLUSÕES

5.1 Conclusões gerais

A aquisição de proteção passiva foi a mesma para os grupos CBL e CC, mostrando que as imunoglobulinas de bovinos foram absorvidas pelos mesmos mecanismos celulares que absorvem as imunoglobulinas caprinas.

A concentração de IGF-I sérico não foi afetada pela quantidade desse peptídeo bioativo disponível no colostro, indicando que seu principal efeito é de atuar topicamente no desenvolvimento do trato gastrointestinal.

As respostas dos indicadores de atividade celular intestinal sugerem que houve maior absorção de proteínas do colostro bovino liofilizado e que maior capacidade de síntese protéica esta presente nas células de segunda geração, indicando maior maturidade celular em relação aos enterócitos fetais.

A renovação do epitélio intestinal nos primeiros quatro dias de vida dos caprinos não indica necessariamente a presença de células totalmente maduras, pois a condição digestiva neste período mostrou-se incompleta.

A morfologia das vilosidades intestinais não foi afetada pela ingestão de colostro bovino liofilizado, indicando que a fonte heteróloga de anticorpos não causou alterações no desenvolvimento do epitélio intestinal dos cabritos.

O jejuno foi o segmento responsável pela aquisição inicial de imunoglobulinas, sendo que no quarto dia de vida, os enterócitos não foram mais capazes de absorver macromoléculas, indicando o fechamento intestinal.

O diferente padrão de expressão para o receptor para o IGF-I do tipo I no epitélio intestinal indica que a regulação deste receptor depende da massa do peptídeo bioativo, IGF-I, ingerida.

5.2 Conclusão final

A fonte heteróloga de imunoglobulinas, colostro bovino liofilizado, pode ser utilizada como substituto para o colostro caprino sem prejuízos da aquisição de proteção passiva ou da histofisiologia entérica.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, T.E.; EPA, V.C.; GARRET, T.P.J.; WARD, C.W. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57, p. 1050-1093, 2000.
- AHMAD, R.; KHAN, A.; JAVED, M.T.; HUSSAIN, I. The level of immunoglobulins in relation to neonatal lamb mortality in Pak-Karakul sheep. **Veterinarski Arhiv**, Heinzelova, v.70, n.3, p.129-139, 2000.
- 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, p. 135-139, 2003.
- ARGÜELLO, A.; CASTRO, N.; ZAMORANO, M.J.; CASTROALONSO, A.; CAPOTE, J. Passive transfer of immunity in kid goat fed refrigerated and frozen goat colostrum and commercial sheep colostrum. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 54, p. 237-241, 2004.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16 th. ed. Arlington: AOAC International, 1995. 2 v.
- BABA, R.; FUJITA, M.; TEIN, C. E.; MIYOSHI, M. Endocytosis by absorptive cells in the middle segment of the suckling rat small intestine. **Anatomical Science International**, New York, v. 77, p. 117-123, 2002.
- BAINTNER, K. Demonstration of acidity intestinal vacuoles of the suckling rat and pig. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 42, p. 231-238, 1994.
- BAINTNER, K. Transmission of antibodies from mother to Young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.117, p.153-161, 2007.
- BAGALDO, A.R.; PAULETTI, P.; DELGADO, E.F., KINDLEIN, L.; OLIVEIRA, R.L.; MACHADO NETO, R. Utilização de indicadores de atividade celular no desenvolvimento pós-natal do jejuno e íleo de bezerros. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 7, p. 128-138, 2006.
- 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, p. 839-846, 2007.
- BANCHERO, G.E.; QUINTANS, G.; MARTIN, G.B.; MILTON, J.T.B.; LINDSAY, D.R. Nutrition and colostrum production in sheep. 2. Metabolic and hormonal responses to different energy sources in the final stage of pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 16, p. 645-653, 2004.

BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. **Enzyme histochemistry**: theory and practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone, 1996. 766p.

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**, Brasília, v. 32, n. 11, p. 215-220, 1997.

BAUMRUCKER, C.R.; HADSELL, D.L.; BLUM, J.W. Effects of dietary insulin-like growth factor-I on growth and insulin-like growth factor receptors in neonatal calf intestine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, p. 428-433, 1994.

BESSER, T.E.; OSBORN, D. Effect of bovine serum albumin on passive transfer of immunoglobulin G1 to newborn calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.37, p. 321-327, 1993.

BESSER, T.E.; GARMEDIA, A.E.; MCGUIRE, T.C.; GAY, C.C. Effect of colostral immunoglobulin G1 and immunoglobulin M concentration on immunoglobulin absorption in calves. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 68, p. 2033-2037, 1985.

BESSI, R.; PAULETTI, P.; DANTAS D'ARCE, R.; MACHADO NETO, R. Absorção de anticorpos do colostro de bezerros. I Estudo do intestino delgado proximal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 3, n. 6, p. 2314-2324, 2002a.

BESSI, R.; PAULETTI, P.; DANTAS D'ARCE, R.; MACHADO NETO, R. Absorção de anticorpos do colostro de bezerros. II Estudo do intestino delgado distal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2325-2331, 2002b.

BITTRICH, S.; PHILIPONA, C.; HAMMON, H.M. et al. Preterm as compared with full-term neonatal calves are characterized by morphological and functional immature of the small intestine. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 87, n. 6, p. 1786-1795, 2004.

BLÄTTER, U.; HAMMON, H.M.; MOREL, C.; PHILIPONA, C.; RAUPRICH, A.; ROMÉ, V.; HUËROU-LURON, I.L.; GUILLOTEAU, P.; BLUM, J.W. Feeding colostrums, its composition and feeding duration variably modify proliferation and morphology of the intestine and digestive enzyme activities of neonatal calves. **Nutrient Metabolism**, 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, v. 23, p. 101-110, 2002.

BOUDRY, C.; THEWIS, A. Bovine colostrum as a natural growth factor for newly-weaned piglets: a review. **Bulletine of UASVM Animal Science and Biotechnologies**, Cluj-Napoca, v. 66, p. 1-2, 2009.

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

BROWN, H.H.; MOON, H.W. Localization and activities of lysosomal enzymes in jejunal and ileal epithelial cells of the young pig. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 40, n. 11, p. 1573-1577, 1979.

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, n. 3, p. 758-765, 1998.

BURRIN, D.G.; SHULMAN, R.J.; REEDS, P.J.; DAVIS, T.A.; GRAVITT, K.R. Porcine colostrum and milk stimulate visceral organ and skeletal muscle protein synthesis. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 122, p. 1205-1213, 1992.

BUTLER, J.E. Immunoglobulins of the mammary secretions. In: LARSON, B.L.; SMITH, V.R. **Lactation: a comprehensive treatise**. London: Academic Press, 1974. v. 3, p. 217-255.

BUTLER, J.E. Bovine immunoglobulins: An augmented review. **Veterinary Immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 4, p. 43-152, 1983.

BUTLER, J.E.; ZHAO, Y.; SINKORA, M.; WERTZ, N.; KACSKOVICS, I. Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 33, p. 321-333, 2009.

CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 87-97, 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, 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**, New York, v. 88, p. 3650-3654, 2005.

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

CASTRO-ALONSO, A.; CASTRO, N.; CAPOTE, J.; CAPOTE, J.; MORALES-delaNUEZ, A.; MORENO-DIAS, I.; SÁNCHEZ-MACIAS, D.; HERRAEZ, P.; ARGÜELLO, A. Apoptosis regulates passive immune transfer in newborn kids. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 91, p. 2086-2088, 2008.

CHEN, J.C.; CHANG, C.J.; PEH, H.C.; CHEN, S.Y. Total protein and γ -globulin contents of mammary secretion during early post-partum period of Nubian goats in the Taiwan area. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 31, p. 67-73, 1998.

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.

CONSTANT, S.B.; LEBLANC, M.M.; KLAPSTEIN, E.F.; BEEBE, D.E.; LENEAU, H.M.; NUNIER, C.J. Serum immunoglobulin in goat kids fed colostrum or a colostrum substitute. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 205, p. 1759-1762, 1994.

CSAPÓ, J.; CSAPÓ-KISS, Z.; MARTIN, T.G.; SZENTPETERI, J.; WOLF PANNON, G. Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 445-458, 1994.

DAHLQUIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 7, p. 18, 1964.

DONOVAN, S.M.; CHAO, J.C.J.; ZIJLSTRA, R.T.; ODLE, J. Orally administered iodinated recombinant human insulin-like growth factor-I (I^{125} -rhIGF-I) is poorly absorbed by the newborn piglet. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 24, p. 174-182, 1997.

ELFSTRAND, L.; LINDMARK-MANSSON, H.; PAULSSON, M.; NYBERG, L.; AKESSON, B. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 12, p. 879-887, 2002.

FLAIBAN, K.K.M.C.; BALARIN, M.R.S.; RIBEIRO, E.L.A.; CASTRO, F.A.B.; MORI, R.M.; LISBÔA, 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**, Goiânia, v. 1, p. 181-185, 2009.

FERNÁNDEZ, A.; RAMOS, J.J.; LOSTE, A.; FERRER, L.M.; FIGUERAS, L.; VERDE, M.T.; MARCA, M.C. Influence of colostrum treated by heat on immunity function in goat kids. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 29, p. 353-364, 2006.

GALLO, G.F.; BLOCK, E. Effects of recombinant bovine somatotropin on nutritional status of dairy cows and of their calves. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 73, p. 3266-3275, 1990.

GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y.; MAUBOIS, J.-L. Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. **Lait**, Paris, v. 86, p. 99-125, 2006.

GEORGIEVA, T.M.; GEORGIEV, I.P.; ONTSOUKA, E.; HAMMON, H.M.; PFAFFL, M.W.; BLUM, J.W. Abundance of message for insulin-like growth factors-I and -II and for receptors for growth hormone, insulin-like growth factors-I and -II, and insulin in the intestine and liver of pre- and full-term calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 9, p. 2294-2300, 2003.

GEORGIEV, P.I. Effect of colostrum insulin-like growth factors on growth and development of neonatal calves. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 11, p. 75-88, 2008.

GILBERT, R.P.; GASKINS, C.T.; HILLER, J.K.; PARKER, C.F.; McGUIRE, T.C. Genetic and environmental factors affecting immunoglobulin G₁ concentrations in ewe colostrums and lamb serum. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, p. 855-863, 1988.

GOPAL, P.K.; GILL, H.S. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, p. 69-74, 2000.

HADJIPANAYIOTOU, M. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum of ewes and goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 255-262, 1995.

HAGIWARA, K.; KATAOKA, S.; YAMANAKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Detection of cytokines in bovine colostrum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 76, p. 183-190, 2000.

HAMMON, H.; BLUM, J.W. The somatotrophic axis in neonatal calves can be modulated by nutrition, growth hormone, and long-R3-IGF-I. **American Journal of Physiology**, Stanford, v. 273, n. 1, p. 130-138, 1997.

HAMMON, H.; BLUM, J.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.

HAMMON, H.M.; SCHIESSLER, G.; NUSSBAUM, A.; BLUM, J.W. Feed intake patterns, growth performance, and metabolic and endocrine traits in calves fed unlimited amounts of colostrum and milk by automate, starting in the neonatal period. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, n. 12, p. 3352-3362, 2002.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 48, p. 422-427, 1972.

HASHIZUME, T.; TAKAHASHI, Y.; NUMATA, M.; SASAKI, K.; UENO, K.; OHTSUKI, K.; KAWAI, M.; ISHII, A. Plasma profiles of growth hormone, prolactin and insulin-like growth factor-I during gestation, lactation and the neonatal period in goats. **The Journal of Reproduction and Development**, Nagoya, v. 45, p. 273-281, 1999.

HODGSON, J.C.; MOON, G.M.; HAY, L.A.; QUIRIE, M. Effectiveness of substitute colostrum in preventing disease in newborn lambs. **Occasional Publication, British Society of Animal Production**, California, v. 15, p. 163-165, 1992.

HOSSNER, K.L.; McCUSKER, R.H.; DODSON, M.V. Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. **Animal Science**, Cambridge, v. 64, p. 1-15, 1997.

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

HUA, Q.; MAYER, J.P.; JIA, W.; ZHANG, J.; WEISS, M. The folding nucleus of the insulin superfamily. **The Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 281, p. 28131-28142, 2006.

HURLEY, W.L.; THEIL, P.K. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients**, Basel, v. 3, p. 442-474, 2011.

HUSBAND, A.J.; BRANDON, M.R.; LASCELLES, A.K. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, Adelaide, v. 51, p. 707-710, 1973.

JOCHIMS, K.; KAUP, F.-J.; DORMMER, W. An immunoelectron microscopic investigation of colostral IgG absorption across the intestine of newborn calves. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 57, p. 75-80, 1994.

KAUP, F.-J.; DROMMER, W.; JOCHIMS, K.; PICKET, M. Ultrastructure of pre- and postcolostral enterocytes of the newborn calf. **Anatomy, Histology and Embryology**, Berlin, v. 25, p. 249-255, 1996.

KELLY, D.; COUTTS, A.G.P. Development of digestive and immunological function in neonates: role of early nutrition. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 66, p. 161-167, 2000.

KINDLEIN, L. **Efeito de IgG e IGF-I das primeiras refeições lácteas sobre a flutuação sérica e características do epitélio intestinal em bezerros recém-nascidos**. 2006. 100p. Tese (Doutorado em Ciências Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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 e Produção Animal**, Salvador, v. 8, n. 4, p. 375-385, 2007.

KINDLEIN, L.; PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; MACHADO-NETO, R. Características ultraestruturais 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, p. 122-128, 2008a.

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

KLOBASA, F.; GOEL, M.C.; WERHAHN, E. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 4, p. 923-926, 1998.

Korhonen, H. Antimicrobial factors in bovine colostrum. **Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland**, Helsinki, v. 49, p. 434-447, 1977.

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

LABARCA, C.; PAIGEN, K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 102, p. 344-352, 1980.

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.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACHADO NETO, R.; PACKER, I. U.; BONILHA, L. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZZOK, A. G.; CÂNDIDO, J. G. Concentração de IgG sérica em bezerros das raças Nelore, Guzerá, Gir e Caracu: 2. Efeitos sobre crescimento e mortalidade até a desmama. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, n. 5, p. 920-923, 1997.

MACHADO NETO, R. PACKER, I.U.; MENTEN, J.F.; LAVORENTI, A. Efeito da raça, dieta, época e ordem de parição na concentração de imunoglobulina G no colostro de suínos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 1295-1299, 2001.

MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HERMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 253-254, 1965.

MAROUX, S.; LOUVARD, M.; BARATTI, J. The aminopeptidases from hog intestinal brush border. **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v. 321, p. 282-295, 1973.

MEIJERINK, J.; MANDIGERS, C.; VAN DE LOCHT, L.; TÖNNISSEN, E.; GOODSID, F.; RAEMAEKERS, J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantification real-time PCR. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 3, p. 55-61, 2001.

MELLADO, M.; ANGEL, E.D.; REBOLLOSO, O.; GARCÍA, E. Immunoglobulin G concentration and neonatal survival of goat kids delivered in a pen or on open range. **Preventive Veterinary Medicine**, Netherlands, v. 37, p. 33-39, 1998.

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**, Netherlands, v. 40, p. 141-145, 2008.

MORETTI, D.B.; KINDLEIN, L.; PAULETTI, P.; MACHADO-NETO, R. IgG absorption by Santa Ines lambs fed Holstein bovine colostrum or Santa Ines ovine colostrum. **Animal**, Cambridge, v. 4, p. 933-937, 2010a.

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

MORGAN, C.J.; COUTTS, A.G.P.; McFADYEN, M.C.; KING, T.P.; KELLY, D. Characterization of IGF-I receptors in the porcine small intestine during postnatal development. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Lexington, v. 7, p. 339-347, 1996.

NAGATSU, T.; HINO, M.; FUYAMADA, H.; HAYAKAWA, T.; SAKAKIBARA, S.; NAKAGAWA, Y.; TAKEMOTO, T. New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 74, p. 466-476, 1976.

NEI, M.; GU, X.; SITNIKOVA, T. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Irvine, v. 94, p. 7799-7806, 1997.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger. Princípios de Bioquímica**. Tradução de A.A. Simões e W.R.N. Lodi. 4.ed. São Paulo: SARVIER, 2006, 1202 p.

NISSLEY, S.P.; RECHLER, M.M. Somatomedin/insulin-like growth factor tissue receptors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Stanford, v. 13, p. 43-67, 1984.

NORDI, W.M. **Efeito do fornecimento de colostro bovino liofilizado e caprino sobre o epitélio intestinal de caprinos recém-nascidos**. 2010.90p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

OLIVEIRA, M.M.M.; CASTRO, R.S.; CARNEIRO, K.L.; NASCIMENTO, S.A.; CALLADO, A.K.C.; ALENCAR, C.S.A.; COSTA, L.S.P. Anticorpos contra lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos e ovinos em abatedouros do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Pampulha, v. 58, n. 5, p. 947-949, 2006.

PANDEY, N.N.; DAR, A.A.; MONDAL, D.B.; NAGARAJA, L. Bovine colostrum: a veterinary nutraceutical. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, Nairobi, v. 3, p. 31-35, 2011.

PAKKANEN, R.; AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 7, p. 285-297, 1997.

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, 2002.

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.

PFÄFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST®) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Researchs**, Oxford, v. 30, n.9, e36, 2002.

PLAYFORD, R.J.; MACDONALD, C.E.; JOHNSON, W.S. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v. 72, p. 5-14, 2000.

POOLE, C.A.; WONG, E.A.; MCELROY, A.P.; VEIT, H.P.; WEBB, K.E. Ontogenesis of peptide transport and morphological changes in the ovine gastrointestinal tract. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 50, p. 163-176, 2003.

QUIGLEY, J.D.; CARSON, A.E.; POLO, J. Immunoglobulin derived from bovine plasma a replacement for colostrum in newborn lambs. **Veterinary Therapeutics**, Kansas, v. 3, p. 262-269, 2002.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S.; WITTEWER, C.; NAKAGAWARA, K. **Rapid cycle Real time PCR: methods and applications**. Heidelberg: Springer, 2001. ISBN 3-540-66736-9, p. 21–34.

REINHOLD, J.G. Total protein, albumin and globulin. In: REINER, M. **Standard methods of clinical chemistry**. New York: Academic Press, 1953, p.88.

ROOKE, J.A.; BLAND, I.M. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 78, p. 12-23, 2002.

SCAMMELL, A. W. Production and uses of colostrum. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 56, p. 74-82, 2001.

SALMON, H. The mammary gland and neonate mucosal immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 72, p. 143-155, 1999.

SANGILD, P; FOWDEN, A.L.; TRAHAIR, J.F. How does the foetal gastrointestinal tract develop in preparation for enteral nutrition after birth? **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 66, p. 141-150, 2000.

SANGILD, P.T. Uptake of colostral immunoglobulins by the compromised newborn farm animal. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 98, p. 105-122, 2003.

SAUTER, S.N.; RPLER, B.; PHILIPONA, C.; MOREL, C.; ROME, V.; GUILLOTEAU, P.; BLUM, J.W.; HAMMON, H.M. Intestinal development in neonatal calves: Effects of glucocorticoids and dependence on colostrums feeding. **Biology of the Neonate**, Basel, v. 85, n. 2, p. 94-104, 2004.

SCHMIDEK, A.; MERCADANTE, M.E.Z.; DA COSTA, M.J.R.P.; 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.

SCHÖBER, D.A.; SIMMEN, F.A.; HADSELL, D.L.; BAUMRUCKER, C.R. Perinatal expression of type I IGF receptors in porcine small intestine. **Endocrinology**, Connecticut, v. 126, p. 1125-1132, 1990.

SCHÖNHUSEN, U.; KUHLA, S.; ZITNAN, R.; WUTZKE, K.D.; HUBER, K.; MOORS, S.; VOIGT, J. Effect of a soy protein-based diet on ribonucleic acid metabolism in the small intestinal mucosa of goat kids. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 90, p. 2404-2412, 2007.

SEJRSEN, K.; PEDERSEN, L.O.; VESTERGAARD, M.; PURUP, S. Biological activity of bovine milk contribution of IGF-I and IGF binding proteins. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 70, p. 79-85, 2001.

SKRZYPEK, T.; VALVERDE PIEDRA, J.L.; SRZYPEK, H.; KAZIMIERCZAK, W.; BIERNAT, M.; ZABIELSK, R. Gradual disappearance of vacuolated enterocytes in the small intestine of neonatal piglets. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Grzegorzeczka, v. 3, p. 87-95, 2007.

SKRZYPEK, T.; VALVERDE PIEDRA, J.L.; SRZYPEK, H.; WOLINSKI, J.; KAZIMIERCZAK, W.; SZYMANCZYK, S.; PAWLOWSKA, M.; ZABIELSK, R. Light and scanning electron microscopy evaluation of the postnatal small intestinal mucosa development in pigs. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Grzegorzeczka, v. 56, p. 71-87, 2005.

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.

SPARKS, A.L.; KIRKPATRICK, J.G.; CHAMBERLAIN, C.S.; WALDNER, D.; SPICER, L.J. Insulin-like growth factor-I and its binding proteins in colostrum compared to mesuares in serum of Holstein neonates. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 86, n. 6, p. 2022-2029, 2003.

SPINOLA e CASTRO, A.M.; GUERRA-JÚNIOR, G. GH/IGF e Neoplasia: o que há de novo nesta associação. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 5, p. 833-842, 2005.

TIZARD I.R. **Imunologia Veterinária** - Uma introdução. 5.ed. São Paulo: Roca, 1998. 545 p.

TURQUINO, C.F. **Transferência da imunidade passiva e comportamento de cordeiros de corte recém-nascidos**. 2012. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

VACHER, P.Y.; BESTETTI, G.; BLUM, J.W. insulin-like growth factor I absorption in the jejunum of neonatal calves. **Biology of the Neonate**, Basel, v. 68, p. 354-367, 1995.

XING, B.; XU, Y.; CHENG, Y.; LIU, H.; DU, M. Overexpression of IGF2R and IGF1R mRNA in SCNT-produced goats survived to adulthood. **Journal of Genetics and Genomics**, Beijing, v. 34, p. 709-719, 2007.

ZADOKS, R.N.; ORSEL, K.; VERWER, C.; de WINTER, A.; van AMERONGEN, J.J.; WENSING, T. Serum gammaglobulin titer in goat kids after colostrum administration: effect of commercial colostrum replacers. **Tijdschr Diergeneeskde**, Amsterdam, v. 126, p. 646-650, 2001.

ZAROS, L.G.; BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T. Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR methodology. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 575-579, 2007.

ZHANG, H.; MALO, C.; BUDDINGTON, R.K.; Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn pigs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 127, n. 3, p. 418-426, 1997.

WERNER, H.; WEINSTEIN, D.; BENTOV, I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: Structures, receptors, and signaling pathways. **Archives of Physiology and Biochemistry**, Lisse, v. 114, p. 17-22, 2008.

WILSON, J.M.; WHITNEY, J.A.; NEUTRA, M.R. Biogenesis of the apical endosome-lysosome complex during differentiation of absorptive epithelial cells in the rat ileum. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 100, p. 133-143, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Concentração de imunoglobulina G (mg/mL) sérica dos cabritos

	Horário experimental									Probabilidades ¹			
	0 hora	7 horas	14 horas	18 horas	24 horas	36 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Média Geral	T	H	T x H ²
CBL	0,04 ^c	6,89 ^b	13,13 ^a	13,38 ^a	14,41 ^a	12,00 ^{ab}	14,63 ^a	10,01 ^{ab}	9,85 ^{ab}	9,33	**	**	*
	(0,02-0,07)	(5,19-8,74)	(10,29-16,18)	(9,96-17,12)	(11,54-20,83)	(4,33-23,21)	(10,48-23,00)	(5,03-19,93)	(5,95-17,72)	(6,65-10,38)			
CC	0,02 ^c	5,48 ^b	8,16 ^{ab}	9,27 ^a	8,77 ^{ab}	7,40 ^{ab}	7,91 ^{ab}	8,45 ^{ab}	7,59 ^{ab}	6,27			
	(0,01-0,03)	(4,69-6,35)	(6,95-9,52)	(8,04-10,82)	(6,63-11,08)	(3,56-14,20)	(4,83-10,40)	(4,96-11,61)	(4,93-10,08)	(4,26-6,46)			
Média Geral	0,03	6,16	10,5	11,23	11,42	9,56	11,01	9,21	8,68				
	(0,01-0,04)	(5,25-7,06)	(8,79-12,13)	(9,47-13,20)	(9,26-14,71)	(6,26-14,24)	(7,14-15,29)	(6,91-12,54)	(6,59-11,94)				

*P<0,05; **P<0,001; NS=P>0,05; ^{abc}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre horários pelo teste de Tukey (P<0,05); ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; ²Não foi verificada diferenças estatística pelo teste de Tukey entre os tratamentos dentro de cada horário experimental (P>0,05); CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida. Dados retransformados (x²), (x-y) intervalo de confiança de 95%.

APÊNDICE B – Eficiência aparente de absorção (%) dos cabritos (média e intervalo de confiança) às 7, 14, 18 e 24 horas de vida (EAA_{7hr}, EAA_{14hr}, EAA_{18hr} e EAA_{total}, respectivamente)

	Horário experimental				Probabilidades ¹			
	EAA _{7horas}	EAA _{14 horas}	EAA _{18 horas}	EAA _{total}	Média Geral	T	H	T x H ²
CBL	19,17 ^a	18,51 ^a	9,33 ^b	9,55 ^b	13,34	NS	**	*
	(14,72-25,34)	(14,70-26,63)	(7,05-12,47)	(8,45-15,28)	(12,38-16,76)			
CC	20,85 ^a	16,11 ^b	9,18 ^c	8,02 ^c	12,54			
	(16,25-23,60)	(16,72-19,32)	(7,35-11,75)	(6,23-10,44)	(11,36-14,99)			
Média Geral	19,99	17,27	9,26	8,76				
	(17,11-22,88)	(14,92-19,89)	(7,87-11,07)	(7,81-11,51)				

*P<0,05; **P<0,001; NS=P>0,05; ^{abc}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre horários pelo teste de Tukey (P<0,05); ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; ²Não foi verificada diferenças estatística pelo teste de Tukey entre os tratamentos dentro de cada horário experimental (P>0,05); CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida. Dados retransformados (10^x), (x-y) intervalo de confiança de 95%.

APÊNDICE C – Concentração de proteína total (g/dL) sérica dos cabritos (média ± erro padrão).

	Horário experimental									Probabilidades ¹			
	0 hora	7 horas	14 horas	18 horas	24 horas	36 horas	48 horas	72 horas	96 horas	Média Geral	T	H	T x H
CBL	4,1 ± 0,13	4,3 ± 0,13	4,8 ± 0,13	4,9 ± 0,13	4,9 ± 0,14	5,1 ± 0,18	5,0 ± 0,21	4,6 ± 0,23	4,6 ± 0,23	4,7 ± 0,11	NS	**	NS
CC	4,2 ± 0,13	4,4 ± 0,12	4,70 ± 0,12	4,8 ± 0,13	4,8 ± 0,14	4,7 ± 0,18	4,6 ± 0,19	4,8 ± 0,22	4,7 ± 0,22	4,6 ± 0,10			
Média Geral	4,1 ± 0,09 ^c	4,3 ± 0,09 ^{bc}	4,8 ± 0,09 ^a	4,8 ± 0,09 ^a	4,8 ± 0,10 ^a	4,9 ± 0,13 ^a	4,8 ± 0,14 ^{ab}	4,7 ± 0,16 ^{ab}	4,6 ± 0,16 ^{ac}				

**P<0,001; NS=P>0,05; ^{abc}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre horários pelo teste de Tukey (P<0,05); ¹T=efeito de tratamento; H=efeito de horário experimental; T x H=interação entre tratamento e horário experimental; CBL – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro bovino liofilizado às 0, 7 e 14 horas de vida; CC – cabritos que receberam 5% do peso inicial de colostro caprino às 0, 7 e 14 horas de vida.