

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**Colegiado de Pós-Graduação em Zootecnia**

**AVALIAÇÃO DA FORMA FÍSICA DO CONCENTRADO**  
**E DA INCLUSÃO DE FENO**  
**NA ALIMENTAÇÃO DE BEZERROS LEITEIROS**

**ALOMA EITERER LEÃO**

**Belo Horizonte**

**2017**

Aloma Eiterer Leão

**Avaliação da forma física do concentrado e da inclusão de feno  
na alimentação de bezerros leiteiros**

Dissertação apresentada ao Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Sandra Gesteira Coelho

Coorientadores: Mariana Campos Magalhães

Fernanda Samarini Machado

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2017

Dissertação defendida e aprovada em 20 de fevereiro de 2017 pela comissão  
examinadora constituída por:

---

Prof<sup>a</sup>. Sandra Gesteira Coelho  
Orientadora  
(Escola de Veterinária da UFMG)

---

Prof. Antônio Último de Carvalho  
(Escola de Veterinária da UFMG)

---

Dr<sup>a</sup>. Juliana Aparecida Mello Lima  
(Pós doc Embrapa Gado de Leite)

*“Não há progresso sem  
esforço, vitória sem luta ou  
aperfeiçoamento sem sacrifício.*

*Assim como não existe  
tranquilidade sem paciência.”*

**Chico Xavier**

Dedico às minhas maiores inspirações,  
meus pais, Dione e Eduardo.

## AGRADECIMENTOS

Quando nós fazemos o possível para alcançarmos nossos objetivos, Deus faz o impossível para nos levar até lá. É a Ele meu primeiro e mais sincero agradecimento.

Ao Mestre Jesus e a nossa mãe Maria Santíssima agradeço pelo presente da vida e por terem permitido que tudo isso acontecesse ao longo da minha caminhada.

Agradeço ao meu querido guia Caboclo Sete Flechas de Umbanda e toda sua linda corrente espiritual por todas as orientações, permissões e oportunidades de realização dos trabalhos. Que sua luz nunca deixe de emanar sobre nós e seus ensinamentos nunca faltem em nossa consciência.

Agradeço a esta Universidade, seu corpo docente, direção, administração e órgãos financiadores por oportunizarem a realização do que era um projeto.

Agradeço a minha orientadora, Professora Sandra Gesteira, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas correções, incentivos, compreensões e sabedorias passadas. Sou certa de que não poderia ter escolhido melhor guia profissional.

Agradeço ao querido Professor Último por ter aceitado prontamente meu convite para compor a banca e por todos os ensinamentos para que eu realizasse esse experimento.

Obrigada aos sempre presentes amigos Rafael, Pâmela, Sâmara, Camila e Ju Leão. A experiência e ajuda de vocês nunca será esquecida. Contem comigo.

Às minhas coorientadoras, Mariana, Fernanda e Ju Lima (por uma mera formalidade, não constou no papel) toda minha admiração, respeito e carinhosa gratidão. Quando crescer, quero ser igual a vocês. Aos demais pesquisadores, analistas e pós-docs da equipe Embrapa Gado de Leite- Luiz Gustavo, Thierry, Cláudio e Alexandre- agradeço o conhecimento, paciência e disponibilidade de sempre.

Aos grandes amigos que criei durante os infindáveis meses de experimento - Verônica, Luizinho, Amarildo, Geraldinho, Tiãozinho, Seu Chico, Celinho, Seu Lado, Tetesco, Seu Zé Carlos, Coutinho, Evandro e Residentes – obrigado por toda colaboração incondicional e por fazerem meus dias na fazenda tão alegres. Os terei para sempre no coração.

Agradeço as minhas parceiras de alojamento por toda amizade e diversão na Babilônia. Sentirei saudades, Bes.

Às minhas irmãs por escolha, Anália, Thaíse, Mari, Camila e Meiri: seus corações estão comigo e o meu com vocês para sempre. Amigo não precisa ser, amigo precisa estar.

Ao Ian por todo amor, compreensão e apoio.

Agradeço aos meus alicerces que sempre se preocuparam e vibraram cada vitória comigo: Vó Amor, Vó Hélio, Vó Lygia, Vó Mundo, Tia Cuca, Tia Quel e todos os demais tios e primos. Levo suas preces comigo todos os dias ao acordar.

Aos grandes amores dessa vida, Pai, Mãe e Aline: com lágrimas nos olhos e com coração transbordando de gratidão, penso que sem vocês nem uma linha estaria escrita, nem uma conquista seria alcançada. Line, obrigada pelo amor e pela oportunidade de me tornar melhor nessa vida; Papi, meu pezinho de coelho, obrigada pelos esforços, incentivos, noites em claro, aventuras na estrada, esperas na cantina, por mover mundos e montanhas sempre que precisei, por se emocionar e vibrar comigo durante toda minha vida. Obrigada por nos tornar o que há de mais importante no seu mundo. Você sempre será meu exemplo. Meizinha que tanto amo, você é minha heroína, a guerreira e mãe que sempre sonharei ser. Obrigada por todas as abdições, por nunca negar meus sonhos, por sempre permitir que eu vivesse minhas oportunidades. Nunca saberei expressar minha gratidão e nem retribuir por nunca ter deixado de acreditar em mim. Que nós nunca percamos nosso equilíbrio e sejamos sempre a família perfeita, ao nosso modo de ser. À vocês, todo o amor que existe em mim.

Caberiam ainda, outros muitos nomes que, de algum modo, deram contribuição valiosa para que eu pudesse finalizar esta dissertação. Não os nomeio, mas de qualquer forma estão aqui, dando alguma identidade a este trabalho.

Com todos vocês, divido a alegria desta experiência.

Muito Obrigada.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
1. Desenvolvimento do Trato Gastrointestinal dos bezerros.....	16
2. Forma física do concentrado.....	18
3. Suplementação volumosa.....	21
4. pH Ruminal.....	24
5. Ácidos GraxoVoláteis.....	26
6. Nitrogênio amoniacal.....	29
7. Fornecimento de água.....	30
8. Peso dos compartimentos.....	31
9. Parâmetros histológicos.....	32
<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO II –Effects of physical form of starter and forage provision in the diet of dairy calves during the preweaning period.....</b>	<b>46</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>46</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>47</b>
<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>48</b>
<b>RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>54</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>59</b>
<b>ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>60</b>



---

## LISTA DE TABELAS

---

### CAPÍTULO II

- Table 1.** Nutrient composition (DM basis, % unless otherwise noted) of whole milk, starters and hay.....67
- Table 2.** Sequence of primers used in RT-PCR reactions, the number of GenBank Accession/EMBL, and the number of base pairs of PCR products.....68
- Table 3.** Intake, performance, feed efficiency, and body measurements development of calves fed different diet solids during the preweaning period.....70
- Table 4.** Nutrient apparent digestibility of calves fed different diet solids during the preweaning period.....71
- Table 5.** pH, ruminal ammonia nitrogen (N-NH<sub>3</sub>), and organic acids in the rumen of calves fed different diet solids during the preweaning period.....72
- Table 6.** Weight (% of empty BW) of internal organs and viscera, and gastrointestinal tract development of calves of calves fed different diet solids during the preweaning period.....73
- Table 7.** Effects of the treatments about mRNA expression level of enzymes *ATPA1*, *BHD1*, *HMGCL*, *HMGCS1*, *LDHA*, transcription factors *PPARA* and *PPARD*, ruminal transporters *MTC1*, *MTC4*, *NHE1*, *NHE2* and *NHE3* and signaling pathway *AKT1* and *mTOR* in the ruminal epithelium.....74

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

**AGCC:** ácidos graxos de cadeia curta  
**AGV:** ácidos graxos voláteis  
**CEB:** consumo de energia bruta  
**CED:** consumo de energia digestível  
**CEM:** consumo de energia metabolizável  
**CEUA:** Comissão de ética no uso de animais  
**CMS:** consumo de matéria seca  
**CNF:** carboidratos não fibrosos  
**CO<sub>2</sub>:** gás carbônico  
**CZ:** cinzas  
**EB:** energia bruta  
**ED:** energia digestível  
**EE:** extrato etéreo  
**EF:** energia fecal  
**EM:** energia metabolizável  
**EPM:** erro padrão da média  
**EU:** energia urinária  
**FAR:** concentrado farelado  
**FAR+FENO:** concentrado farelado com inclusão de 5% de feno  
**FDA:** fibra em detergente ácido  
**FDN:** fibra em detergente neutro  
**g:** gramas  
**GLM:** general linear model  
**GPD:** ganho de peso diário  
**HE:** hematoxilina-eozina  
**IM:** índice mitótico  
**kg:** quilogramas  
**kcal:** quilocaloria  
**L:** litros  
**LQL:** Laboratório de Qualidade de Leite  
**MCT1:** monocarboxylate transporter 1  
**mm:** milímetro  
**mL:** mililitro  
**MO:** matéria orgânica  
**MS:** matéria seca  
**N:** nitrogênio  
**NH<sub>4</sub>:** cloreto de amônio  
**NRC:** National Research Council  
**PB:** proteína bruta  
**PDR:** proteína degradável no rúmen  
**PEL:** concentrado peletizado com milho floculado

**PV:** peso vivo

**SAS:** Statistical Analysis System

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da forma física do concentrado e da inclusão de feno na dieta de bezerros leiteiros sobre o consumo, desempenho, digestibilidade, desenvolvimento ruminal e expressão de mRNA de genes envolvidos no metabolismo ruminal. Bezerros machos mestiços Holstein × Gyr (n = 38) foram recrutados em experimento entre 1 e 9 semanas de idade e foram divididos em 3 tratamentos, que consistiram em: peletizado + milho floculado (peletizado + milho floculado, n = 13), farelado (farelado, n = 12), e farelado + 5% de feno de Tifton picado (farelado + 5% feno, n = 13). O peletizado + milho floculado tinha 96% de pellets (4 mm de diâmetro e 18 mm de comprimento) e 4% de milho floculado a vapor. O mesmo concentrado do tratamento peletizado + milho floculado foi utilizado nos tratamentos farelado e farelado + 5% feno, após ser moído por uma peneira de 3,2 mm. O feno de tifton foi adicionado a 5% da quantidade de concentrado fornecida aos bezerros do tratamento farelado + 5% feno, o qual foi cortado em 67,1% de partículas longas (> 19 mm), 13,3% de partículas médias (entre 8 e 20 mm) e 19,6% de partículas pequenas (<8 mm). Todos os bezerros foram alimentados com 4L / d de leite integral até os 63 dias de idade e foram desmamados aos 64 dias de idade. Água e concentrado foram oferecidos à vontade. Amostras de conteúdo ruminal foram obtidas de todos os animais aos 30, 45 e 60 dias de idade para avaliar o pH, nitrogênio amoniacal e ácidos graxos voláteis (AGV). Aos 55 dias de idade, um ensaio de digestibilidade aparente foi realizado com 18 animais (n = 6 por tratamento). Aos 65 dias de idade, os 18 animais foram eutanasiados para avaliar o desenvolvimento do trato digestivo. A forma física do concentrado e a inclusão dietética do feno não influenciaram o consumo, desempenho, eficiência alimentar, digestibilidade aparente dos nutrientes, partição de energia, balanço de nitrogênio, pH ruminal, concentração de nitrogênio amoniacal, AGV e desenvolvimento do trato digestório. A expressão de mRNA do transportador monocarboxilato 1 (SLC16A1) foi maior no saco dorsal do que no ventral. Uma tendência para aumentar o nível de expressão de mRNA do transportador SLC16A3 (MTC4) e SLC9A2 (NHE-2) foi observada no tratamento farelado.

**Palavras-chave:** digestibilidade, trato digestivo, expressão de mRNA, metabolismo ruminal

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of physical form of starter and inclusion of hay in diet of preweaning dairy calves on the intake, performance, digestibility, ruminal development, and the mRNA expression of genes involved in the ruminal metabolism. Holstein × Gyr crossbred male calves (n = 38) were enrolled on trial between 1 and 9 wk of age, and were assigned to 3 treatments, which consisted of: pellet + flocculated corn starter (Pellet + flocculated corn, n = 13), ground starter (Ground, n = 12), and ground starter + 5% chopped Tifton hay (Ground+ 5% Hay, n = 13). Pellet + flocculated corn starter had 96% pellets (4 mm in diameter and 18 mm in length) and 4% steam flaked corn. The same starter of the Pellet + flocculated corn treatment was used in the treatments Ground and Ground + 5% Hay, but ground to pass a 3.2 mm sieve. Tifton hay was added at 5% as fed of the amount of starter supplied to calves of the Ground + 5% Hay treatment, chopped into 67.1% of long particles (>19 mm), 13.3% of medium particles (between 8 and 20 mm) and 19.6% of small particles (<8 mm). All calves were fed 4L/d of whole milk up to 63 d of age and were weaned at 64 d of age. Water and starter were offered ad libitum. Samples of ruminal contents were obtained from all animals at 30, 45 and 60 d of age to evaluate the pH, ammonia nitrogen and volatile fatty acids (VFA). At 55 d of age, an apparent digestibility assay was performed using 18 animals (n = 6 per treatment). At 65 d of age, the 18 animals were euthanized to evaluate the development of the digestive tract. The physical form of starter and the dietary inclusion of hay did not influence intake, performance, feed efficiency, apparent nutrient digestibility, energy partitioning, nitrogen balance, ruminal pH, ammonia nitrogen concentration, VFA and the development of the digestive tract. The mRNA expression of monocarboxylate transporter 1 (SLC16A1) was higher in the dorsal sac than ventral sac. A tendency to increase the level of mRNA expression of SLC16A3 (MTC4) transporter and SLC9A2 (NHE-2) were observed on ground treatment.

**Key words:** digestibility, digestive tract, mRNA expression, ruminal metabolism

## INTRODUÇÃO

A criação de bezerras de reposição é essencial para garantir o equilíbrio dentro do sistema de produção leiteiro, uma vez que essa categoria irá compor o rebanho futuro de produção de leite, embora seja um dos períodos de maior custo na criação.

A alta taxa de mortalidade é fator que eleva os custos de criação de bezerros. Segundo Davis e Drackley (1998), bezerros mal manejados não significam apenas perdas por morte, mas também menores taxas de ganho de peso, maior incidência de doenças, necessidade de aquisição de novos animais para compor o rebanho, aumento da idade ao primeiro parto, perdas de produção de leite futuras e até mesmo prejuízos em ganhos genéticos futuros. As causas de morte em bezerros são multifatoriais e podem ser influenciadas pelo tamanho do rebanho, manejo de colostro e do aleitamento, pela idade de acesso ao concentrado e pelo desaleitamento (Neto et al., 2004).

Dessa maneira, a nutrição adequada dos bezerros nessa fase inicial marcada por alto desafio fisiológico, na qual ocorre o desenvolvimento do rúmen, é de extrema importância. O desenvolvimento do rúmen está associado ao consumo de alimentos sólidos, capazes de provocar estímulos químicos e físicos durante seu processo de degradação. Ao serem fermentados pelas bactérias ruminais, os carboidratos não estruturais da dieta sólida geram ácidos graxos voláteis, que representam o estímulo químico para o desenvolvimento epitelial do rúmen. Destes, os mais importantes são os ácidos butírico e propiônico. O estímulo físico mecânico dos alimentos sobre as paredes do rúmen promove a movimentação com desenvolvimento da musculatura e do volume deste.

Foi demonstrado que além da composição química do concentrado, o tamanho de suas partículas tem influência sobre a taxa e extensão do desenvolvimento do rúmen. Partículas maiores (moagem grosseira), por ação mecânica sobre a mucosa, favorecem o a movimentação e a função das papilas ruminais (Davis e Drackley, 1998; Coverdale et al., 2004), embora possa trazer prejuízos ao animais caso os nutrientes não estejam devidamente disponíveis para a produção de ácidos graxos voláteis e proteína microbiana. Já o concentrado moído finamente apresenta a vantagem de aumentar a utilização do amido através de sua maior disponibilidade ao ataque microbiano. Porém, pode levar à queratinização das papilas (paraqueratose), o que diminui a absorção de ácidos graxos voláteis (Greenwood et al., 1997). Desta forma, o concentrado com milho flocculado teoricamente seria a alternativa mais interessante, tanto por disponibilizar adequadamente o amido, quanto por ser favorável à

movimentação do rúmen. No entanto, em alguns estudos, autores relataram não encontrar correlação entre a granulometria do concentrado e o desempenho dos bezerros (Beharka et al., 1998; Franklin et al., 2003; Bittar et al., 2009).

No Brasil, os concentrados mais utilizados são o farelado e o peletizado. Este segundo consiste em processamento no qual o grão ou a mistura é previamente moído à formação do *pellet*. Porém, ao chegar no rúmen, ele adquire a granulometria do concentrado farelado, em função de sua fragilidade à mastigação. Desta forma, o oferecimento desses alimentos de rápida fermentação, na ausência de forragens, pode levar a quadro de acidose, em função do acúmulo de ácidos graxos voláteis, com conseqüente queda do pH ruminal.

Paralelo a isso, o consumo de alimentos volumosos no período anterior ao desaleitamento vinha sendo desestimulado. Drackley (2008) justifica que a digestibilidade da celulose de forrageiras é limitada para bezerros lactentes e ainda aponta que esses alimentos provocam enchimento do rúmen. Quigley (1997) afirma que o oferecimento de feno prejudica a ingestão de concentrado por bezerros em fase de aleitamento. Além disso, sabe-se que a forragem é menos densa em proteína e energia que os concentrados.

Portanto, embora seja importante acelerar o consumo da dieta sólida, com o objetivo de abreviar o período de aleitamento e reduzir os custos de produção da fase de cria, é necessário que o rúmen do bezerro esteja suficientemente desenvolvido e capaz de absorver os produtos da fermentação. Além disso, é fundamental que se assegure a integridade epitelial contra os quadros de acidoses clínica e subclínica.

Objetiva-se avaliar os efeitos do uso de concentrados em diferentes formas físicas e a inclusão de forragem ou não na dieta.

## CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Desenvolvimento do trato gastrointestinal dos bezerros

Os bovinos são ruminantes, os quais se diferenciam dos demais mamíferos por possuírem quatro estômagos (rúmen, retículo, omaso e abomaso), que têm origem embrionária comum em um estômago simples. O rúmen, retículo e omaso são aglandulares e rudimentares ao nascimento (Sander, 1959). Já o abomaso possui mucosa secretória glandular (Hoffmann, 1993) que se assemelha ao estômago dos monogástricos.

Ao nascimento, o retículo-rúmen, omaso e abomaso possuem proporções de, respectivamente, 38, 13 e 49% do volume total, evoluindo para a proporção de 67, 18 e 15% quando se tornam ruminantes (Church, 1988; Davis e Drackley, 1998). Na primeira fase de vida, ou seja, até três semanas de idade, o bezerro é um pré-ruminante: possui a goteira esofágica, que conduz a dieta líquida diretamente para o omaso e abomaso e possui rúmen que ainda não apresenta microbiota fermentadora capaz de degradar carboidratos não fibrosos. Desta forma, o leite se torna a principal fonte de energia, fornecendo nutrientes que serão digeridos com eficiência pelo abomaso e pelo intestino delgado.

À medida que ocorre a ingestão de alimentos sólidos, o animal inicia sua transição, desencadeada pela progressão no desenvolvimento do retículo-rúmen. Nesta segunda fase, ocorre alteração na disponibilidade das fontes de energia às quais o bezerro terá acesso, o que inclui redução da oxidação de glicose das fontes lácteas e aumento da oxidação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) ou ácidos graxos voláteis (AGV) (Heitmann et al., 1987). Ao partir de oito semanas de idade (Lyford, 1993) ou ao desaleitamento, o bezerro inicia sua fase de ruminante, na qual ele dependerá da população microbiana para suprir seus requisitos de energia e aminoácidos (Drackley, 2008).

Estudos iniciais sobre a digestão dos ruminantes já demonstravam evidências de que a dieta exerce mais influência sobre a dinâmica do desenvolvimento ruminal do que a idade dos animais, conforme demonstrado em bezerros búfalos (Singh et al., 1982). No entanto, Brownlee (1956), Warner et al. (1956), Tamate et al. (1962) e Huber (1969) relataram que as dietas líquidas não são capazes de estimular o desenvolvimento ruminal, além de atrasar as atividades de mastigação e ruminação (Cozzi et al., 2002). Já as dietas com grãos são um dos principais fatores para esse processo de transição (Kesler, 1951; Warner, 1956).



A natureza física do alimento parece não ser determinante para o desenvolvimento dos pré-estômagos dos ruminantes (Flatt et al., 1958; Sander et al., 1959; Harrison et al., 1960). Flatt et al. (1958) demonstraram que não basta ter natureza sólida para estimular o tecido ruminal. Segundo os autores, ao compararem bezerros que receberam sais de AGCC intraruminais (ácido butírico, propiônico e acético) com bezerros que receberam materiais inertes, apenas nos animais que receberam sais de AGCC é que foi observado incremento no desenvolvimento das papilas, embora houvesse aumento do peso dos estômagos em ambos, demonstrando que a musculatura e o volume do rúmen se desenvolvem independentemente do epitélio ruminal. Sendo assim, a composição química da dieta e os produtos finais da fermentação é que irão aumentar o desenvolvimento estrutural do rúmen, caracterizado pelo crescimento das papilas ruminais.

As papilas ruminais são extremamente importantes para o metabolismo dos ruminantes, porque facilitam o mecanismo de movimentação da digesta (D'arce e Flechtamann, 1980) e otimizam o processo de absorção, já que reduzem a distância entre a superfície da mucosa e o sítio de absorção e aumentam a área de absorção por aumentar a superfície do epitélio (Wardrop, 1961; Banks, 1991; Dukes, 1993). O comprimento médio das papilas ruminais de um bezerro recém-nascido é inferior a 1 mm, porém, após a ingestão de alimentos sólidos, elas crescem rapidamente e chegam a atingir altura máxima de 5 a 7 mm até a oitava semana de idade (Warner et al., 1959; Tamate et al., 1962). Stobo et al. (1966) testaram diferentes inclusões de concentrado inicial e verificaram que bezerros que receberam maiores proporções de concentrado apresentaram rúmen composto por densa camada de papilas bem desenvolvidas. Os autores ainda relacionaram maior altura de papilas com melhor desempenho dos animais. Klein et al. (1987) mostraram que sem o consumo de alimento sólido, a idade tem pouco efeito no desenvolvimento papilar.

Uma vez que o desenvolvimento normal das papilas ruminais é resultante da estimulação física de alimentos sólidos e dos produtos da fermentação microbiana, pesquisas foram conduzidas com o objetivo de identificar os AGV que exercem maior influência nesse processo. Dentre os principais, o ácido butírico é o mais importante, seguido pelo propiônico e pelo acético (Sander et al., 1959; Tamate et al., 1962). Com relação à velocidade de absorção dos AGV pelo epitélio, o butirato é o primeiro a ser absorvido, seguido pelo propionato e pelo acetato (Gray, 1947).

O mecanismo adaptativo da mucosa ruminal está associado à quantidade de ácidos graxos, butírico e propiônico, produzidos durante a fermentação bacteriana, e a necessidade

de maior aporte de sangue para o processo absorptivo induz, através de agentes tróficos e hormônios, maior atividade mitótica nas papilas (Berchielli et al., 2011). Segundo Sander et al. (1959), o crescimento papilar está relacionado com o grau de atividade fisiológica e bioquímica dos AGV. Logo, os AGV mais estimuladores demonstram metabolismo mais intenso na parede do rúmen. Davis e Drackley (1998) relataram que o butirato e propionato estimulam o crescimento do epitélio ruminal por serem metabolizados durante sua absorção. Por outro lado, quando a alimentação do ruminante é a base de fibras, e a fermentação induz produção de grandes quantidades de ácido acético, ocorre redução no tamanho das papilas (Berchielli et al., 2011). Costa et al. (2008) ao infundirem AGV no rúmen de bezerros fistulados e mantidos apenas em dieta líquida, sem acesso ao concentrado, verificaram que todos os AGV foram capazes de estimular o desenvolvimento ruminal. Porém, o butirato foi o maior responsável pelo estímulo inicial da camada papilar e o propionato atuou no crescimento das papilas metabolicamente ativas.

Desta forma, pode-se concluir que o desenvolvimento do rúmen está fortemente associado à ingestão de alimentos sólidos, permitindo o início da fermentação e a consequente produção de AGV. Além de responsáveis pelo crescimento e alongamento das papilas ruminais, os AGV passam a ser a principal fonte de energia para o animal.

## **2. Forma física do concentrado**

Concentrados comerciais podem se apresentar sob as formas peletizada, farelada ou texturizada. O concentrado texturizado pode ser definido como uma mistura de grãos inteiros, grãos grosseiramente moídos e alguns *pellets* (Khan et al., 2016), porém há pouca informação disponível sobre quais atributos dessa forma física gera benefícios para o animal. Os alimentos concentrados tem o objetivo de suprir o animal em energia, proteína, minerais e vitaminas. Para isso, é fundamental que tenha boa palatabilidade para garantir o consumo voluntário do animal (Montoro e Bach, 2012).

Para que a taxa de crescimento dos animais não seja afetada após o desaleitamento, o rúmen deve estar desenvolvido e deve ser capaz de absorver e metabolizar os produtos finais da fermentação (Bittar et al., 2009). Como a dieta sólida é o estímulo principal para o desenvolvimento ruminal, a granulometria correta do concentrado pode ser um fator diretamente ligado à digestibilidade dos nutrientes presentes no mesmo.

O processamento dos ingredientes pode afetar o consumo de dieta sólida por bezerros (Bateman et al., 2009). Segundo Huntington (1997), as modificações mecânicas e físicas atribuídas ao processamento aumentam a superfície de absorção para o processo de fermentação, melhorando a digestibilidade do amido presente nos grãos.

De acordo com Coverdale et al. (2004), o ambiente ruminal, a produção de AGV e a funcionalidade das papilas também pode ser afetada pelo tamanho da partícula do concentrado. Concentrado de granulometria mais grosseira permite aumento na capacidade e musculatura do rúmen (Greenwood et al., 1997; Davis e Drackley, 1998) e atuam removendo as camadas de queratina presentes no epitélio ruminal, as quais são capazes de dificultar a absorção dos AGV produzidos (Quigley, 1997). Já segundo Beharka et al. (1998), a forma física da dieta afeta o tamanho, formato das papilas e estabelecimento de população microbiana, mas não influencia a espessura muscular do rúmen.

Segundo Browlee (1956), a ingestão de alimento sólido é uma necessidade do bezerro em aleitamento, o que pode explicar seu comportamento de ingerir o material da própria cama quando este recebe apenas leite. Em contrapartida, uma dieta composta exclusivamente por concentrado resultou em lesões no epitélio ruminal. A utilização de concentrados de alta granulometria estimula a movimentação ruminal, sendo uma alternativa para evitar a ocorrência de lesões, sem perda em desempenho para os bezerros (Davis e Drackley, 1998).

Resultados obtidos por Porter et al. (2007) e Hill et al. (2008) sugerem que pelo menos 75% das partículas que compõem o concentrado inicial sejam maiores que 1,19 mm. As rações finamente moídas reduzem o pH ruminal, principalmente por reduzirem a ruminação e o fluxo de saliva, de acordo com Santini et al. (1983), citado por Bittar et al. (2009), reduzindo a população de bactérias celulolíticas (Beharka et al., 1998). Estudos conduzidos por Kertz et al. (1979) e Bateman et al. (2009) apontaram para queda de consumo para bezerros alimentados por concentrado com partículas finamente moídas.

Dado e Allen (1995) citam que a forma física da dieta influencia o tempo despendido nos processos de mastigação e ruminação e que a moagem do concentrado em maior granulometria leva a menor digestibilidade, porém provoca maior estímulo de mastigação e pode permanecer mais tempo no ambiente ruminal. Já o grão em granulometria fina apresenta menor tempo de mastigação e mais rápida passagem pelo rúmen.

Warner (1991) relatou maior ganho de peso e eficiência alimentar em bezerros alimentados com concentrado moído grosseiramente em comparação àqueles que receberam concentrado farelado. Comparando concentrados texturizados e farelados, Porter et al. (2007)

obtiveram melhor ganho de peso, consumo e ruminação precoce com os bezerros que receberam concentrado de moagem grosseira em comparação com concentrado peletizado. Ao avaliar os efeitos da forma física do concentrado sobre a ingestão voluntária e o crescimento de bezerros leiteiros, Bach et al. (2007) relataram que o consumo do concentrado peletizado foi menor que o de concentrado multiparticularizado, embora o ganho de peso final tenha sido semelhante, possivelmente em função da melhor eficiência alimentar dos bezerros que receberam concentrado peletizado. Já Bateman et al. (2008) relataram que o consumo de concentrado farelado foi inferior ao consumo dos bezerros que receberam concentrado peletizado. Jarrah et al. (2013) também não encontraram diferença no desempenho de bezerros alimentados com cevada em diferentes tipos de processamento.

Porém, outras pesquisas com bezerros em aleitamento que tinham como objetivo avaliar os efeitos das diferentes formas físicas do concentrado não encontraram diferenças nos parâmetros de consumo e ganho de peso (Franklin et al., 2003; Veloso et al., 2006 e Ziegler et al., 2006.)

Chaves et al. (2014) avaliaram os efeitos do processamento do concentrado inicial para bezerros recém-nascidos a partir do fornecimento do concentrado extrusado (Ruter®), sob recomendação do fabricante, em comparação com o grupo controle, que recebeu concentrado moído. Os autores concluíram que o sistema de alimentação Ruter tem potencial para promover maior ganho de peso e desenvolvimento ruminal, embora não possibilite desaleitamento precoce, conforme preconizado pelo fabricante.

Terré et al. (2015), em dois ensaios experimentais, avaliaram o desempenho de bezerros em aleitamento. No primeiro, os animais recebiam igualmente quatro litros de leite integral pasteurizado, duas vezes ao dia, dos sete aos 35 dias de idade; dois litros de leite, duas vezes ao dia, dos 36 aos 42 dias de idade e dois litros de leite, uma vez ao dia, dos 43 aos 49 dias de idade. Os tratamentos consistiam em concentrado peletizado mais palha cortada; concentrado texturizado mais palha cortada e concentrado texturizado sem palha cortada. Os concentrados possuíam os mesmos nutrientes e composição nutricional, variando apenas na forma física, sendo a palha cortada de azevém oferecida a vontade e separada do concentrado. Segundo os autores não foi observada diferença entre os tratamentos no que se refere ao crescimento dos animais, e aqueles que receberam palha apresentaram melhores pH ruminal (pH de 5,9 e 5,8 nos grupos que receberam palha, em comparação a pH de 5,4 no grupo não suplementado). Já no segundo experimento, os bezerros receberam substituto do leite (23%PB e 19,5% G) em volume e frequência diferentes, de acordo com a idade: quatro litros, duas vezes ao dia, até o

14<sup>o</sup> dia de idade; seis litros, duas vezes ao dia, do 14<sup>o</sup> ao 37<sup>o</sup> dia de idade, três litros divididos em duas porções diárias, do 38<sup>o</sup> ao 45<sup>o</sup> dia de idade e do 46<sup>o</sup> ao 52<sup>o</sup> dia de idade foi oferecido um litro e meio de leite, apenas uma vez ao dia. Os tratamentos avaliados foram: concentrado peletizado sem palha; o mesmo concentrado peletizado mais palha cortada em livre consumo e concentrado texturizado sem palha. Neste caso, o concentrado inicial peletizado suplementado com palha cortada determinou maior ingestão de sólidos (em porcentagem do peso corporal, os tratamentos peletizado com palha e texturizado com palha apresentaram valores de 1,99kg e 1,95kg versus 1,87kg no tratamento texturizado sem palha), quando comparado aos tratamentos nos quais os concentrados peletizado ou texturizado foram ofertados sem a palha.

Suarez-Mena et al. (2015), com o objetivo de determinar os efeitos da forma física da aveia (inteira ou moída) no concentrado inicial sobre a fermentação ruminal e desenvolvimento do sistema digestivo, conduziram três estudos utilizando bezerros machos, os quais foram abatidos três semanas (estudo 1) e quatro semanas (estudos 2 e 3) após o início do oferecimento de grãos. A partir de amostras de conteúdo ruminal coletadas semanalmente, concluíram que a forma de processamento da aveia não influenciou o pH ruminal e teve pouco efeito sobre as concentrações de amônia e AGV. Segundo os autores, a pesagem dos órgãos digestivos e a mensuração de papilas e espessura da parede ruminal não apoiaram a hipótese de que alimentos inteiros, comparados com moídos, iriam promover maior desenvolvimento ruminal.

Dessa forma, verifica-se que além da composição nutricional, a forma física do concentrado afeta vários aspectos do desenvolvimento de bezerro, deixando evidente a necessidade de mais estudos com essa abordagem.

### **3. Suplementação volumosa**

Até as últimas duas décadas, o fornecimento de volumoso não era recomendado para bezerros lactentes. Quigley (1997) recomenda que o feno seja oferecido a partir da sexta semana de idade, uma vez que o consumo anterior a isso limita a ingestão voluntária de concentrado inicial. Pelo mesmo motivo, Phillips (2004) não recomenda o fornecimento de forragem para bezerros alojados individualmente. Diversos outros estudos (Hibbs et al., 1956; Leibholz, 1975, Hill et al., 2008a,b) concordam que o fornecimento de forragem reduz o consumo de concentrado. Os autores sugerem que as baixas taxas de fermentação da matéria

forageira levam ao enchimento do rúmen, o que provoca menor ingestão do alimento concentrado de alta densidade energética. Da mesma forma, Drackley (2008) sugere que o acúmulo de material forrageiro de difícil digestão no rúmen pode deprimir o consumo voluntário do concentrado.

Em contrapartida, outros estudos reportaram que a inclusão de forragem não provocou efeito ou aumentou a ingestão de concentrado (Kincaid, 1980; Phillips, 2004; Suárez et al., 2006; Castells et al., 2012).

Sahoo et al. (2005) relataram que não há atividade celulolítica completa antes da quarta semana de idade do animal. Suarez et al. (2007) concluíram que o grão é mais eficiente que a forragem para que o epitélio ruminal se desenvolva mais rapidamente, uma vez que o primeiro é mais energético por unidade.

Goncu et al. (2010) realizaram experimento com o objetivo de avaliar os efeitos do fornecimento apenas do concentrado, concentrado e alfafa e ração total. Os autores observaram maior número de bactérias no rúmen dos que se alimentaram apenas com concentrado e hipotetizaram que seria em função da maior disponibilidade de nutrientes para os microrganismos.

O alto consumo de concentrado pode levar á menor ruminação, elevada produção de AGV e alteração na relação acetato:propionato (Garret et al., 1961), o que pode desencadear quadro de lesão epitelial por alteração do processo de queratinização. Tamate et al. (1962), citados por Huber (1969), verificaram que bezerros alimentados exclusivamente com concentrado apresentaram papilas mais curtas, quando comparados com os bezerros que receberam feno, além do concentrado, concluindo que a inclusão de feno pode ser necessária para um maior crescimento das papilas. O tamanho da partícula no concentrado foi apontado por Drackley (2008) como determinante para a necessidade ou não do uso de forragem.

Coelho (1999) relatou que a inclusão de feno como componente da dieta não evitou lesões no epitélio ruminal, uma vez que o consumo deste foi baixo. Segundo o autor, as alterações histológicas encontradas no rúmen de bezerros aos 60 dias de idade indicam que os bezerros estão propensos a quadros de acidose ruminal e ruminite devido à preferência pelo consumo de concentrado em detrimento ao volumoso. Khan et al. (2007) observaram ausência de lesões no epitélio ruminal de bezerros alimentados com concentrado, feno à vontade e leite em sistema “*step-down*” a partir de 8L/dia.

A alimentação somente com concentrado, rico em carboidratos rapidamente fermentáveis, pode causar hiperqueratinização e aglutinação das papilas ruminais, o que

diminuiria a capacidade de absorção pela mucosa ruminal (Bull et al., 1965). Segundo Greenwood et al. (1997), alguma fibra dietética é necessária para se manter a abrasão e evitar o crescimento anormal das papilas. Em conformidade, o NRC (2001) também mencionou a necessidade da dieta de bezerros conter fibras digestivas. Dietas contendo partículas finas e alta proporção de grãos provocam queda no pH ruminal (Beharka et al., 1998; Laarman e Oba, 2011). O fornecimento do volumoso foi observado de forma positiva por promover a ruminação e reduzir problemas comportamentais (Phillips, 2004) e ainda manter a saúde e integridade do rúmen (Suárez et al., 2007). Coverdale et al. (2004) mostraram que a inclusão de forragem aumentou o consumo de concentrado e afetou positivamente o ambiente ruminal (pH e concentração de ácidos).

A suplementação com feno picado para bezerros alimentados com altos volumes de leite (equivalentes a 20% do peso ao nascimento), com acesso ilimitado ao concentrado e à água, promoveu melhor ingestão voluntária de sólidos, foi benéfico para o desenvolvimento físico de rúmen e retículo e não afetou o ganho de peso (Khan et al., 2011).

Montoro et al. (2013) compararam o efeito da suplementação com feno em diferentes tamanhos de partícula e observaram maior consumo e eficiência alimentar no grupo que recebeu o feno em partícula mais grosseira (3 a 4mm).

Khan et al. (2012) relataram que bezerras que consumiram feno e concentrado durante o período de aleitamento, após desaleitadas apresentaram maior consumo e parâmetros de desenvolvimento corporal superiores às bezerras que consumiram apenas concentrado.

Em experimento objetivando avaliar o efeito de diferentes forragens no desempenho, digestibilidade e comportamento ingestivo de bezerros, Castells et al. (2012) conduziram três estudos que avaliaram a inclusão de diversas forragens na dieta de bezerros. Segundo os autores, o fornecimento de feno picado ou de silagem melhorou o consumo de concentrado e desempenho sem prejudicar a digestibilidade dos nutrientes. A forragem reduziu comportamentos orais não nutritivos e estimulou a ruminação. Contudo, quando a forragem utilizada foi o a alfafa, tais benefícios não foram verificados (possivelmente porque o consumo desta foi muito maior que o de feno de aveia). Os resultados obtidos indicam que a suplementação volumosa pode promover aumento no consumo de concentrado, porém, forragens de alta palatabilidade (forragens frescas) ou de baixa digestibilidade (palha) podem aumentar o enchimento do rúmen e deprimir a ingestão de concentrado.

Castells et al. (2013) submeteram bezerros a três tratamentos dietéticos (grupo controle recebendo somente concentrado, grupo recebendo concentrado mais feno de alfafa e grupo

recebendo concentrado mais feno de aveia) para verificar os efeitos de diferentes fontes de forragem sobre a fermentação ruminal e desenvolvimento do trato gastrointestinal. Foi verificado que a inclusão da forragem picada na dieta de bezerros pré-desmame levou à melhor ambiente ruminal, em função de se obter pH mais adequado (6,36 e 6,00 para os tratamentos com feno de alfafa e aveia, respectivamente, em comparação a 5,50 no grupo alimentado somente com concentrado) e de aumentar a expressão do MCT1 (transportador envolvido na passagem de lactato, acetato e prótons do epitélio ruminal para a corrente sanguínea). Foi observado ainda que o feno de aveia oferecido na proporção de 4% do consumo total de ração sólida proporcionou melhores resultados, sem que houvesse aumento de preenchimento intestinal.

Jahani-Moghadam et al. (2015) buscaram avaliar os efeitos da forragem e sua forma física sobre o crescimento dos bezerros alimentados com altos volumes de leite através do oferecimento de feno de alfafa peletizado ou cortado. Concluíram que tal suplementação volumosa teve pouco efeito sobre o consumo e desempenho dos animais e que o feno peletizado não apresentou benefícios sobre o cortado. Hill et al. (2016) concluíram que dieta com fontes de alta fibra e baixo amido foram pobremente digeridas em bezerros de oito a 16 semanas de idade, quando comparada com dieta de alto amido, o que explicou o baixo ganho de peso diário no primeiro tratamento.

Em revisão realizada por Suarez-Mena (2016), para avaliar os efeitos do fornecimento de forragem sobre o consumo de concentrado por bezerros lactentes, o autor relatou que a inclusão ou não será dependente da composição nutricional e da forma física, tanto do concentrado, quanto da forragem.

#### **4. pH ruminal**

Os mecanismos fisiológicos dos pré-estômagos dos ruminantes possibilitam a manutenção de condições que determinam padrões de fermentação pelos microrganismos. Essas condições incluem uma faixa de pH ideal, compreendido entre 5,5 e 7,2, para animais adultos (Berchielli et al., 2011)

Davis e Drackley (1998) relatam que é um desafio manter essa faixa de pH durante todo o ciclo alimentar. Uma das maneiras que os ruminantes utilizam para manter o pH do rúmen em valores adequados é através da saliva, sendo que 50% desta é produzida pelas



glândulas parótidas. Essa produção é estimulada, entre outros fatores, pela mastigação da ingesta e pelo tipo de alimento (Berchielli et al., 2011).

O pH pode ser influenciado por diversos fatores, como a dieta. Dietas baixas em fibra, com altas taxas de digestão, tendem a ter maior produção de AGV. A queda no pH requer maior grau de tamponamento pelo sistema ruminal (Slyter, 1976). A retenção seletiva de fibras é uma função ruminal normal que tende a ser inibida em animais alimentados com grãos ou dietas com grande proporção de concentrado, o que permite rápida passagem da porção insolúvel (Van Soest, 1994). Orskov (1986) cita que o concentrado moído pode causar quedas significativas no pH em função da queda na secreção de saliva e da motilidade ruminal pouco estimulada.

A estabilidade do pH dos animais submetidos à tais dietas se deve não só ao poder tamponante da saliva, mas também à capacidade da mucosa em absorver os AGV gerados pela fermentação ruminal (Van Soest, 1994). Em paralelo, a taxa de absorção dos AGV é influenciada pelo valor de pH.

A composição da dieta geralmente determina a distribuição da população microbiana que utiliza os nutrientes dos alimentos. Assim, dietas com altos teores de proteína, favorecem microrganismos proteolíticos (Van Soest, 1994). Contudo, se essas bactérias se encontram em ambiente ruminal de baixo pH, elas tendem a ter sua capacidade de desaminar os aminoácidos reduzida, acarretando em redução da produção de nitrogênio amoniacal (Lana et al., 1998).

O pH é fundamental para a fermentação, desenvolvimento e saúde do rúmen e é influenciado pelas taxas de produção e absorção de AGV, que por sua vez, são afetadas pela taxa de passagem da digesta (Williams et al., 1987). O pH do rúmen dos bezerros tende a ser mais alcalino nas primeiras semanas de vida, já que é quase inexistente a formação de ácidos a partir da fermentação ruminal (Anderson et al., 1978).

Foi relatado que baixo pH deprime a motilidade ruminal (Krause e Oetzel, 2005) e aumenta a queratinização das papilas (Bull et al., 1965), resultando em menor capacidade absorptiva de AGV. Muitos fatores dietéticos podem ser responsáveis por esse quadro de acidose, incluindo o processamento do concentrado e a presença ou não de forragem na dieta. Wood et al. (2015) relacionaram o alto consumo de carboidratos rapidamente fermentáveis durante o desaleitamento com a ocorrência de acidose, capaz de provocar danos na integridade epitelial do rúmen.

A inclusão de forragem como fonte de fibra na dieta de bezerros resultou em melhor ambiente ruminal dos bezerros em período de aleitamento e desaleitamento (Castells et al., 2012).

Castells et al. (2013) e Terré et al. (2013) reportaram correlação negativa entre a concentração de AGV e o pH ruminal em bezerros em desenvolvimento. No entanto, surpreendentemente, correlação negativa mais forte foi observada em bezerros que recebiam suplementação forrageira que nos bezerros que eram alimentados apenas com alimento concentrado (Terré et al., 2013).

Greenwood et al. (1997) não observaram efeito da forma física do concentrado sobre os parâmetros ruminais de animais jovens. Da mesma forma, Beharka et al. (1998) também não reportaram diferenças, embora tenham observado menor pH na quarta e sexta semanas de vida dos bezerros que consumiram dieta farelada. Neste trabalho, a produção de AGV ruminal não variou entre os grupos, portanto, a diferença observada foi atribuída à menor excreção salivar, com conseqüente menor capacidade tamponante do ambiente ruminal para o referido grupo. Corroborando com os autores anteriores, Bittar et al. (2009) não verificaram efeito significativo da forma física do concentrado sobre o padrão de fermentação ruminal dos grupos experimentais no momento do desaleitamento.

Outros estudos que avaliaram os efeitos das diferentes formas físicas do concentrado e a inclusão de fibra na dieta sobre o pH (Suárez et al., 2006; Porter et al., 2007; Hill et al., 2009), concordaram que a forma física e o tamanho de partícula se mostraram mais importantes que o teor de fibras para promover a fermentação ruminal e início da atividade de ruminação. Porém, resultado controverso foi encontrado por Terré et al. (2013) ao verificar que o fornecimento de forragem determinou maior pH ruminal que o não-fornecimento.

Logo, não há concordância sobre a quantidade, fonte ou momento de fornecer a suplementação forrageira, embora se saiba que ela afeta as funções ruminais dos bezerros.

## **5. Ácidos Graxos Voláteis**

Os AGV são produtos do metabolismo bacteriano, sendo muito importantes para o hospedeiro, pois sendo energéticos, suprem de 60% a 80% da energia dietética dos ruminantes. Se o hospedeiro tiver boa capacidade absorptiva, apenas uma pequena quantidade de AGV escapam para as vias digestivas inferiores (Berchielli et al., 2011). Daí a importância do epitélio ruminal organizado em papilas, cuja função é de expansão de área de absorção.

Também conhecidos como AGCC, eles contêm de 1 a 7 átomos de carbono e estão dispostos para formar compostos cuja predominância é dos ácidos acético, propiônico e butírico. Todos são produzidos junto com pequenas quantidades de outros compostos orgânicos, tais como metano, dióxido de carbono, lactato e álcool, durante o processo de fermentação ruminal (Bergman et al., 1990).

Em decorrência do fato de que os mamíferos não possuem aparato enzimático capaz de digerir carboidratos estruturais complexos (celulose, hemicelulose e pectina), a fermentação microbiana é de grande vantagem para o animal hospedeiro, representando a maior fonte de energia absorvível no rúmen. Os AGCC são ácidos fracos e suas concentrações variam consideravelmente de acordo com a dieta. Variações nas proporções individuais de cada ácido são citadas por Coelho da Silva e Leão (1979) como sendo do acetato 54 a 74%, propionato 16 a 27% e butirato 6 a 15% do total de AGCC produzidos no rúmen.

Um estudo clássico de Elsdén et al. (1946), citado por Bergman et al. (1990), comparou a concentração total de AGCC em diferentes locais do trato gastrointestinal dos ruminantes, determinando ser esta uma função direta da população microbiana, proporcional ao tempo ou extensão pela qual a digesta é retida. Dos AGV produzidos no rúmen, entre 12 e 35% passam para o omaso e abomaso e são absorvidos nesses órgãos.

O mecanismo molecular da absorção dos AGCC não está completamente entendido, entretanto parece envolver alterações locais no pH, próximo à superfície absorptiva. A membrana interna do epitélio ruminal é permeável às formas livres e aniônica dos AGCC, enquanto a membrana externa é permeável apenas à forma livre. A troca de íons sódio e hidrogênio pelas células epiteliais pode reduzir o pH da superfície de absorção, o que faz com que as moléculas de AGCC passem do estado iônico para o estado livre, favorecendo o gradiente de concentração entre luz e célula, por meio do qual se dá o processo de absorção. Além do pH, a taxa de absorção é influenciada pelo tamanho da cadeia dos ácidos individuais: ácidos de cadeia menor são absorvidos mais rapidamente (butírico > propiônico > acético) (Berchielli et al., 2011).

Em ruminantes, somente pequena quantidade de acetato absorvido é utilizado pelo fígado. Em função da alta atividade da enzima acetil-CoA sintetase nos tecidos adiposos, estes são os grandes utilizadores de acetato (Anniston, 1984, citado por Bergman et al., 1990).

O butirato é grandemente removido pelos epitélios ruminal e intestinal (90% é metabolizada a CO<sub>2</sub> ou corpos cetônicos). Em ovelhas, a capacidade cetogênica a partir do butirato do epitélio ruminal aumentou com a idade, independente da dieta (Lane et al., 2000),

embora somente a ação dos alimentos sólidos seja capaz de aumentar a capacidade absorptiva da mucosa ruminal. A maior parte do propionato é metabolizada pelo fígado (o restante correspondente a 10 a 50% é metabolizado no epitélio ruminal). Somente pouco desses dois AGCC escapam para a circulação geral. Desta forma, na circulação arterial, o acetato representa de 90 a 100% do total de AGV.

Berarka et al. (1998) relataram que o processo de fermentação e seus produtos finais podem ser encontrados no rúmen de bezerros antes das duas semanas de idade. Suárez et al. (2006) reportam que a concentração ruminal de AGV em bezerros de oito semanas de idade é próxima à observada em animais adultos (120 a 160 mM/L).

Dietas com alimentos concentrados tendem a resultar em aumento das concentrações molares de butirato e propionato em detrimento do acetato. (Schwartzkopf-Genswein et al., 2003). Por outro lado, o consumo de alimentos forrageiros promove a proliferação de microrganismos celulolíticos, o que resulta em aumento das proporções molares de acetato (Zitnan et al., 1998). Em bezerros, contudo, os efeitos dos tipos de carboidratos sobre a concentração de AGV ruminais não são claramente descritos na literatura (Khan et al., 2016).

A produção e a concentração de AGV são afetadas por vários elementos do concentrado, entre eles o processamento a que este foi submetido, uma vez que ocorre aumento da área superficial para ação enzimática sobre o amido (Hutington, 1997). Porém, não é claro na literatura qual tipo de processamento de qual fonte de amido que melhor contribui para o processo de fornecimento de energia para suprir os requerimentos do bezerro.

Gorka et al. (2009) relatam que o ácido butírico é um inibidor da apoptose das células do rúmen, o que pode explicar o fato de este ácido ter sido grande indutor de alterações patológicas no tecido ruminal de bezerros em experimento conduzido por Costa et al. (2008). Por outro lado, Sakata e Tamate (1978) verificaram estímulo no índice mitótico ao infundirem ácido butírico diretamente no rúmen de ovelhas.

Bittar et al. (2009) encontraram resultados compatíveis com Greenwood et al. (1997) ao testarem o efeito de diferentes formas físicas do concentrado sobre as concentrações molares de AGCC total e ácido propiônico, embora as concentrações molares de ácido acético tenham sido bem menores que as observadas por Greenwood et al. (1997).

Butirato e propionato são os principais produtos da fermentação do concentrado, os quais são responsáveis pelo desenvolvimento papilar ruminal (Warner, 1991), porém, todos os AGV são utilizados como fonte de energia, seja para manutenção, crescimento ou lipogênese (Bergam, 1990).

Assim como o concentrado, a forragem pode provocar alterações nos padrões de fermentação ruminal de bezerros em desenvolvimento. Comparando bezerros que recebiam forrageira com bezerros alimentados somente com concentrado, Terré et al. (2013) encontraram maiores proporções molares de acetato e propionato e menor de butirato e valerato no rúmen dos bezerros suplementados com o volumoso. A partir do estudo anterior de Cline et al. (1958), no qual foi demonstrada correlação positiva entre crescimento dos microrganismos e aumento na utilização de valerato, os autores inferiram que as baixas taxas de valerato eram função da proliferação de microrganismos celulolíticos.

O estudo de Zitnan et al. (1998) obtiveram resultado semelhante com relação ao padrão fermentativo a partir da inclusão de forragem na dieta. Da mesma forma, Suárez et al. (2006) demonstraram maior concentração de acetato e menor de propionato a partir do uso de forrageira. Apesar dos resultados citados, não é explícito se o aumento nas taxas molares de acetato são devidas à presença da matéria forrageira ao aumento do pH ruminal. Calsamiglia et al. (2008) propuseram que a concentração de determinado AGV no rúmen ocorre em função da combinação de ambos os fatores (pH ruminal e tipo de substrato a sofrer fermentação).

## **6. Nitrogênio amoniacal**

A amônia presente no rúmen é originária da degradação da proteína verdadeira da dieta, do nitrogênio não proteico da ração, do N reciclado para o rúmen na forma de ureia e da degradação das células microbianas mortas no rúmen. A concentração de nitrogênio amoniacal ruminal é indispensável para o crescimento microbiano e está diretamente relacionada à solubilidade da proteína dietética e à retenção do nitrogênio para o animal (Van Soest, 1994). Segundo Hoover (1986), 40% a 100% do nitrogênio microbiano são derivados do nitrogênio amoniacal.

Quando há excesso de proteína degradável no rúmen (PDR), ou falta de energia para utilização dessa proteína, o excesso de nitrogênio amoniacal é absorvido pela parede ruminal e transportado ao fígado para ser convertido em ureia, uma vez que a amônia é tóxica ao organismo. Essa ureia é então liberada na corrente sanguínea, sendo o principal contribuinte para a ureia plasmática (Berchielli et al., 2011).

Nocek e Polan (1984) alimentaram bezerros com dietas em níveis crescentes (30, 45 e 60%), de proteína degradável no rúmen (PDR), verificando maior concentração de nitrogênio

amoniacal no rúmen dos bezerros alimentados com a dieta de maior PDR. Porém, os autores não observaram interação entre a quantidade de PDR da dieta e a forma física da mesma (feno moído ou feno picado).

Trabalhos que avaliaram os efeitos das diferentes formas físicas do concentrado sobre os parâmetros ruminais (Beharka et al., 1998; Bittar et al., 2009) não encontraram diferença na concentração de nitrogênio amoniacal, embora Beharka et al. (1998) tenham observado valores maiores na segunda e sexta semanas de vida no grupo dos animais alimentados com concentrado de granulometria mais grosseira. No mesmo trabalho, os autores ainda relatam queda na concentração de nitrogênio amoniacal com o avançar da idade, justificado pelo aumento da utilização das bactérias e talvez, pela maior capacidade absorptiva.

Khan et al. (2007) mostraram maior concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen de bezerros que apresentaram maior consumo de concentrado, logo, maior ingestão de proteína para degradação ruminal.

## **7. Fornecimento de água**

A água é o nutriente mais essencial para o organismo animal. Holmes e Wilson (1989) observaram que o consumo de água é afetado pelas necessidades fisiológicas, nível e consumo de alimentos sólidos, natureza química da dieta, temperatura ambiente e variação individual entre animais.

A maior parte da água que chega ao rúmen do bezerro é ingerida livremente (Quigley, 1997). Porém, a quantidade de água a ser consumida pode ser dependente da quantidade de matéria seca presente na dieta líquida (Roy, 1980).

Para que o desenvolvimento ruminal não seja comprometido, é necessário que haja água suficiente para que as bactérias consigam crescer e se multiplicar. Em estudo sobre o fornecimento de água para bezerros em fase de aleitamento, Kertz et al. (1984) avaliaram bezerros que recebiam água a vontade e bezerros que recebiam fornecimento restrito de água. Os autores concluíram que o desempenho dos animais pode ser aumentado com acesso livre a água desde os primeiros dias de vida, uma vez que o grupo com livre acesso à água mostrou maior consumo de concentrado e maior ganho de peso. Além disso, foi observado que os bezerros aumentavam o consumo de água quando apresentavam quadros de diarreia, na tentativa de compensar a desidratação.

Confirmando a relação estreita entre as variáveis consumo de água e consumo de concentrado, Coelho (1999) e Bernardes (2007) verificaram aumento do consumo de água de acordo com o incremento de consumo de matéria seca.

## **8. Peso dos compartimentos**

Estimular o bezerro a consumir alimentos sólidos precocemente possui efeitos positivos (Jones e Heinrichs, 2007), já que sua presença está relacionada à dinâmica de fermentação microbiana, com consequente desenvolvimento funcional do rúmen. Os bezerros que ingerem apenas leite, apresentam discreto desenvolvimento ruminal. Já nos que recebem dieta que associa o leite ao alimento sólido, verifica-se significativo aumento em peso e volume de retículo-rúmen, bem como maior comprimento e densidade papilar (Jesse e Lane, 1997).

Bittar et al. (2009) relatam que os pesos dos compartimentos, assim como os pesos em porcentagem do trato digestório total não foram afetados pelas diferentes formas físicas dos concentrados testados, exceto para o peso do abomaso, que se mostrou maior no tratamento com concentrado farelado, quando comparado ao peletizado. Os autores sugerem que maior peso de abomaso pode ser indicativo de menor desenvolvimento ruminal, embora salientem que essa medida é mais relacionada à capacidade de consumo que à maturidade fisiológica do compartimento.

Greenwood et al. (1997) e Beharka et al. (1998) já haviam relatado que não observaram diferenças no peso do retículo-rúmen de bezerros alimentados com concentrados de diferentes formas físicas e índices de abrasividade. No entanto, verificaram diferenças no epitélio do rúmen com menores índices de queratinização para o fornecimento do concentrado com maior abrasividade.

Já Suárez et al. (2006) constataram maior peso do rúmen quando compararam bezerros que consumiram concentrado fisicamente igual, porém com composição química diferente. O grupo de bezerros que consumiu concentrado com maior proporção de fibra em detergente neutro (FDN) apresentou aumento no peso do rúmen em relação ao grupo que consumiu dieta rica em amido. Contudo, não foram observadas diferenças no desenvolvimento do epitélio ruminal. Neste trabalho, ao avaliar a forma física do concentrado de mesma composição em FDN, os autores verificaram que não houve diferença no peso do retículo-rúmen, o que sugere que o concentrado na forma peletizada não estimula o desenvolvimento da musculatura ruminal de uma forma superior ao farelado.

## 9. Parâmetros histológicos

Internamente, a mucosa ruminal é constituída por várias papilas, que são prolongamentos da mesma, formadas por tecido conjuntivo com fibras de colágeno e elastina, ricamente vascularizadas. Todas as áreas do rúmen são recobertas por papilas, embora seja nos pilares que encontramos as papilas maiores e mais densas (Church, 1988).

Conforme já elucidado, os AGV são os responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das papilas ruminais. Portanto, conforme a dieta, as papilas se apresentam com determinado tamanho e forma (Davis e Drackley, 1998).

De acordo com Baldwin et al. (2004), o efeito dos AGV sobre o crescimento das papilas está relacionado ao fluxo sanguíneo e também ao efeito direto sobre expressão gênica no epitélio ruminal. Zitnan et al. (2005) observaram interação positiva entre o propionato e o tamanho das papilas em  $\text{cm}^2$ . O mesmo não foi verificado com o butirato.

O número de papilas por  $\text{cm}^2$ , a altura e a largura das papilas também não foram afetadas pelas diferentes formas físicas do concentrado avaliadas no trabalho conduzido por Bittar et al. (2009). O mesmo havia sido relatado por Beharka et al. (1998). Já Greenwood et al. (1997) haviam constatado que o concentrado com menor partícula resultou em papilas com maiores comprimentos e maior nível de ramificação.

### OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da forma física do ingresso e inclusão de feno na dieta de bezerros leiteiros sobre o consumo, desempenho, digestibilidade, desenvolvimento ruminal e expressão de mRNA de genes envolvidos no metabolismo ruminal.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, K.L.; NAGARAJA, T.G.; MORRILL, J.L. Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early. *J. Dairy Sci.*, v. 70, p.1000-1005, 1987.
- BACH, A; GIMENEZ, A; JUARISTI, J. L et al. Effects of physical form of a starter for dairy replacement calves on feed intake and performance. *J. Dairy Sci.*, v.90, p. 3028–3033, 2007.
- BALDWIN, R. L.; MCLEOD, K. R.; KLOTZ, J. L. et al. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre and postweaning ruminant. *J. Dairy Sci.*, v. 87(E. Suppl.), p. E55-E65, 2004.
- BANKS, W. *Histologia Veterinária Aplicada*. São Paulo: Editora Manole, 1991.630p.
- BATEMAN, H. G.; HILL, T. M.; ALDRICH, J. M. et al. Effects of corn processing, particle size, and diet form on performance of calves in bedded pens. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p. 782–789, 2009.
- BEHARKA, A.A.; NAGAJARA, T.G.; MORRILL, L.J. at al. Effect of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neo-natal calves. *J. Dairy Sci.*, v.81, p. 1946-1955, 1998.
- BEIRANVAND, H.; KHANI, M.; OMIDIAN, S.; ARIANA, M. et al. Does adding water to drycalf starter improve performance during summer? *J. Dairy Sci.*, v. 99, p. 1903-1911, 2016.
- BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Editora Funep, 2011.616p.
- BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, v.70, p.567-590, 1990.

BERNARDES, E. B.; COELHO, S. G.; CARVALHO, A. U. et al. Efeito da substituição do feno de Tifton 85 pelo caroço de algodão como fonte de fibra na dieta de bezerros. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zoo.*, v. 59, p. 955-964. 2007.

BITTAR, C. M. M.; FERREIRA, L. S.; SANTOS, F. A. P. et al. Desempenho e desenvolvimento do trato digestório superior de bezerros leiteiros alimentados com concentrado de diferentes formas físicas. *Rev. Bras. Zoo.*, v.38, p.1561-1567, 2009.

BROWNLEE, A. The development of rumen papillae in Cattle fed on different diets. *British Vet. J.*, v.112, p.369-75, 1956.

BULL, L.S.; BUSH, L.J.; FRIEND, J.D et al. Incidence of ruminal parakeratosis in calves fed different rations and its relation to volatile fatty acid absorption. *J. Dairy Sci.*, v.48, p.1459–1466, 1965

CALSAMIGLIA, S.; CARDOZO, P. W.; FERRET, A. et al. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci.*, v.86, p.702–711, 2008.

COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. Fundamentos de nutrição de ruminantes. Piracicaba: Ed. Livroceres, 1979. 384p.

CASTELLS, L; BACH, A; ARAUJO, G. et al. Effect of different forage sources on performance and feeding behavior of Holstein calves. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.286–293, 2012.

CASTELLS, L; BACH, A; ARIS, A. et al. Effects of forage provision to young calves on rumen fermentation and development of the gastrointestinal tract. *J. Dairy Sci.*, v.96, p. 5226–5236, 2013.

CHAVES, A. S.; COSTA, S. F.; MELO, L. Q. et al. Performance of calves submitted to Protocols using extruded or ground starter. *Bra. Arc. Bio. and Tech.*, v.57, p. 695-700, 2014.

COELHO, S. G. *Ganho de peso e desenvolvimento do estômago de bezerros desaleitados aos trinta dias de idade e alimentados com concentrado e com ou sem feno*. 1999. 123 p. Tese (Doutorado em Nutrição Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

CHURCH, D. C. *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition*. New Jersey: Prentice-Hall, 1988. 564p.

COSTA, S.F.; PEREIRA, M.N.; MELO, L.Q.; CHAVES, M.L. et al. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa rumenal e epiderme de bezerros. II. Aspectos ultra-estruturais. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zoo.*, v.60, p.10-18, 2008.

COVERDALE, J. A., TYLER, H. D.; QUIGLEY III, J. D.; BRUMM, J. A. Effect of various levels of forage and form of diet on rumen development and growth in calves. *J. Dairy Sci.*, v. 87, p.2554–2562, 2004.

COZZI, G.; GOTTARDO, F.; MATTIELO, F.; CANALI, E.; SCANZIANI, E.; VERGA, M.; ANDRIGHETTO, I. The provision of solid feeds to veal calves: Growth performance, forestomach development, and carcass and meat quality. *J. Animal Sci.*, v.80, p. 357-366, 2002.

D'ARCE, R. D.; FLECHTMANN, C. H. W. *Introdução à anatomia e fisiologia animal*. São Paulo: Nobel, 1980. 186p.

DADO, R.G.; ALLEN, M.S. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. *J. Dairy Sci.*, v.78, p.118-133, 1995.

DAVIS, C. L.; DRACKLEY, J.K. *The development, nutrition and management of the young calf*. Ames: Iowa State University Press, 1998. 339p.

DESWYSEN, A.G. et al. Nycterohemeral eating and ruminating patterns in heifers fed grass or corn silage: analysis by finite fourier transform. *J. Animal Sci.*, v.71, p.2739-2747, 1993.

DRACKLEY, J. K. Calf nutrition from birth to breeding. *Vet. Clin. Food Anim.*, v.24, p. 55-86, 2008.

DUKES, H. H. Fisiologia dos animais domésticos. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1993. 480p.

FLATT, W. P.; WARNER, R. G.; LOOSLI, J. K. Influence of purified materials on the development of the ruminant stomach. *J. Dairy Sci.*, v.41, p.1593-1600, 1958.

FRANKLIN, S. T.; AMARAL-PHILLIPS, D. M., JACKSON, J. A. et al. Health and Performance of Holstein Calves that Suckled or Were Hand-Fed Colostrum and Were Fed One of Three Physical Forms of Starter. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.2145–2153, 2003.

GARRET, W. N.; MEYER, J. H.; LOFGREEN, G. P. et al. Effect of pellet size and composition on feedlot performance, carcass characteristics and rumen parakeratosis on fattening steers. *J. Animal. Sci.*, v. 20, p. 833-838, 1961.

GONCU, S.; BOGA, M.; KILIÇ, U. et al. Effects of Feeding Regime Without Roughage on Performances and Rumens Development of Calves During Prewaning Period. *J. Agricultural Sci.*, v. 16, p.123-128, 2010.

GORKA, P.; KOWALSKI, Z.M.; PIETRZAK, P. et al. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. *J. Physiology and Pharmacology*, v. 60, p. 47-53, 2009.

GRAY, F. V. The absorption of volatile fatty acids from the rumen II. The influence of pH on absorption. *Exptl. Biol.*, v.25, p.135, 1947.

GREENWOOD, R. H.; MORRIL, J. L.; TITGEMEYER, E. C. et al. A new method of measuring diet abrasion and its effect on the development of the forestomach. *J. Dairy Sci.*, v. 80, p. 2534–2541, 1997.

HARRISON, H. N.; WARNER, R. G.; SANDER, E. G.; LOOSLI, J. K. Changes in the tissue and volume of the stomachs of calves following the removal of dry feed or consumption of inert bulk. *J. Dairy Sci.*, v.43, p.1301-1312, 1960.

HEITMANN, R. N.; DAWES, D. J.; SENSENIG, S. C. Hepatic Ketogenesis peripheral Ketone body utilization in the ruminant. *Journal of Nutrition*, v.117, p. 1174-1180, 1987.

HIBBS, J. W., CONRAD, H. R.; POUNDEN, W. D. et al. A high roughage system for raising calves based on early development of rumen function. VI. Influence of hay to grain ratio on calf performance, rumen development, and certain blood changes. *J. Dairy Sci.*, v.39, p.171–179, 1956.

HILL, T. M., H. G. BATEMAN, J. M. ALDRICH et al. Effects of the amount of chopped hay or cottonseed hulls in a textured calf starter on young calf performance. *J. Dairy Sci.*, v.91, p.2684–2693, 2008a.

HILL, T. M., H. G. BATEMAN, J. M. ALDRICH et al. Effect of feeding different carbohydrate sources and amounts to young calves. *J. Dairy Sci.*, v.91, p.3128–3137, 2008b.

HILL, T. M.; QUIGLEY, J. D.; BATEMAN, H.G. et al. Source of carbohydrate and metabolizable lysine and methionine in the diet of recently weaned dairy calves on digestion and growth. *J. Dairy Sci.*, v.99, p. 2788–2796, 2016.

HOFMANN, R. R. Anatomy of the gastro-intestinal tract. In: CHURCH, D.C. The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs: Waveland Press Inc., 1993. Cap. 2, p. 14-43.

HOLMES, C. W.; WILSON, G.F. Produção de leite a pasto. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1989. 770p.

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.*, v. 69, n.10, p. 2755-2766, 1986.

- HUBER, J.T. Development of the digestive and metabolic apparatus of the calf. *J. Dairy Sci.*, v.52, p. 1303-1315, 1969.
- HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *J. Animal Sci.*, v.75, p.852–867, 1997.
- JAHANI-MOGHADAM, M.; MAHJOUBI, E.; HOSSEIN- YAZDI, M. et al. Effects of alfalfa hay and its physical form (chopped versus pelleted) on performance of Holstein calves. *J. Dairy Sci.*, v.98, p. 4055–4061, 2015.
- JARRAH, A.; GHORBANI, G.R.; REZAMAND, P. et al. Effects of processing methods of barley grain in starter diets on feed intake and performance of dairy calves. *J. Dairy Sci.*, v.96, p.7269–7273, 2013.
- JESSE, M. A.; LANE, B. W. Effect of volatile fatty acid infusion on development of the rumen epithelium in Neonatal sheep. *J. Dairy Sci.*, v.80, p. 740-746, 1997.
- JONES, C.; HEINRICHS, J. Early Weaning Strategies. 2007. (Disponível em: <http://www.extension.org/pages/10862/early-weaning-strategies> , acessado em: 07 de dezembro de 2016)
- KERTZ, A. F.; PREWITT, L. R.; EVERETT, J. P. An early weaning calf program: Summarization and review. *J. Dairy Sci.*, v.62, p.1835-1843, 1979.
- KERTZ, A. F.; REUTZEL, L. F.; MAHONEY, J. H. Ad libitum water intake by neonatal calve and its relationship to calf starter intake, weight gain, fecal score and season. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.2964-2969, 1984.
- KESLER, E. M.; RONNING, M.; KNOPT, C. B. Some physical characteristics of the tissue and contents of the rumen, abomasum and intestine in male Holstein Calves of various ages: *J. Dairy Sci.*, v.10, p.969-974, 1951.

KHAN, M. A.; BACH, A.; WEARY, D. M. et al. Invited Review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. *J. Dairy Sci*, v.99, p.885-902, 2016.

KHAN, M. A.; WEARY, D.M; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk. *J. Dairy Sci*, v.94, p. 3547–3553, 2011.

KHAN, M. A.; LEE, H. J.; LEE, W. S. et al. Structural growth, rumen development, and metabolic and immune responses of holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. *J. Dairy Sci*, v.90, p. 3376–3387, 2007.

KINCAID, R. L. Alternative methods of feeding alfalfa to calves. *J. Dairy Sci.*, v.63, p.91–94, 1980.

KLEIN, R. D.; KINCAID, R. L.; HODGSON, A. S. et al. Dietary Fiber and early weaning on growth and rumen development of Calves. *J. Dairy Sci*, v.70, p.2095-2104, 1987.

KRAUSE, K. M. and OETZEL, G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.126, p.215–236, 2006.

LAARMAN, A. H. and OBA, M. Short communication: Effect of calf starter on rumen pH of Holstein dairy calves at weaning. *J. Dairy Sci*, v.94, p. 5661–5664, 2011.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B.; VAN AMBURGH, M. E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Animal Sci.*, v. 76, p. 2190- 2196, 1998.

LEIBHOLZ, J. Ground roughage in the diet of the early-weaned calf. *Anim. Prod.*, v.20, p.93–100, 1975.

LANE, M. A.; BALDWIN, R. L.; JESSE, B. W. Sheep rumen metabolic development in response to age and dietary treatments. *J. Animal Sci.*, v. 78, p.1990-1996, 2000.

LUCCI, C. S. Bovinos Leiteiros Jovens: Nutrição. Manejo. Doenças. São Paulo: Nobel/Editora da Universidade de São Paulo, 1989. 371 p.

LYFORD, S. J. Growth and development of the ruminant digestive system. In: CHURCH, D.C. The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs: Waveland Press Inc., 1993. Cap. 3, p. 44-63.

MONTORO, C., and BACH, A. Voluntary selection of starter feed ingredients offered separately to nursing calves. *Livest. Sci.*, v.149, p.62–69, 2012.

MONTORO, C., MILLER-CUSHON, T. J. DEVRIES et al. Effect of physical form of forage on performance, feeding behavior, and digestibility of Holstein calves. *J. Dairy Sci.*, v.96, p.1117–1124, 2013.

NETO R. M.; FARONI, C. E.; PAULETTI, P. et al. Levantamento do Manejo de Bovinos Leiteiros Recém-Nascidos: Desempenho e Aquisição de Proteção Passiva. *R. Bras. Zoo.*, v.33, p.2323-2329, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington, DC: *Natl. Acad. Sci.*, 2001. 260p.

NOCEK, J. E.; POLAN, C. E. Influence of ration form and nitrogen availability on ruminal fermentation patterns and plasma of growing bull calves. *J. Dairy Sci.*, v. 67, p.1038-1042, 1984.

ORSKOV, E.R. Starch digestion and utilization in ruminants. *J. Animal Sci.*, v.63, p.1624-1633, 1986.

PHILLIPS, C. J. C. The effects of forage provision and group size on the behavior of calves. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.1380–1388, 2004.



PORTER, J. C.; WARNER, R. G.; KERTZ, A. F. Effect of fiber level and physical form of starter on growth and development of dairy calves fed no forage. *Professional Animal Scientist*, v.23, p.395–400, 2007.

QUIGLEY, J. D. Replacement heifers from birth to weaning. *Western dairy management conference*, March 13-15, 1997. Las Vegas, Nevada.

ROY, J.H.B. *The Calf*. London: Butterworths, 1980. 442p.

SANDER, E. G.; WARNER, R. G.; HARRISON, H. N. et al. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosa in the young calf. *J. Dairy Sci.*, v.42, p.1600-1605, 1959.

SAHOO, A.; DAMRA, D.N.; PATHAK, N.N. Pre- and postweaning attributes in faunated and ciliate-free calves fed calf starter with or without fish meal. *J. Dairy Sci.*, v.88, p.2027–2036, 2005.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. *J. Dairy Sci.*, v.61, p.1109–1113, 1978.

SANTINI, F. J.; HARDIE, A. R.; JORGENSEN, N. A. et al. Proposed use of adjusted intake based on forage particle length for calculation of roughage indexes. *J. Dairy Sci.*, v.66, p.811-820, 1983.

SCHWARTZKOPF-GENSWEINS, K. S.; BEAUCHEMIM, K. A.; GIBB, D. J. et al. Impact of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.*, v. 81 (E. Suppl. 2), p.E149–E158, 2003.

SINGH, N. et al. Early development of rumen function in buffalo calves: Histological and histochemical changes in rumen as affected by age and diet. *Indian J. Animal Sci.*, v.52, p. 490-496, 1982.

SLYTER, L. L. Influence of acidosis on rumen function. *J. Dairy Sci.*, v.43, p.910, 1976.

STOBO, I. J. F.; ROY, J. H. B.; GASTON, H. J. Rumen development in the calf. I. The effect of diets containing different proportion of concentrates to hay on rumen development. *British J. Nutrition*, v.20, p.171-188, 1966.

SUÁREZ, B. J.; VAN REENEN, C. G.; GERRITS, W. J. J. et al. Effects of supplementing concentrates differing in carbohydrate composition in veal calf diets. *J. Dairy Sci.*, v.89, n.11, p.4376-4386, 2006.

SUÁREZ, B. J.; VAN REENEN, C. G.; STOCKHOFE, N. et al. Effect of roughage source and roughage to concentrate ratio on animal performance and rumen development in veal calves. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.2390-2403, 2007.

SUAREZ-MENA, F. X.; HEINRICHS, A. J.; JONES, M.C. et al. Digestive development in neonatal dairy calves with either whole or ground oats in the calf starter. *J. Dairy Sci.*, v.98, p. 3417–3431, 2015.

SUAREZ-MENA, F.X.; HILL, T.M; JONES, C.N. et al. Review: Effect of forage provision on feed intake of dairy calves. *The Prof. Anim. Sci.*, v.32, p. 383-388, 2016.

SUTTON, J. D.; MCGILLIARD, A. D.; JACOBSON N. L. Functional development of rumen mucosa. *J. Dairy Sci.*, v. 46, p. 426-436, 1963.

TAMATE, H.; MCGILLIARD, A. D.; JACOBSON, N. L. et al. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *J. Dairy Sci.*, v.45, p.408-420, 1962.

TERRÉ, M; CASTELLS, L; KHAN, M. A; BACH, A. Interaction between the physical form of the starter feed and straw provision on growth performance of Holstein calves. *J. Dairy Sci.*, v.98, p. 1101–1109, 2015.

VAN AMBURGH. M. E. Calf growth and development: New requirements and implications for future performance. In: Southwest Nutrition and Management Conference, 2003, Tucson. Proceedings... Tucson: Southwest Dairy Management Proceedings, p. 1-13, 2003

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.

VELOSO, C. M.; GONSALVES NETO, J.; GOMES, R. B. et al. Concentrado peletizado e farelado para bezerros leiteiros na fase de aleitamento: Desempenho. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 43.,2006, João Pessoa. Anais... João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006. (CD-ROM).

WARD, G. A. A. Effect of Pre-Weaning Diet on Lamb's Rumen Development. *American-Eurasian J. of Agriculture and Environment Sci.*, v.3, p.561-567, 2008.

WARDROP, I. D.; COOMBE, J. B. The development of rumen function in the lamb. *Australian J. of Agricultural Reserch*, v.21, p.661-680, 1961.

WARNER, R. G. Nutritional factors affecting the development of a functional ruminant - a historical perspective. In: Cornell Nutrition Conference, 1991, Ithaca. Proceedings... Ithaca: Cornell University, p.1-12, 1991.

WARNER, R. G.; FLATT, W. P.; LOOSLI, J. K. Dietary factors influencing the development of the ruminant stomach. *J. Agricultural and Food Chemistry*, v.4, p.788-792, 1956.

WELCH, J.G. et al. Nycterohemeral eating and ruminating patterns in heifers fed grass or corn silage: analysis by finite fourier transform. *J. Animal Sci.*, v.74, p.2739-2747, 1993.

WILLIAMS, P. E. V.; FALLON, R. J.; INNES, G. M. et al. Effect on food intake, rumen development and live weight of calves of replacing barley with sugar beet-citrus pulp in a starter diet. *Anim. Prod.*, v.44, p.65-73, 1987.

WOOD, K. M.; PALMER, S. I.; STEELE, M. A. et al. J. A. The influence of age and weaning on permeability of the gastrointestinal tract in Holstein bull calves. *J. Dairy Sci.* <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9393>, 2015.

ZIEGLER, B.; LARSON, R.; CHESTER-JONES, H. et al. Pre- and post-weaning performance of dairy heifer calves fed texturized or pelleted calf starters with or without intake enhancing flavors. *J. of Animal Sci.*, v.84, p.365, 2006 (suppl. 1).

ZITNAN, R.; KUHLA, S.; SANFTLEBEN, P. et al. Diet induced ruminal papillae development in neonatal calves not related with rumen butyrate. *Vet. Med. –Czech*, v. 50, p. 472-479, 2005.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da granulometria do concentrado sobre desenvolvimento do rúmen, saúde, desempenho e eficiência alimentar de bezerras", Protocolo Nº 26/2015, sob a responsabilidade de Fernanda Samarini Machado - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, em reunião de 11/09/2015.

Vigência do Projeto	De 01/10/2015 a 30/03/2016
Espécie/Linhagem	Bos taurus/Bovino
Nº de Animais	42
Peso/Idade	70 Kg/D1 a 90 dias
Sexo	Machos ( x )      Fêmeas ( )
Origem	Biotérios da Embrapa Gado de Leite ( x )      Frigorífico ( )

João Batista Ribeiro  
Secretário Administrativo da CEUA/EGL

## CAPÍTULO II

### Effects of physical form of starter and forage provision in the diet of dairy calves during the preweaning period

#### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of physical form of starter and inclusion of hay in diet of preweaning dairy calves on the intake, performance, digestibility, ruminal development, and the mRNA expression of genes involved in the ruminal metabolism. Holstein × Gyr crossbred male calves (n = 38) were enrolled on trial between 1 and 9 wk of age, and were assigned to 3 treatments, which consisted of: pellet + flocculated corn starter (**Pellet + flocculated corn**, n = 13), ground starter (**Ground**, n = 12), and ground starter + 5% chopped Tifton hay (**Ground+ 5% Hay**, n = 13). Pellet + flocculated corn starter had 96% pellets (4 mm in diameter and 18 mm in length) and 4% steam flaked corn. The same starter of the Pellet + flocculated corn treatment was used in the treatments Ground and Ground + 5% Hay, but ground to pass a 3.2 mm sieve. Tifton hay was added at 5% as fed of the amount of starter supplied to calves of the Ground + 5% Hay treatment, chopped into 67.1% of long particles (>19 mm), 13.3% of medium particles (between 8 and 20 mm) and 19.6% of small particles (<8 mm). All calves were fed 4L/d of whole milk up to 63 d of age and were weaned at 64 d of age. Water and starter were offered *ad libitum*. Samples of ruminal contents were obtained from all animals at 30, 45 and 60 d of age to evaluate the pH, ammonia nitrogen and volatile fatty acids (**VFA**). At 55 d of age, an apparent digestibility assay was performed using 18 animals (n = 6 per treatment). At 65 d of age, the 18 animals were euthanized to evaluate the development of the digestive tract. The physical form of starter and the dietary inclusion of hay did not influence intake, performance, feed efficiency, apparent nutrient digestibility, energy partitioning, nitrogen balance, ruminal pH, ammonia nitrogen concentration, VFA and the development of the digestive tract. The mRNA expression of monocarboxylate transporter 1 (*SLC16A1*) was higher in the dorsal sac than ventral sac. A tendency to increase the level of mRNA expression of *SLC16A3* (*MTC4*) transporter and *SLC9A2* (*NHE-2*) were observed on ground treatment.

Key words: digestibility, digestive tract, mRNA expression, ruminal metabolism.

## INTRODUCTION

According to the NRC (2001), besides being palatable, calf starter must be made of good quality ingredients to ensure adequate supply of proteins, energy, fiber, vitamins and minerals, with a coarse texture. Coarse-textured starter is indicated to stimulate musculature development, rumen motility and epithelial health (Beharka et al., 1998); and the use of easily fermentable carbohydrates is indicated to stimulate the development of the ruminal epithelium (Flatt et al., 1958, Baldwin et al., 2004).

The consume of easily fermentable carbohydrate increases short-chain fatty acid (SCFA) concentrations of propionate and butyrate, that are absorbed and metabolized by the rumen walls, being sources of energy for the ruminants (Bergman, 1990) and capable to stimulate the ruminal papillae development (Bergman and Wolff, 1971; Baldwin et al., 2004; Shen et al., 2004). Despite of the propionate has been metabolized by ruminal epithelium, the butyrate is appointed as the most SCFA that is extensively metabolized in ruminal epithelium and able to increase papillae surface area due to stimulation of mitosis (Bergam, 1990; Shen et al., 2004; Malhi et al., 2013).

According to Lesmeister and Heinrichs (2004); Bateman et al. (2009); Terré et al. (2015) and Khan et al. (2016), feedstuffs processing can modify the physical and chemical form, then altering ruminal fermentation, passage rate and digestibility. Therefore, the processing can affect the intake of solid and the physical and metabolic development of the digestive tract (Baldwin et al., 2004). However, the lack of synergism between the fermentation of carbohydrates and the absorption of the end products of fermentation can decrease the ruminal pH, leading to abnormal epithelial development and hyperkeratinization (Bull et al., 1965), in addition to a reduced absorption of VFA (Hinders and Owen, 1968).

Considering that the supply of ground starter can be economically advantageous due to the reduction in costs of processing, an alternative to avoid the abnormal development of the rumen epithelium would be the inclusion of hay in the diet of calves (Khan et al., 2012; Pazoki et al., 2017).

To better understand the mechanisms responsible for variations in intake and performance in response to physical changes in diets, some researchers have associated molecular techniques and dietary nutrients analysis, in order to quantify and understand what genes could increase the VFA absorption, optimize papilla growth and ruminal metabolism (Laarman et al., 2012; Naeem et al., 2012; Zhongyan Lu et al., 2016). According to Argov-

Argaman et al. (2012), the mRNA expression of propionyl-CoA carboxylase A (*PPCA*) enzyme in the ruminal epithelium was higher, as well as, rumen surface area and papillae length when the heifers received rumen degradable starch than rumen degradable fiber. In the other hands, calves that consumed greater amount of starter had more VFA concentration in the rumen and up regulation of genes involved in the ruminal transporter, cell proliferation, ketogenic and propionate metabolism, and down regulation of genes involved in the fatty acid oxidation (Penner et al. 2009; Naeem et al. 2012).

The objectives of this study were to evaluate the effects of physical form of starter and hay provision in the diet of dairy calves during the pre weaning period on intake, performance, nutrients digestibility, energy partitioning, nitrogen balance, rumen development and the level of mRNA expression of genes involved in the rumen metabolism. Our hypothesis is that the coarser diets promote greater consumption and the inclusion of hay in ground starter diet improves the intake, performance, ruminal development and alters the mRNA expression of genes involved in the rumen metabolism.

## **MATERIALS AND METHODS**

The study was approved by the Ethics Committee of Embrapa Dairy Cattle, Brazil (protocol number 26/2015). The experiment was conducted at the Embrapa Dairy Cattle Experimental Farm, located in Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brazil.

### ***Animals, Housing, and Treatments***

Holstein × Gyr crossbred male calves (n = 38, birth body weight =  $33.8 \pm 4.3$  kg, mean  $\pm$  SD) were used; their genetic composition was 5/8 or more Holstein and 3/8 or less Gyr. At birth, calves were removed from their dams, weighed and had their umbilical cord immersed in iodine solution (7%). Colostrum (10% of birth weight; > 50 g/L of IgG) was fed within 6–8 h after birth. Blood samples were collected via jugular vein puncture within 48 h after birth. Samples were centrifuged at  $800.6 \times g$  for 10 min to measure total serum protein using a digital refractometer (Misco DD-3 Palm Abbe Digital, Solon, Ohio, USA). All calves were housed in sand-bedded individual pens (1.25 x 1.75 m, tethered with 1.2 m-long chains), which were allocated in a barn with open sides. At 8 d of age, preventive oral treatment



against coccidiosis (Baycox Ruminants, Bayer, Leverkusen, Germany) was performed, at a 3 mL/10 kg of BW.

At 2 to 3 d of age, calves were fed 4 L/d of transition milk divided into 2 equal meals offered at 0800 and 1600 h. At 4 d, calves were assigned to three treatments maintaining a balance of birth month, birth BW, total serum protein, and genetic composition in each group. The treatments were: Pellet with flocculated corn (**Pellet + flocculated corn**, n = 13), ground starter (**Ground**, n = 12), and ground starter + 5% chopped Tifton hay (**Ground+ 5% Hay**, n = 13).

Pellet + flocculated corn starter (Soylac Rumen 20% CP, Total Alimentos, Três Corações, Minas Gerais, Brazil; Table 1) had 96% pellets (4 mm in diameter and 18 mm in length) and 4% steam flaked corn. The Pellet + flocculated corn starter was used in the treatments Ground and Ground + 5% Hay, but ground to pass a 3.2 mm sieve. Tifton hay was offered separately from starter (Ground + 5% Hay treatment) at 5% as fed of the amount of starter supplied. The hay was chopped using a stationary chopper (Menxon Charger 35.0 G, Cajuru, São Paulo, Brazil) and the particle distribution was determined using the NASCO's Penn State Particle Separator (Nasco, Fort Atkinson, WI), as follows: 67.1% of long particles (>19 mm), 13.3% of medium particles (between 8 and 20 mm) and 19.6% of small particles (<8 mm).

The total volume of whole milk (4 L/d) was divided into 2 equal meals (0800 and 1600 h) and provided to calves in buckets from 4 to 63 d of age. Calves were weaned at 64 d of age. Starter and water were offered *ad libitum* throughout the experimental period. The amount of starter provided was sufficient to result in 20% orsts.

### ***Intake, Performance, and Growth***

Calves' performance, body measurements, and intake were monitored between 4 and 63 d of age. Intake of whole milk, starter, hay, and water was calculated daily by subtracting refusals from the amounts provided. The total intake of DM, organic matter (**OM**), crude protein (**CP**), neutral detergent fiber (**NDF**) were calculated. Water intake was measured using a portable balance (WH-A04; WeiHeng, Yongkang, China).

The BW and body measurements (withers height, heart girth, hip height, and hip width) were measured once a week before morning feeding. Feed efficiency was calculated using the ratio between ADG and total DMI (Khan et al., 2007).

### *Nutritional Composition Analysis*

Milk samples were collected twice a day (morning and afternoon) and analyzed using an infrared analyzer (Bentley 2000; Bentley Instruments Inc., Chaska, MN). Samples of the starter and hay were collected 3 d per week and composed by weekly. Feces samples were pre-dried in a forced ventilation oven (55°C) for 72 h and ground in a 1-mm sieve. All samples were analyzed for DM (method 934.01), CP (method 988.05), ether extract (method 920.39), and ash (method 942.05) according to the AOAC (1990). NDF and acid detergent fiber ADF were determined according to the method proposed by Van Soest et al. (1991). Gross energy was determined using an adiabatic calorimeter (IKA - C5000, IKA® Works, Staufen, Germany).

### *Nutrient Apparent Digestibility, Energy Partitioning, and Nitrogen Balance*

Between 55 and 60 d of age, six animals per treatment were submitted to an apparent nutrient digestibility trial with a 5 d total feces and 1 d urine collection in metabolic cages of 1.50 mx 0.80 m (Intergado Ltda., Contagem, Brazil). Feces were weighed every day for each calf and stored at -20°C for further analysis. For each day of fecal collection, total feces per calf were weighed, homogenized, and sampled. Urine collections were performed within 24 h. Urine tubes were kept on ice. The volume, weight and density of urine from each animal were measured and a sample of 50 mL was taken and stored at -20° C for gross energy and nitrogen analyzes. During the digestibility trial, samples of liquid diet, starter, and refusals for each calf were also sampled, pooled for the 5 d period, and stored in plastic containers until analysis.

For the energy balance, gross energy intake (**GEI**) was calculated by the difference between the gross energy content (**GE**) of each feed offered (milk, starter and hay) and those obtained in the respective orts. The GE content of the milk was calculated according to Drackley (2008), where:  $GE \text{ (Mcal/kg milk)} = (0.0911 \times \% \text{fat}) + (0.0586 \times \% \text{crude protein}) + (0.0395 \times \% \text{lactose})$ . Digestible energy intake (**DEI**) was calculated by the difference between GEI and fecal energy excretion. Metabolizable energy intake (**MEI**) was derived as the difference between DEI and urine energy. The percentages of consumed energy lost as feces and urine (DE/GE) and the relationships between ME/GE (metabolizability) and ME/DE, as energy efficiency indexes, were also calculated.

Nitrogen balance, or nitrogen retained, was calculated according to the equation: N retained (g/d) = N ingested - (fecal N + urine N).

### ***Ruminal pH, Ruminal Ammonia Nitrogen, and Ruminal Organics Acids***

Ruminal fluid samples were obtained from six animals per treatment at 30, 45, and 60 d of age. Samples of approximately 50 mL were collected using a stomach tube technique (Lodge-Ivey et al., 2009; Terré et al., 2013) 5 h after morning feeding. Ruminal fluid pH was measured immediately after collection using a portable potentiometer (DM-2-Digimed, São Paulo, São Paulo, Brazil). Contents were filtered through 4 layers of cheesecloth to separate the liquid and solid fractions. All samples were stored in plastic tubes at -20°C for further analysis. The ruminal NH<sub>3</sub>N concentration was quantified after distillation of Kjeldahl with magnesium oxide and calcium chloride according to method 920.03 (AOAC, 1990). Concentration of VFA determined in the samples previously centrifuged at 1,800 × g for 10 min at room temperature (22-25° C) by high performance liquid chromatography (Waters Alliance e2695 Chromatograph, Waters Technologies do Brazil LTDA, Barueri, SP, Brazil).

### ***Slaughter, Gastrointestinal Tract, Internal Organs, and Viscera Weight***

At 65 d of age, calves were slaughtered after being deprived of liquid diet for 12 h. Pre-anesthetic medication with 2% xylazine hydrochloride (30 to 40 mg per 100 kg BW) was administered intravenously. After 20 minutes, 5% thiopental sodium (5 mg/kg BW) was directly administered into the foramen magnum, located in the occipital bone of the skull. Once the cardiorespiratory arrest was verified, bleeding was carried out by an incision made in the jugular furrow at the base of the neck.

After slaughter, the abdominal cavity was immediately opened, and each region of the gastrointestinal tract (reticulo-rumen, omasum, and abomasum) was isolated, tied off, and weighed. After samples were collected from the gastrointestinal tract, it was emptied, washed with running water (to remove contents), and weighed. Internal organs and viscera were also weighed. All variables were evaluated as a proportion of empty BW.

### ***Gastrointestinal Tract Development***

An area of 5 cm<sup>2</sup> from the ventral ruminal sac and omasum laminae were fixed in formalin and routinely processed for paraffin embedding. The paraffin blocks were sectioned using an Olympus CUT 4055 manual microtomes (Olympus, Tokyo, Japan) into 5 µm-thick serial sections. For morphometric analysis, slides were stained with Hematoxylin-Eosin as described by Luna (1968). Images were captured using a light microscope (CX31; Olympus), attached to a camera (OSIS SC30; Olympus), using Cell-B software (Olympus). Morphometric analyses were performed using AxioVision 4.8.2–06/2010 software (Carl Zeiss Images Systems, Jena, Germany). The measurements taken were the area and height of ruminal and omasal papillae. To determine mitotic index, 2,000 cells from the basal layer of the rumen and omasum epithelium were counted, including those with nuclei presenting mitotic figures (using the light microscope, 400× magnification). Mitotic index was calculated as a ratio between the number of nuclei in division and the total number of nuclei (Costa et al., 2008).

### ***Tissue collection and RNA Extraction***

Tissue samples were collected from the anterior portion of the dorsal and ventral sac of the rumen below the reticulum and rumen fluid layer (Naeem *et al.*, 2012; Connor *et al.*, 2014) at 65d after birth. The rumen epithelium was manually separated from the underlying muscular layer by gloved hands and rinsed in tap water to remove residual feed particles. Samples of rumen epithelial tissue were stored in *RNAlater* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and thereafter stored at -20°C. The rumen tissue (30mg) was macerated using 600 µL of RLT buffer and 6 µL β-Mercaptoethanol using the Tissuruptor equipment (Qiagen, Hilden, Germany) and total RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), and treated with DNase using RNase-Free DNase Set kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacture's protocol. After that, the quantity and purity of RNA were determined by absorbance at 260 and 280nm using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The total RNA integrity was evaluated using the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

### ***Real Time Quantitative PCR***

For reverse transcription, 6  $\mu\text{L}$  of total RNA was added to 1  $\mu\text{L}$  Oligo(dT)<sub>20</sub> and 1  $\mu\text{L}$  annealing buffer. Then, this mixture was incubated at 65°C for 5 min and kept on ice for 3 min. After that, 10  $\mu\text{L}$  2X First-Strand Reaction Mix and 2  $\mu\text{L}$  of SuperScript™ III (Invitrogen®) were added to this mixture and then incubated at 25°C for 5-10 min, 50°C for 50 min, and 85°C for 5 min.

Primer sequences for the following target genes, peroxisome proliferator-activated receptor delta (*PPARD*),  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase-1 (*BDHI*), 3-Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, isoform I (*HMGCSI*), 3-Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase (*HMGCL*), lactate dehydrogenase (*LDHA*), mammalian Target of Rapamycin (*mTOR*), v-akt murine thymoma viral oncogene 1 (*AKT1*), NA<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase (*ATPIA1*), monocarboxylate transporter, isoform I (*SLC16A1/MTC1*), monocarboxylate transporter, isoform III (*SLC16A3/MTC4*), sodium/proton exchanger, isoform 1 (*SLC9A1/ NHE-1*), sodium/proton exchanger, isoform 2 (*SLC9A2/NHE-2*), sodium/proton exchanger, isoform 3 (*SLC9A3/NHE-3*) were designed online using the *Primerblast* software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Primer sequences for Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and  $\beta$ -actin (*ACTB*) were obtained from Hammon *et al.*, (2003) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (*PPARA*) and  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase-1 (*BDHI*) from Graber *et al.*, (2010) (Table 2).

Real-time PCR analyses were performed using the ABI 7300 real time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). For each gene, an optimum amplification condition (cDNA and primer concentration) was selected to achieve a standardized efficiency among all selected genes. For that, five different concentrations of cDNA were used in duplicate. Each reaction was composed of the best cDNA concentration, 0.1  $\mu\text{M}$  of specific primer sets, 7.5  $\mu\text{L}$  power SYBR® green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and nuclease free water for a final volume of 15  $\mu\text{L}$ . Amplification conditions consisted of 2 minutes at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles (95 °C for 15 sec and 60 °C for 1 min). After each run of qPCR, the melt curve analysis was performed for each sample to confirm that a single specific product was generated.

Each sample was run in duplicate. The gene expression levels were calculated relative to the average mRNA levels of the internal control gene that was expressed more (*GAPDH* or *ACTB*), according of Laarman et al. (2012).

### ***Statistical Analysis***

Data were analyzed using SAS version 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Weekly averages of intake, performance, and body frame development were analyzed using a repeated-measures mixed model (PROC MIXED), including calf as the random component and treatment, week, and their interaction as fixed components. Differences among treatments were assessed using a Tukey adjustment for *P*-values. The mean per period and variables with a single measurement during the study (such as final BW) were analyzed by using a Tukey adjustment for *P*-values. Least squares means for each treatment are reported. The variables BW at birth and total serum protein were considered covariates for intake, performance, body frame development and internal organ weight (% of empty BW). Significance was declared at  $P \leq 0.05$  and tendency  $P > 0.05$  a  $P \leq 0.10$ .

Gene expression data were analyzed using SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). It was done analysis of variance with interaction to delta cycle threshold ( $\Delta$ CT) averages of *ATPA1*, *BHD1*, *HMGCL*, *HMGCS1*, *LDHA*, *PPARA*, *PPARD*, *SLC16A1* (*MTC1*), *SLC16A3* (*MTC4*), *SLC9A1* (*NHE1*), *SLC9A2* (*NHE2*), *SLC9A3* (*NHE3*), *AKT1* and *mTOR* genes. The genes were dependent variable and differences among treatments were assessed using for *P*-values.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### ***Intake, Performance, and Growth***

The volume of milk supplied to calves was restricted to 4 L/d and no difference ( $P > 0.05$ ) was observed in the DM intake of the liquid diet between treatments (Table 3,  $502.4 \pm 13.2$  g DM/d).

The physical form of starter and the dietary inclusion of hay did not influence the consumption of diets, nutrients and water ( $P > 0.05$ ; Table 3). Starter intake (g DM/d)

increased linearly as calves grew older ( $P < 0.01$ ; Table 3), from  $40 \pm 33$  g DM/d at 1 week old to  $722 \pm 282$  g DM/d at the 9<sup>th</sup> wk of age.

The intake of hay in the Ground + 5% Hay treatment was  $17 \pm 17$  g DM/d and increased linearly as calves grew older, with a maximum value of  $42 \pm 17$  g DM/d at the 9<sup>th</sup> wk of age. These values are low probably due to the limitation imposed by the experimental design (forage:starter ratio of 5:95 as fed). Probably the experimental design also limited a possible substitution in the consumption of hay in detriment of the concentrate.

There was no effect of treatments on performance and body development measurements ( $P > 0.05$ ; Table 3). Doubling birth weight at 56 d of age is suggested as a weaning criterion. In our study, the initial and final BW were, on average,  $33.7 \pm 4.4$  and  $69.4 \pm 8.3$  kg, respectively. These values were similar between treatments, demonstrating that the diets supplied in all treatments were adequate to reach this criterion.

#### ***Nutrient Apparent Digestibility, Energy Partitioning, and Nitrogen Balance***

The apparent digestibility of DM, OM, CP and GE and energy partitioning parameters were similar between treatments ( $P > 0.05$ ; Table 4), showing that the inclusion of 5% hay was not able to cause a decrease in the digestibility of the diet. Since the different treatments did not result in differences in nutrient digestibility, it is possible to admit that the pelleted + flocculated corn starter has enough soft consistency to be disintegrated during the chewing, in order to arrive in the rumen in granulometry similar to the ground starter. Castells et al. (2012) also did not observe an effect of the dietary inclusion of different forage sources on the digestibility of DM in calves, reporting values of approximately 80%. Azevedo et al. (2016), evaluating crossbred Holstein x Gyr calves fed a complete diet consisting of 6 L/d of liquid diet with 13.5% of total solids and a commercial starter similar to the used in the present study, verified digestibilities of 85, 88, 85 and 88% for DM, OM, CP and GE, respectively, in a trial performed between 50 and 55 d of age. These values are similar to that verified in the present study.

The energy partitioning parameters were similar between treatments ( $P > 0.05$ ; Table 4). Gross energy (GE) intake (Mcal/day) and fecal energy loss (Mcal/d) did not differ between treatments, which led to similar intakes of DE (Mcal/d) and GE, and metabolizability (ME/GE) ( $P > 0.05$ ), as well as the parameters relative to the N balance. However, the efficiency of nitrogen retention in relation to N ingested in this study was higher to that

observed by Silva et al. (2015), averaging 40%, in crossbred Holstein x Gyr calves fed 4L/d milk and ground starter.

The similarity in feed efficiency observed between all treatments corroborates with the results observed by Coverdale et al. (2004), who reported that there was no difference in performance, DM intake and feed efficiency between calves fed different physical forms of starter. On the other hand, other studies (Franklin et al., 2003; Bach et al., 2007) found higher feed efficiency in calves fed pelleted starter compared to other types of processing. Terré et al. (2015) reported that the dietary inclusion of forage (chopped straw, average intake of 100 g/d, 72% NDF, 8% CP and 92% DM) with a textured starter increased feed efficiency in relation to the starter without straw.

### ***Ruminal pH, Ruminal Ammonia Nitrogen, and Ruminal Organics Acids***

The physical form of starter and the dietary inclusion of 5% hay did not affect the ruminal parameters evaluated, including organic acids ( $P > 0.05$ ; Table 5), with the exception of N-NH<sub>3</sub>. An interaction between week and N-NH<sub>3</sub> concentration was observed, with higher N-NH<sub>3</sub> values at week 8 compared to weeks 4 and 6 for calves fed Ground. For calves fed Pellet + flocculated corn starter, there was no difference between the weeks evaluated; for the treatment Ground + 5% Hay, weeks 4 and 8 were similar and the lowest values were verified at week 6, which also did not differ from week 4.

The mean pH was  $5.3 \pm 0.4$ , not differing between treatments and weeks. This result indicates that the physical form of starter and the inclusion of 5% hay in diet with ground starter was not able to increase salivation or the VFA absorption, leading to this similarity between the treatments for pH values. This pH value is associated with ruminal acidosis (Humer et al., 2017); however, we did not observe signs of bloating, liquid feces and gas bubbles, which are clinical signs of acidosis. According to Suarez-Mena et al. (2015), calves are apparently able to tolerate lower rumen pH values in comparison to adult animals, what might explain the potential adaptation of ruminal epithelium to starter fermentation (Laarman et al., 2012). However, subacute ruminal acidosis in young calf has received scant attention and the severity of rumen acidosis caused by different factors is not yet clear in dairy calves (Khan et al., 2016).



### ***Slaughter, Gastrointestinal Tract, Internal Organs, and Viscera Weight***

The empty BW was similar between treatments ( $P > 0.05$ ; Table 6). These results demonstrate that the intake of up to 5% hay did not affect digestive tract fill and then the performance of animals, corroborating with the results of Castells et al. (2013). No effects of treatments on reticulorumen, omasum, abomasum and liver weights ( $P > 0.05$ ; Table 6) were also observed.

### ***Gastrointestinal Tract Development***

Histological parameters of rumen and omasum were not affected by treatments ( $P > 0.05$ ; Table 6). All treatments used the same starter with the same ingredients, differing only in their physical form, since the ground starter was obtained by grinding of the Pellet + flocculated corn starter. The absence of differences for all the performance and development parameters shown that the physical form of starter (Ground, Pellet + flocculated corn or Ground + 5% Hay) had no effect on the development and performance of calves. These results allow us to hypothesize that the differences frequently pointed out between studies may occur due to the different ingredients and nutritional values of feedstuffs used.

### ***mRNA expression of gene involved in the ruminal metabolism***

The gene expression patterns in the ruminal epithelium, ruminal ventral sac (Laarman et al., 2012; Connor et al., 2013, 2014) or ruminal dorsal sac (Castells et al., 2013), may change during weaning due to rumen fermentation and VFA production, as well as, it might be affected by nutritional plane (Naeem, et al. 2012, 2014). In this study, the mRNA expression level of monocarboxylate transporter 1 (*SLC16A1*) was higher in the dorsal sac than ventral sac (Table 7;  $P = 0.04$ ). To our knowledge up to the writing of this article, most of the studies comparing the expression profile of genes involved in the ruminal development, metabolism and nutritional plane used sample taken out of ruminal ventral sac (Connor et al., 2013; Steele et al., 2013; Ma et al., 2017). However, some researchers worked with tissue that was collected from ruminal dorsal sac (Castells et al., 2013; Bach et al., 2018). Because of that, more studies should be done, in order to compare ruminal activities and absorption capacity between ventral and dorsal sac. The motility of reticulorumen is regulated by system

excitatory and inhibitory inputs to the gastric center in the medulla oblonga and consists of regular contraction sequences (Stevens and Sellers, 1966). The primary contraction cycle involves the ruminal dorsal sac and after that, it start the ruminal ventral sac contraction cycle. Both has ruminal papillae that it is able to of VFA absorption capacity and metabolism.

A tendency to increase the level of mRNA expression to transporter *SLC16A3* (*MTC4*) ( $P = 0.072$ ) and *SLC9A2* (*NHE-2*) ( $P = 0.106$ ) were observed when the calves consumed the Ground treatment instead to Pellet + flocculated corn or Ground + 5% hay treatments (Table 7). In disagreement, Castells et al., (2013) had observed higher ruminal activities and gene expression of the transporter *SLC16A1* (*MTC1*) and *SLC9A1* (*NHE-1*) when was offered chopped alfalfa and oat hay plus starter instead to just starter on the diet. Ma et al. (2017) found higher mRNA expression level to *MTC2* transporter and a tendency to decrease the mRNA expression level to *NHE-4* transporter, when the concentration of NDF was increased on the diet from corn silage and oat hay.

The transporter of the family *NHE* on the cell membrane help maintain the acid-base balance through the exchange of  $\text{Na}^+$  into and  $\text{H}^+$  out of the cell and it was upregulated by an increase in VFA concentration (Sehested et al., 1996; Yang et al., 2012), while the family of the transporters *MTC* are able to transfer of monocarboxylic acid such as lactic acid, pyruvic acid and ketones bodies (Halestrap and Price, 1999; Halestrap and Meredith, 2004). In this study, we did not find difference in the mRNA expression between the dorsal and ventral sac and between the treatments to *ATPA1*, *BHD1*, *HMGCL*, *LDHA* enzymes, *PPARA* and *PPARD* transcription factors, *NHE-1* and *NHE-3* ruminal transporters and *AKT1* and *mTOR* signaling pathway. There was no interaction between the treatments and the dorsal or ventral sac of rumen to all of the genes analyzed (Table 7;  $P > 0.05$ ).

It was observed interaction between the treatments and mRNA expression level of *HMGCS1* gene ( $P = 0.0512$ ), which is involved in the ketogenesis pathway. The same results were found by Naeem et al., (2012), however, the level of expression was higher when the calves were supplemented with high protein in the milk replacer. It is well documented that butyrate and, to a lesser extent, acetate and propionate, are the primary chemical stimulators of rumen development (Mentschel et al., 2001; Ploger et al., 2012). Liu et al., (2016) observed that the 2-methyl butyrate supplementation tended to increase the papillae length and width ( $\mu\text{m}$ ) and the mRNA abundance level of *HMGCS1* from dorsal sac.

The mature rumen can absorb 60 to 80% of all VFAs across the rumen wall and around 75 to 90% of absorbed butyrate is metabolized by the rumen epithelium (Allen, 1997). In this

study, the gene expression analysis occurred to 65 d after birth of calves, which according to Meale et al., (2017) the capacity of rumen metabolize all of the VFA is better than the capacity of nutrient absorption and metabolism before 8 wk of age. Some studies showed that calves were not producing ketones at a rate similar to that of a mature ruminant until 60 d of age and that is only at 40% the ketogenic rate of a mature ruminant at 30 d of age (Meale et al., 2017).

We did not find difference in mRNA expression level when it was comparing the treatments and the mRNA expression of *ATPA1*, *BHD1*, *HMGCL*, *HMGCS1*, *LDHA*, *PPARA*, *PPARD*, *MTC1*, *MTC4*, *NHE1*, *NHE2*, *NHE3*, *AKT1* and *mTOR* genes. Naeem et al., (2012) observed that the protein supplementation on milk replacer down regulated the mRNA abundance of NHE2 transporter in the rumen.

## CONCLUSIONS

The physical form of starter evaluated in this study pellet + flocculated corn, ground, or ground + 5% chopped Tifton hay did not influence intake, performance, feed efficiency, nutrient partitioning and rumen development of dairy calves. There was a tendency to increase mRNA expression level to transporter MTC4 and NHE-2 in the ruminal tissue when the calves were fed ground starter. We found higher mRNA expression of transporter MTC1 in the ruminal dorsal sac then ventral sac, which could indicate more activity in monocarboxylic acid transfer through ruminal epithelium in this compartment of rumen.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Minas Gerais, Brazil), and Embrapa Dairy Cattle (Minas Gerais, Brazil) for financially supporting this research.

## REFERENCES

- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447–1462.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis. Vol. I. 1990. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Argov-Argaman, N., O. Eshel, U. Moallem and H. Lehrer and Z. Uni. 2012. Effects of dietary carbohydrates on rumen epithelial metabolism of nonlactating heifers. *J. Dairy Sci.* 95:3977–3986.
- Azevedo, R. A., F. S. Machado, M. M. Campos, D. R. G. Lopes, S. F. Costa, H. C. Mantovani, F. C. F. Lopes, M. I. Marcondes, L. G. R. Pereira, T. R. Tomich and S. G. Coelho. 2016. The effects of increasing amounts of milk replacer powder added to whole milk on passage rate, nutrient digestibility, ruminal development, and body composition in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 99:8746–8758.
- Bach, A., A. Gimenez, J. L. Juaristi and J. Ahedo. 2007. Effects of physical form of a starter for dairy replacement calves on feed intake and performance. *J. Dairy Sci.* 90: 3028–3033.
- Bach, A., I. Guasch, G. Elcoso, F. Chaucheiras-Durand, M. Castex, F. Fabregas, E. Garcia-Fruitos and A. Aris. 2018. Changes in gene expression in the rumen and colon epithelia during the dry period through lactation of dairy cows and effects of live yeast supplementation. *J. Dairy. Sci.* 101:2631-2640.
- Baldwin, R. L. VI, K. R. McLeod, J. L. Klotz and R. N. Heitmann. 2004. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *J. Dairy Sci.* 87(E. Suppl.):E55–E65.
- Bateman, H. G., T. M. Hill, J. M. Aldrich and R. L. Schlotterbeck. 2009. Effects of corn processing, particle size, and diet form on performance of calves in bedded pens. *J. Dairy Sci.* 92: 782–789.

Beharka, A. A., T. G. Nagajara, L. J. Morrill, G. A. Kennedy and R. D Klemm. 1998. Effect of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 81:1946-1955.

Bergman, E. N., and J. E. Wolff. 1971. Metabolism of volatile fatty acids by liver and portal-drained viscera in sheep. *Am. J. Physiol.* 221:586–592.

Bergman, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70:567–590.

Bull, L.S., L. J. Bush, J. D. Friend, B. Harris Jr and E. W. Jones. 1965. Incidence of ruminal parakeratosis in calves fed different rations and its relation to volatile fatty acid absorption. *J. Dairy Sci.* 48: 1459–1466.

Castells, L., A. Bach, A; G. Araujo, C. Montoro and M. Terré. 2012. Effect of different forage sources on performance and feeding behavior of Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 95:286–293.

Castells, L., A. Bach, A. Aris and M. Terré. 2013. Effects of forage provision to young calves on rumen fermentation and development of the gastrointestinal tract. *J. Dairy Sci.* 96:5226–5236.

Connor, E. E., R. L. Baldwin Vi, C. Li, R. W. Li and H. Chung. 2013. Gene expression in bovine rumen epithelium during weaning identifies molecular regulators of rumen development and growth. *Funct. Integr. Genomics.* 13:133–142.

Connor, E.E., R. L. Baldwin, M. P. Walker, S. E. Ellis, C. Li, S. Kahl, H. Chung and W. Li. 2014. Transcriptional regulators transforming growth factor- $\beta$ 1 and estrogen-related receptor- $\alpha$  identified as putative mediators of calf rumen epithelial tissue development and function during weaning. *J. Dairy. Sci.*97:4193-4207.

Costa, S. F., M. N. Pereira, L. Q. Melo, M. V. Caliari and M. L. Chaves. 2008. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa rumenal e epiderme de bezerros. II. Aspectos ultra-estruturais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60, n.1:10-18.

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

Drackley, J. K. 2008. Calf nutrition from birth to breeding. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 24:55-86.

Flatt, W. P., R. G. Warner and J. K. Loosli. 1958. Influence of purified materials on the development of the ruminant stomach. *J. Dairy Sci.* 41:1593-1600.

Franklin, S. T., D. M. Amaral-Phillips, J. A. Jackson and A. A. Campbell. 2003. Health and Performance of Holstein Calves that Suckled or Were Hand-Fed Colostrum and Were Fed One of Three Physical Forms of Starter. *J. Dairy Sci.* 86:2145–2153.

Graber, M., S. Kohler, T. Kaufmann, M. G. Doherr, R. M. Bruckmaier, and H. A. Van Dorland. 2010. A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. *J. Dairy Sci.* 93:5200-5215.

Halestrap, A. P. and N. T. Price. 1999. The proton linked monocarboxylate transporter (MTC) family: structure, function and regulation. *Bioche. J.* 343:281-299.

Halestrap, A. P. and D. Meredith. 2004. The SLC16 gene family from monocarboxylate transporters (MTCs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers. Arch.* 5:619-628.

Hammon, G., S. N. Sauter, M. Reist, Y. Zbinden, C. Philipona, C. Morel, and J. W. Blum. 2003. Dexamethasone and colostrums feeding affect hepatic gluconeogenic enzymes differently in neonatal calves. *J. Anim. Sci.* 81:3095–3106.

Hinders, R. G. and F. G. Owen. 1968. Ruminant and post-ruminant digestion of alfalfa fed as pellets or long hay. *J. Dairy Sci.* 51:1253–1257.

Humer, E. R. M. Petri, J. R. Aschenbach, B. J. Bradford, G. B. Penner, M. Tafaj, K.-H. Südekum, and Q. Zebeli. 2017. Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 101: 872-888.

Khan, M. A., A. Bach, D. M. Weary, and M. A. G. Von Keyserlingk. 2016. Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 99:885–902.

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

Khan, M. A., D. M. Weary, D. M. Vieira, and M. A. G. von Keyserlingk. 2012. Postweaning performance of heifers fed starter with and without hay during the milk-feeding period. *J. Dairy Sci.* 95:3970–3976.

Laarman, A. H., A. L. Ruiz-Sanchez, T. Sugino, L. L. Guan, and M. Oba. 2012. Effects of feeding a calf starter on molecular adaptations in the ruminal epithelium and liver of Holstein dairy calves. *J. Dairy Sci.* 95:2585–2594.

Lesmeister, K. E. and A. J. Heinrichs. 2004. Effects of Corn Processing on Growth Characteristics, Rumen Development, and Rumen Parameters in Neonatal Dairy Calves. *J. Dairy Sci.* 87:3439–3450.

Liu, Q., C. Wang, Y. L. Zhang, C. X. Pei, S. L. Zhang, H. Q. Li, G. Guo, Y. L. Huo, W. Z. Yang and H. Wang. 2016. Effects of 2-methylbutyrate supplementation growth performance and ruminal development in pre- and post-weaned dairy calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 216:129–137.

Lodge-Ivey, S. L., J. Browne-Silva and M. B. Horvath. 2009. Technical note: Bacterial diversity and fermentation end products in rumen fluid samples collected via oral lavage or rumen cannula. *J. Anim. Sci.* 87: 2333-2337.

Luna, L.G. 1968. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* 3ed. McGraw Hills Book, New York, NY. 258p.

Ma, L., M. Zhao, L. S. Zhao, J. C. Xu, J. J. Lor and D. P. Bu. 2017. Effects of dietary neutral detergent fiber and starch ratio on rumen epithelial cell morphological structure and gene expression in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 100:3705-3712.

Malhi, M., H. Gui, L. Yao, J. R. Aschenbach, G. Gäbel and Z. Shen. 2013. Increased papillae growth and enhanced short-chain fatty acid absorption in the rumen of goats are associated with transient increases in cyclin D1 expression after ruminal butyrate infusion. *J. Dairy Sci.* 96:7603–7616.

Meale, S. J., F. Chauchevras-Durand, H. Berends, L. L. Guan and M. A. Steele. 2017. From pre- to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract. *J. Dairy Sci.* 100:5984–5995.

Mentschel, J., R. Leiser, C. Mulling, C. Pfarrer and R. Clauss. 2001. Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. *Arc. Anim. Nutri.* 55:85-102.

Naeem, A., J. K. Drackley, J. Stamey and J. J. Looor. 2012. Role of metabolic and cellular proliferation genes in ruminal development in response to enhanced plane of nutrition in neonatal Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 95:1807–1820.



Naeem, A., J. K. Drackey, J. Stamey, R. Lanier, E. Everts, S. L. Rodriguez-Zas and J. J. Looor. 2014. Ruminal epithelium transcriptome dynamics in response to plane of nutrition and age in young Holstein calves. *Funct. Integr. Genomics* 14:261–273. <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-013-0351-2>.

NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.

Pazoki, A., G. R. Ghorbani, S. Kargar, A. Sadeghi-Sefidmazgi, M. H. Ghaffari and J. K. Drackley. 2017. Growth performance, nutrient digestibility, ruminal fermentation, and rumen development of calves during transition from liquid to solid feed: Effects of physical form of starter feed and forage provision. *Anim. Feed Sci. Technol.* 234:173-185.

Penner, G. B., M. Tanighchi, L. L. Guan, K. A. Beauchemin, and M. Oba. 2009. Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue. *J. Dairy Sci.* 92:2767–2781.

Plöger S., F. Stumpff, G. Penner, J. Schulzle, G. Gabel, H. Martens, Z. Shen, Z. Gunzel and J. Aschenbach. 2012. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1258:52-59.

Sehested, J., L. Diernaes, P. D. Moller and E. Skadhauge. 1996. Transport of sodium across the isolated bovine rumen epithelium: Interaction with short-chain fatty acids, chloride and bicarbonate. *Exp. Physiol.* 81:79–94.

Shen, Z., H. M. Seyfert, B. Lohrke, F. schneider, R. Zitnan, A. Chudy, S. Kuhla, H. M. Hammon, J. W. Blum, H. Martens, H. Hagemeister and J. Voight. 2004. An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats. *J. Nutr.* 134:11–17.

- Silva, A. L., M. I. Marcondes, E. Detmann, F. S. Machado, S. C. Valadares Filho, A. S. Trece, and J. Dijkstra. 2015. Effects of raw milk and starter feed on intake and body composition of Holstein  $\times$  Gyr male calves up to 64 days of age. *J. Dairy Sci.* 98:2641–2649.
- Steele, M. A., O. Zahal, S. L. Greenwood, C. Matthews and B. W. McBride. 2013. Technical note: Use of laser capture microdissection for the localization of tissue-specific global gene expression in rumen papillae. *J. Dairy Sci.* 96:7748–7752.
- Stevens, C. E. and B. K. Stettler. 1966. Factors affecting the transport of volatile fatty acid across rumen epithelium. *Am. J. Physiol.* 210:365-372.
- Suarez-Mena, F. X., A. J. Heinrichs, C. M. Jones, T. M. Hill, and J. D. Quigley. 2015. Digestive development in neonatal dairy calves with either whole or ground oats in the calf starter. *J. Dairy Sci.* 98:3417–3431.
- Terré, M., E. Pedrals, A. Dalmau, and A. Bach. 2013. What do preweaned and weaned calves need in the diet: A high fiber content or a forage source? *J. Dairy Sci.* 96:5217–5225.
- Terré, M.; S. L., L. Castells, A. M. Khan and A. Bach. 2015. Interaction between the physical form of the starter feed and straw provision on growth performance of Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 98:1101–1109.
- Van Soest, P.J., J. B. Robertson and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Yang, W., Z. Shen, and H. Martens. 2012. An energy-rich diet enhances expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 and 3 messenger RNA in rumen epithelium of goat. *J. Anim. Sci.* 90:307–317.
- Zhongyan, L., L. Yao, Z. Jiang, Jörg, R. Aschenbach, H. Martens, and Z. Shen. 2016. Acidic pH and short-chain fatty acids activate Na<sup>+</sup> transport but differentially modulate expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms 1, 2, and 3 in omasal epithelium. *J. Dairy Sci.* 99:733–745.

**Table 1.** Nutrient composition (DM basis, % unless otherwise noted) of whole milk, starters and hay

Item	Whole milk	Ground <sup>1</sup>	Pellet + flocculated corn <sup>1</sup>	Hay
DM <sup>2</sup>	12.6	86.3	85.8	84.4
CP	23.5	22.1	21.6	10.6
Ether extract	33.6	2.8	2.7	1.8
Ash	7.4	11.7	12.4	7.7
Lactose <sup>3</sup>	35.4	-	-	-
NDF	-	21.1	21.9	72.9
ADF	-	9.5	10.0	33.4

<sup>1</sup>Basic composition: calcitic limestone, sodium chloride, corn gluten meal 60%, soybean meal, wheat bran, dicalcium phosphate, calcium iodate, molasses, steam-flacked corn, ground shelled corn, toasted full-fat soybeans, vitamin A, vitamin D3, vitamin E, cobalt sulphate, copper sulphate, ferrous sulphate, manganese sulphate, sodium and calcium aluminosilicate, zinc sulphate, probiotic additive (*Saccharomyces cerevisiae*) and monensin sodium. Possible substitutes: rice bran, citrus pulp, ground whole grain sorghum, corn gluten meal 21%, sunflower meal, wheat middlings and defatted corn germ meal.

<sup>2</sup>As fed basis.

<sup>3</sup>Lactose % of treatments = 100 – CP% - EE% - Ash% - 2 (Drackley, 2008).

**Table 2.** Sequence of primers used in RT-PCR reactions, the number of GenBank Accession/EMBL, and the number of base pairs of PCR products

Gene		Sequence <sup>5'</sup> - <sup>3'</sup>	Accession no. GenBank/ EMBL	Product size, pb
<i>GAPDH</i>	F	GTCTTCACTACCATGGAGAAGG	U85042	197
	R	TCATGGATGACCTTGGCCAG		
<i>ACTB</i>	F	CAGGATGCAGAAAGAGATCACTGC	NM_173979.3	222
	R	AGGGTGTAACGCAGCTAACAG		
<i>PPARA</i>	F	AGGGCTGCAAGGGTTTCTTTAG	NM_001034036	363
	R	TGACGAAAGGCGGGTTGTTGTTG		
<i>PPARD</i>	F	CAAAGAGGCTGACGGGAACT	NM_001083636.1	75
	R	CCGGTCATAGCTCTGGCATC		
<i>BDHI</i>	F	CCAGGTTATCGCGAACGCAC	NM_001034600.2	103
	R	CAAAAGGCAGAATGGTCAGGC		
<i>HMGCS1</i>	F	AGTGAACTGGCACAGAGCA	NM_001206578.1	133
	R	TCAGGATGTTAGTTCAGGAGGG		
<i>HMGCL</i>	F	TACGTCTCCTGTGTGCTTGG	NM_001075132.1	72
	R	CTTGGTGACCTCAGCGACTT		
<i>LDHA</i>	F	CATTCATGGGCAGGTAGGACA	NM_174099.2	70
	R	CAGCTGATCCTTGAGAGTTGC		
<i>mTOR</i>	F	CCCCAGCTGATTCCACACAT	XM_001788228.1	73
	R	ACTTGATGGAGACGATGCGG		
<i>AKT1</i>	R	CTGCACAAGCGAGGTGAGTA	NM_173986.2	134
	F	GAGAAGTTGTTGAGGGGCGA		
<i>ATPIA1</i>	F	ATGCCGAAGTGCTGGAATCA	NM_001076798.1	60
	R	TTGGCAGTGATGGGATGGTC		
<i>SLC16A1</i> (MTC1)	F	GACGAGCGAACTAGGCAGC	NM_001037319	121
	R	CAAGTATCGTTATACGCGGCTC		
<i>SLC16A3</i> (MTC4)	F	GGCTGGGATGTACATGTGGT	NM_001109980.1	68
	R	ACAAAAGCAGGCAGATCATTTTC		
<i>SLC9A1</i> (NHE-1)	F	CTGGTGGAAGTGGAGGCAT	NM_174833.2	196
	R	TGTGTCTGTTGTAGGACCGC		
<i>SLC9A2</i> (NHE-2)	F	CAGATCCGTCAGCGAACCTT	XM_604493.9	126
	R	GCTGTCCTCCGAATGCTCT		
<i>SLC9A3</i> (NHE-3)	F	TCTCCGTGTACAGGGCCATA	AJ131764.1	104
	R	GCCATAGCACATGACCACCT		

**Table 2.** Sequence of primers used in RT-PCR reactions, the number of GenBank Accession/EMBL, and the number of base pairs of PCR products

EMBL = European Molecular Biology Laboratory; F=Forward; R=Reverse; *GAPDH* = Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase; *ACTB* =  $\beta$ -actin; *PPARA* = peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *PPARD* = peroxisome proliferator-activated receptor delta; *BDH1* =  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase-1; *BDH2* =  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase-2; *HMGCS1* = 3-Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, isoform I; *HMGCL*= 3-Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase; *LDHA* = lactate dehydrogenase; *mTOR* = Mammalian Target of Rapamycin; *AKT1* = v-akt murine thymoma viral oncogene 1; *ATPIA1* = NA<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase; *SLC16A1* = Monocarboxylate transporter, isoform I (MTC1); *SLC16A3* = Monocarboxylate transporter, isoform III (MTC4); *SLC9A1* = Sodium/proton exchanger, isoform 1 (NHE-1); *SLC9A2* = Sodium/proton exchanger, isoform 2 (NHE-2); *SLC9A3* = Sodium/proton exchanger, isoform 3 (NHE-3).

**Table 3.** Intake, performance, feed efficiency, and body measurements development of calves fed different diet solids during the preweaning period

Item	Treatment			SEM	P-value		
	Ground (n = 12)	Pellet + flocculated corn (n = 13)	Ground + 5% Hay (n = 13)		Treatment	Week	Treatment x week
<b>Intake</b>							
Whole milk (g of DM/d)	503	501	502	0.70	0.44	0.01	0.99
Starter (g of DM/d)	314	326	365	16.7	0.62	0.01	0.99
Hay (g of DM/d)	-	-	17	-	-	-	-
Total DM (g of DM/d)	818	827	885	17.1	0.42	0.01	0.85
Total OM (g of DM/d)	711	709	762	12.9	0.34	0.01	0.78
Total NDF(g of DM/d)	141	135	162	7.4	0.54	0.01	0.92
Water (kg/d)	2.9	2.5	2.9	0.10	0.72	0.01	0.99
<b>Performance</b>							
Birth BW (kg)	33.0	34.3	33.9	0.23	0.06	-	-
Final BW (kg)	68.1	68.7	71.3	1.35	0.54	-	-
ADG (g/d)	531	541	606	18.3	0.25	0.01	0.83
Feed efficiency	0.64	0.64	0.67	0.02	0.78	0.01	0.83
<b>Body measurements (cm)</b>							
Withers height	81.1	81.2	80.6	0.27	0.66	0.01	0.90
Heart girth	82.8	82.5	82.0	0.38	0.76	0.01	0.97
Hip height	84.9	84.7	84.5	0.27	0.88	0.01	0.71
Hip width	22.5	22.3	22.3	0.10	0.73	0.01	0.83

**Table 4.** Nutrient apparent digestibility of calves fed different diet solids during the preweaning period

Item	Treatment			SEM	P-value
	Ground (n = 6)	Pellet + flocculated corn (n = 6)	Ground + 5% Hay (n = 6)		
Nutrient apparent digestibility					
Dry matter (%)	85.4	83.0	83.4	0.80	0.45
Organic matter (%)	89.3	87.2	87.7	0.47	0.17
Crude protein (%)	88.5	87.3	88.5	0.52	0.15
Gross energy (%)	88.5	86.0	86.8	0.48	0.50
Energy partition					
Gross energy intake (Mcal/d)	5.5	5.2	5.8	0.27	0.73
Fecal energy (Mcal/d)	0.6	0.7	0.8	0.04	0.47
Fecal energy (% gross energy intake)	11.5	14.0	13.2	0.52	0.15
Digestible energy intake (Mcal/d)	4.8	4.5	5.0	0.23	0.70
Urine energy (Mcal/d)	0.08	0.07	0.07	0.005	0.72
Urine energy (% gross energy intake)	1.6	1.5	1.3	0.10	0.44
Metabolizable energy intake (Mcal/d)	4.8	4.4	5.0	0.23	0.69
Metabolizable energy (Mcal/kg DM)	4.3	4.1	4.2	0.04	0.37
Metabolizable energy/Gross energy	1.0	1.0	1.0	0.01	0.46
Metabolizability (Metabolizable energy/Gross energy)	0.8	0.8	0.8	0.01	0.20
Nitrogen balance					
N intake (g/d)	41.5	40.0	43.8	2.39	0.81
Urine output. kg/d	10.1	12.1	11.0	0.89	0.67
N fecal output. g/d	4.7	5.0	5.1	0.29	0.89
N Retention (g/d)	26.7	22.8	27.8	1.71	0.48
N efficiency <sup>1</sup> (%)	63.7	56.7	63.7	1.76	0.17

<sup>1</sup>N efficiency % = (N retention/N intake) × 100.

**Table 5.** pH, ruminal ammonia nitrogen (N-NH<sub>3</sub>), and organic acids in the rumen of calves fed different diet solids during the preweaning period

Item	Treatment			Week			SEM	P-value		
	Ground (n = 6)	Pellet + flocculated corn (n = 6)	Ground + 5% Hay (n = 7)	4wk	6wk	8wk		Treat	Week	Treatment x week
pH	5.3	5.3	5.3	5.4	5.3	5.3	0.04	0.87	0.54	0.18
N-NH <sub>3</sub> (mg/dL)	20.3	27.6	19.1	20.6	21.6	24.9	0.95	0.01	0.04	0.02
Acetate (%)	35.0	41.1	41.7	35.9	39.0	42.8	1.53	0.36	0.07	0.77
Propionate (%)	38.2	42.8	47.9	37.1b	43.3ab	48.6a	1.88	0.28	0.01	0.67
Butyrate (%)	5.0	5.0	4.4	5.0	4.9	4.4	0.35	0.81	0.82	0.80
Acetate-to-propionate ratio	1.01	1.14	0.99	1.17a	1.05ab	1.00b	0.05	0.74	0.05	0.13
Total (mmol/L)	111.6	132.4	124.3	114.4b	116.4b	137.5a	4.24	0.15	0.03	0.52



**Table 6.** Weight (% of empty BW) of internal organs and viscera, and gastrointestinal tract development of calves of calves fed different diet solids during the preweaning period

Item	Treatment			SEM	<i>P</i> -value Treatment
	Ground (n = 6)	Pellet + flocculated corn (n = 6)	Ground + 5% Hay (n = 7)		
Final BW (kg)	67.2	67.9	71.4	1.7	0.16
Empty BW (kg)	65.6	64.5	73.7	1.85	0.24
Organ weight (% of empty BW)					
Reticulo-rumen	1.8	1.7	1.8	0.08	0.12
Omasum	0.3	0.3	0.3	0.02	0.47
Abomasum	0.6	0.5	0.6	0.02	0.18
Liver	2.2	2.0	2.1	0.05	0.37
Height (mm)					
Ruminal papillae	1.53	1.49	1.52	0.03	0.92
Omasum papillae	0.74	0.70	0.72	0.03	0.93
Area (mm <sup>2</sup> )					
Ruminal papillae	2.16	2.07	1.98	0.09	0.74
Omasum papillae	0.76	0.98	0.88	0.07	0.53
Mitotic index					
Rumen	0.89	0.86	0.74	0.08	0.80
Omasum	1.07	1.15	0.76	0.08	0.10

**Table 7.** Effects of the treatments about mRNA expression level of enzymes *ATPA1*, *BHD1*, *HMGCL*, *HMGCS1*, *LDHA*, transcription factors *PPARA* and *PPARD*, ruminal transporters *MTC1*, *MTC4*, *NHE1*, *NHE2* and *NHE3* and signaling pathway *AKT1* and *mTOR* in the ruminal epithelium

Genes	Treatment			SEM	P-Value <sup>2</sup>		
	Ground (n = 6)	Pellet + flocculated corn (n = 6)	Ground + 5% hay (n = 7)		Treatment	Dorsal or Ventral Sac (Dvsac)	T*DV <sub>sac</sub>
Delta cycle threshold ( $\Delta$ CT) <sup>1</sup>							
<i>ATPA1</i>	5.76	5.42	5.08	1.70	0.6513	0.4221	0.5356
<i>BDHI</i>	6.92	6.26	6.18	1.54	0.4874	0.4083	0.1643
<i>HMGCL</i>	4.75	4.30	4.00	1.29	0.4174	0.2139	0.9163
<i>HMGCS1</i>	10.58	8.45	8.92	2.53	0.1310	0.5906	0.4245
<i>LHDA</i>	10.82	10.01	10.05	2.14	0.6137	0.2971	0.3953
<i>PPARA</i>	12.47	11.48	11.38	2.80	0.6151	0.7770	0.1428
<i>PPARD</i>	9.33	8.32	8.42	2.04	0.4576	0.8412	0.2544
<i>MTC1</i>	9.24	8.62	8.69	1.65	0.6324	0.0405	0.3844
<i>MTC4</i>	11.64	12.70	10.89	2.40	0.1893	0.1815	0.2850
<i>NHE1</i>	8.37	8.30	8.47	1.87	0.9736	0.6044	0.9178
<i>NHE2</i>	7.10	5.69	5.60	1.76	0.1062	0.3081	0.6087
<i>NHE3</i>	9.05	7.86	7.85	2.24	0.3732	0.6430	0.6899
<i>AKT1</i>	10.46	9.93	9.45	1.79	0.4299	0.9664	0.2644
<i>mTOR</i>	9.00	9.39	9.72	2.42	0.7879	0.8032	0.3692

<sup>1</sup>Means of the delta cycle threshold ( $\Delta$ CT) values

<sup>2</sup>Probabilities corresponding to the main effects of treatments and dorsal or ventral sac of rumen and interaction of between treatments and dorsal or ventral sac (T\*DV<sub>sac</sub>).