II Congresso Internacional das **Ciências Agrárias** COINTER - PDVAgro 2017

IMUNOHISTOQUÍMICA PARA QUIMOSINA E PEPSINOGENO NO ABOMASO DE BEZERROS RECEBENDO LEITE EM PÓ E SORO DE QUEIJO EM PÓ RECONSTITUÍDOS

Apresentação: Pôster

Maria Vivianne Freitas Gomes de Miranda¹; Tiago da Silva Teófilo²; Ana Paula Pinheiro de Assis³; José Domingues Fontenele Neto⁴; Patrícia de Oliveira Lima⁵

Introdução

Os principais sítios de digestão dos nutrientes contidos no sucedâneo ou leite consumido pelo bezerro, no primeiro período de vida, são o abomaso e o intestino delgado. O abomaso é o estômago verdadeiro, glandular e com grande capacidade de digestão enzimática de nutrientes, as secreções mais importantes do abomaso são o ácido clorídrico (HCl), a pró-pepsina e a pró-quimosina (Huber, 1969). As enzimas digestivas presentes no abomaso ao nascimento e durante a fase de lactação permitem uma digestão altamente eficiente de proteínas do leite.

A caseína, é a principal proteína do leite integral e possui a propriedade única de coagular-se no abomaso na presença da quimosina, a qual se ativa no ambiente ácido do recém-nascido separando o leite em coágulos de proteína e soro (Lopes et al., 2015). Essa enzima é a encarregada da formação do coágulo de caseína que será digerido lenta e parcialmente no abomaso pela enzima pepsina, a qual é secretada na sua forma inativa (pepsinogênio) e ativada em meio ácido (Drackley, 2008).

A secreção de quimosina (EC 3.4.23.4), também chamada renina, e pepsinogênio (EC 3.4.23.1) é originária das células zimogênicas (principais), presentes na mucosa gástrica do abomaso (Liebman & Samloff, 1979).

O desempenho do animal depende intimamente de sua fisiologia, assim, para entender os mecanismos que norteiam o desenvolvimento físico se faz necessário um estudo mais aprofundando nos sistemas que interagem na dinâmica celular. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho testar

¹ Doutora em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido, mviviannefreitas@hotmail.com

² Doutorando em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido, tiago.teofilo@ufersa.edu.br

³ Doutora em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido, pinheir paula87@hotmail.com

⁴ Docente na Universidade Federal Rural do Semiárido, pattlima@ufersa.edu.br

⁵ Docente na Universidade Federal Rural do Semiárido, fontenele@ufersa.edu.br

a influência da utilização do soro de queijo *in natura* associado ao leite em pó nas células produtoras de quimosina (renina) e pepsina no abomaso de bezerros.

Fundamentação Teórica

A atividade da renina diminui de acordo com o aumento da idade, enquanto a atividade da pepsina tende a crescer (Guilloteau et. al, 1993). Pois, à medida que os animais crescem, diminuem o consumo de leite integral passando a consumir volumoso e concentrado, eliminando dessa forma a presença da caseína na dieta, que é o principal estímulo para produção de renina.

Garnot et. al, (1977), utilizando bezerros fistulados, estudaram a influência da idade, o tipo de proteína dietética e o desmame na secreção de quimosina e pepsina pelo abomaso. O abomaso sintetizou tanto a quimosina quanto a pepsina quando os animais foram alimentados com leite, no entanto, a secreção de quimosina pareceu ser independente da idade dos animais, enquanto um aumento lento na secreção de pepsina foi observado à medida que os bezerros envelhecem. Nesse mesmo experimento, eles constataram que quando os animais recebem novamente alimento líquido contendo caseína, a atividade da quimosina aumenta. Porém, não apresentam os mesmos níveis encontrados em animais antes da desmama.

Andren et al., (1981) verificaram que em bovinos a pró-quimosina, o pró-pepsinogênio e a pró-gastrina foram sintetizados em diferentes idades e padrões nas regiões das glândulas do abomaso. E isso pode ser explicado, pelo desenvolvimento do animal de um bezerro alimentado com leite para um ruminante adulto. A quimosina, com alta atividade de coagulação do leite e baixa atividade proteolítica, é apropriada para bezerros jovens, pois a Imunoglobulina G no colostro não é degradada pela quimosina podendo ser absorvida no intestino. Quase todas as células nas glândulas fúndicas continuam a produzir pró-quimosina, sendo o bezerro alimentado com leite. Quando o bezerro é desmamado, apenas as células na parte média da glândula fúndica continuam a produzir quimosina. À medida que o pepsinogênio é produzido pelas mesmas células que a quimosina, pode-se esperar que a produção de pepsinogênio seja suprimida pela produção de quimosina, se o bezerro for alimentado com leite. No entanto, quando o bezerro é desmamado e começa a comer capim, feno e cereais, ele precisa de uma protease mais ácida com uma alta atividade proteolítica geral. O bezerro pode então aumentar rapidamente a produção de pepsinogênio em todas as células das glândulas fúndicas.

Metodologia

Foram utilizados 24 bezerros machos com idade 5 ± 3 dias, mestiços de Holandês x SPRD, com peso médio inicial de 35 kg. Os bezerros receberam colostro integral até o terceiro dia de vida, e a partir do 4^a dia foram aleitados com leite integral na quantidade de quatro litros, fornecido duas vezes ao dia (manhã e tarde) até o décimo dia. Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com 4 (quatro) tratamentos e 6 (duas repetições): LI: leite integral (controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó. Além disso, tinham acesso ao concentrado farelado, feno de Tifton (*Cynodon sp.*) e água *ad libitum*, desde o nascimento até o abate. O período experimental foi realizado durante as seis semanas após o período de adaptação, totalizando 60 dias. Ao abate, foram retirados fragmentos de 1cm² (um centímetro quadrado) de abomaso dos bezerros, que foram armazenados em formol por 24 horas e, após esse período, foram realizadas as práticas rotineiras laboratoriais para montagem dos blocos de parafina.

As lâminas foram montadas com dois cortes sequenciais de 5,0µm de espessura, e incubados com o anticorpo primário anti-próquimosina e anti-pepsinogênio (1:40; Andrén, 1981) a 4°C em câmara úmida, durante 18 horas. Os cortes foram lavados com TTBS, e incubados com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho na diluição de 1:200 (Andrén, 1981), em câmara úmida a 25°C por 2 horas. Os cortes foram lavados com solução salina de tampão tris 0,1M pH 7,2 (TBS) e incubados com o kit ABC (estreptoavidina-biotina) em câmara úmida a 25°C por 1 hora.

Os ácinos marcados foram visualizados como pontos amarronzados, e sua contagem foi realizada em um microscópio óptico (Olympus BX51, Olympus optical Co., Alemanha) em 10 campos aleatórios sob aumento de 40x. Em cada campo foram contadas todas as células, não marcadas e marcadas, depois retirou-se a média percentual. Os dados foram agrupados por anticorpo, de acordo com o tratamento, e analisados estatisticamente pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

Resultados e Discussões

Os percentuais de ácinos contendo células imunorreativas aos anticorpos quimosina e pepsinogênio apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$) entre as dietas testadas (Tabela 1). Sendo os bezerros que receberam a dieta 100% leite integral, os que apresentaram média percentual de marcação para quimosina superior aos animais que consumiram a dieta 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó. Demonstrando que à medida que se reduz a participação do leite na dieta, reduz-se a síntese de quimosina pelas células zimogênicas nas glândulas gástricas do abomaso.

Tabela 1 – Percentuais de ácinos contendo células imunorreativas à quimosina e ao pepsinogênio em bezerros alimentados com dietas contendo soro de queijo associado ao leite em pó.

Variáveis	Dietas Líquidas				CV (%)	P
	LI	LP	LPS1	LPS2		
Quimosina (%)	95,11 ^a	89,59 ^{ab}	90,75 ^{ab}	88,25 ^b	6,94	0,03
Pepsinogênio (%)	72,17 ^a	65,17 ^a	80,02 ^a	85,21 ^a	23,98	0,26

Médias com letras diferentes nas linhas são significativas ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey; LI: leite integral (controle); LP: leite em pó; LPS1: 80% leite em pó + 20% de soro de queijo em pó; LPS2: 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó.

Os bezerros do presente estudo foram abatidos aos 60 dias de vida, nessa faixa etária comportam-se fisiologicamente como animais monogástricos. No abomaso há a formação do coágulo resultante da coagulação da principal proteína do leite, a caseína, sob a ação das enzimas, renina (quimosina) e pepsina (Wattiaux, 2003). O soro de queijo possui apenas a parte aquosa do leite que permanece depois da extração da proteína caseína, logo os animais que recebiam a dieta 100% leite integral, tinham acesso a uma quantidade maior de caseína, comparado aqueles animais que recebiam a dieta LPS2 (60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó).

Os animais da dieta leite integral obtiveram um percentual de células produtoras de quimosina superior aos animais da dieta que possuía 60% leite em pó + 40% de soro de queijo em pó, pois esses tinham acesso a uma maior quantidade de caseína na dieta, dessa forma, a presença da caseína provavelmente estimularia a maior síntese de quimosina pelas células zimogênicas da base das glândulas gástricas, essa maior produção de quimosina pode ser justificada, segundo Andrén et al (1981), pelo fato de que a quimosina, em contraste com a pepsina, tem uma atividade proteolítica muito específica e cataliza, principalmente, a hidrólise de uma ligação peptídica específica em K-caseína, para que assim haja o processo de coagulação do leite.

A quimosina possui uma atividade ótima em pH de 4,2 e 3,8, ela age para iniciar a coagulação do leite pela clivagem de k-caseína entre a ligação Phe 105 e Met 106 (Foltman et al. 1987). O leite bovino contém dois grupos de proteínas diferentes, as paracaseínas (fosfoproteínas insolúveis a pH 4,6), e as proteínas do soro (não caseínicas) (Mohanty et al. 1999). Durante a ação da quimosina no sistema de caseinato, a principal fração atacada é a k-caseína enquanto as outras frações de caseína permanecem inalteradas, a ação da quimosina depende da adição de cálcio no sistema, quando os íons de cálcio estão presentes, a fração de caseinato sensível ao cálcio junto com a fração insolúvel de

para-k-caseína formam um coágulo (Mathur et al. 1983). Logo, quanto maior o percentual de caseína na dieta, maior a produção de quimosina para hidrólise da K-caseína.

As células zimogênicas parecem sintetizar pró-quimosina ou pró-pepsinogênio de acordo com as proteínas que compõem o plano alimentar do animal, embora alguns autores afirmem que a idade pode interferir nesse processo de síntese, pesquisas científicas apontam que essa diferenciação está ligada a fatores inerentes a dieta administrada, o que pode ser comprovado pelo aumento da produção de quimosina em animais que haviam sido previamente desmamados e depois retomaram a produção dessa enzima com a inclusão do leite integral na dieta novamente.

Conclusões

A produção de quimosina nos animais que receberam as dietas contendo soro de queijo em pó foi inferior aquelas encontradas nos animais submetidos a dietas com leite integral.

Referências

- ANDREN, A., BJÖRCK, L. & CLAESSENS, O. (1981). Effect of supplementary milk-feeding on content of chymosin in the abomasal mucosa of concentrate-fed calves. **Swed. J. agric. Res.** 11, 11-15.
- DRACKLEY, James K. Calf nutrition from birth to breeding. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 55-86, 2008.
- FOLTMAN B. General and molecular aspects of rennets. In: Fox PF, editor. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 1. London: **Elsevier**, 1987. pp. 37–68.
- GARNOT, P., et al. "Influence of age, dietary protein and weaning on calf abomasal enzymic secretion." **Journal of Dairy Research** 44.01 (1977): 9-23.
- GUJLLOTEAU, P.; CORRIG, T.; GARNOT, P.; MARTIN, P; TOULLEC, R. & DURAND, G. Effects of age and weaning on enzymes activities at abomasum and pancreas of the lamb. **J. Dairy Sci.**, 66:2373-85; 1993.
- HUBER, J.T. Development of the digestive and metabolic apparatus of the calf. 1. **J. Dairy Sci.**, 52:1303-15, 1969.
- LOPES, K. T. de L. et al. Perfil bioquímico sérico de bezerros de origem leiteira aleitados com dietas líquidas alternativas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 27-32, 2015.
- MATHUR MP, DUTTA RD. Rennet from living calves. **Dairy Guide** 1983;5(12):39–47.
- MOHANTY, A. K., et al. "Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture." **Biotechnology Advances** 17.2 (1999): 205-217.
- WATTIAX, M.A. **Criação de novilhas do nascimento a desmama**. Instituto Badcock para pesquisa e desenvolvimento da pecuária leiteira internacional. University of Wisconsin-Madison, 2003.