

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ELEMENTOS PREDITIVOS E MORFOLÓGICOS DA
UROLITÍASE OBSTRUTIVA EM OVINOS SANTA INÊS**

Thiago Arcoverde Maciel

Médico Veterinário

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ELEMENTOS PREDITIVOS E MORFOLÓGICOS DA
UROLITÍASE OBSTRUTIVA EM OVINOS SANTA INÊS**

Discente: Thiago Arcoverde Maciel

Orientadora: Profa. Dra. Lizandra Amoroso

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área: Patologia Animal.

M152e Maciel, Thiago Arcoverde
Elementos preditivos e morfológicos da urolitíase obstrutiva em ovinos Santa Inês / Thiago Arcoverde Maciel. -- Jaboticabal, 2019
89 f. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Lizandra Amoroso

1. Ovinos. 2. Cálculos urinários. 3. Acute phase reaction. 4. Morphometry. 5. Gases sanguíneos Análise. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

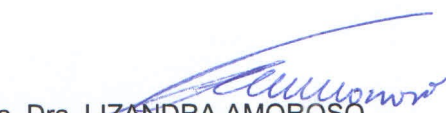
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ELEMENTOS PREDITIVOS E MORFOLÓGICOS DA UROLITÍASE OBSTRUTIVA EM OVINOS SANTA INÊS

AUTOR: THIAGO ARCOVERDE MACIEL

ORIENTADORA: LIZANDRA AMOROSO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. ENRICO LIPPI ORTOLANI (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Clínica Médica-FMVZ/USP / São Paulo/SP


Profa. Dra. PATRICIA CRISTINA FERRO LOPES (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Medicina Veterinária-Centro Universitário / Jaguariúna/SP


Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pós-Doutoranda DANIELA GOMES DA SILVA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 29 de novembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Thiago Arcoverde Maciel – nascido em 05 de junho de 1987, filho de Tertuliano Antônio Arcoverde de Melo e Maria das Graças Arcoverde Maciel, brasileiro e natural de Buíque-PE, iniciou sua vida acadêmica em 2005 na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE/UAG onde obteve graduação em Medicina Veterinária (2011) com Lâurea em sua conclusão de curso. Concluiu Residência em Medicina Veterinária na Clínica de Bovinos de Garanhuns, UFRPE/CBG (2012, 2013), onde atuou nas áreas de Clínica Médica, Clínica Cirúrgica, Laboratório Clínico e Anatomia Patológica de Ruminantes e Equídeos. Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da UFRPE/UAG (2015). Doutorando pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP-Jaboticabal (2016). Em setembro de 2016 prestou concurso para Professor Assistente de Clínica Médica de Equinos da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, sendo aprovado e lotado na Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária UFCG/UAMV desde 01 de novembro de 2016, em 2017 foi nomeado Coordenador do Serviço de Estágios em Medicina Veterinária (SEMEVE) (até o momento).

“O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se.”

(Voltaire)

Tudo dedico aos meus **pais** e **irmã**, que constituem minha base e essência. Às minhas **orientadoras**, pela competente condução e compreensão ao longo do percurso e aos **ovinos** utilizados neste experimento em contribuição à ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao longo desta trajetória
Grandes conquistas alcancei.
Relembro-as com admiração,
Agradecimento. E então,
Dedico-lhes
Esta Obra.
Como parte ímpar,
Importante em minha vida.
Momentos memoráveis ficarão
Eternizados
Na memória.
Todos vocês foram essenciais.
Onde eu estiver...
Serei sempre grato.

Aos meus pais, **Tertuliano Antônio Arcoverde de Melo** “Meu Gatão” e **Maria das Graças Arcoverde Maciel** “Minha Gatona”, e à minha irmã, **Tamyris Arcoverde Maciel** “Minha Princesa”, que são meu alicerce, orgulho e exemplos de vida, além de meus maiores incentivadores. Também agradeço ao meu cunhado **Alysson Santos** que faz parte de nossa família.

À minha amada tia **Dade**, sempre tão presente em minha vida. Em seu amor e generosidade fez tudo ao seu alcance para que eu tivesse um futuro digno. Ao revisar e corrigir esta tese, segura a minha mão guiando-a a colher o mais belo e seletto fruto, resultado de tantos anos de dedicação.

Agradeço muito ao meu querido primo **Eduardo Arcoverde**, por ter aberto as portas de seu apartamento em Recife (2005) durante minha fase pré-vestibular, ter me ensinado, tirado dúvidas, aconselhado e apoiado nesse período tão importante em minha vida. Estendo meus agradecimentos a **Iracy** e **Diógenes**, seus colegas de apartamento, que mesmo não me conhecendo concordaram que eu fosse morar com eles e me acolheram como membro da família.

Aos meus primos, quase irmãos, **Rico** e **Loira**, **Clarinha** e **Arthur** e à tia **Fátima** pelo amor incondicional e por terem sido meu porto seguro enquanto estive em Garanhuns.

Aos demais tios paternos **Gorete, Guiomar, Lúcia, Salete, Côca e Thadeu** e maternos **Lisa, Mazé, Laine, Dete e Didi** que também me apoiaram quanto iniciei minha trajetória acadêmica.

Aos meus Avós paternos **Maria Amélia Arcoverde e Newton Melo**, e a minha avó materna **Josefa Sousa** por terem sonhado com este dia e com a realização deste sonho que parecia tão distante e inatingível.

À minha orientadora **Lizandra Amoroso** (UNESP-Jaboticabal) não só pela competência e orientação, mas pela pessoa incrível e excelente profissional que é. Serei eternamente grato por ter me aceitado como orientado, por ter se disposto a encarar um projeto que foge totalmente de suas atuais linhas de pesquisa, e por ter aceitado me orientar à distância quando precisei me mudar para Paraíba, por ter sido aprovado em concurso apenas seis meses depois de ter iniciado o doutorado, fazendo-o com competência e excelência, e como resultado disto temos essa obra.

À minha mãe **Maria das Graças Arcoverde Maciel** e minha irmã **Tamyris Arcoverde Maciel** que me fizeram ver a importância de não me deixar abater, perder o foco quando surgem grandes imprevistos, e, diante destes, estar sempre pronto a buscar alternativas, soluções viáveis para alcançar com maestria meus objetivos finais. A reconhecer o valor da calma em momentos de desespero, da perseverança quando não parece haver uma luz no fim do túnel, e finalmente, nunca duvidar de que no fim tudo dá certo quando estamos rodeados de pessoas competentes, que nos amam, e desejam nosso sucesso.

À minha “eterna orientadora” e grande amiga **Daniela Oliveira** (UAG/UFRPE) que me apresentou ao mundo da pesquisa e me fez amá-lo desde a graduação. Graças a ela alcei meu primeiro vôo no mundo científico, conheci congressos, pessoas e lugares nunca imaginados. Foi “**Dani**” que me incentivou e orientou durante o mestrado, financiando-o completamente, e como se não bastasse me aturou diariamente em seu período de férias para concluir a difícil e interminável tarefa de redigir dois artigos e finalizar esta tese. Não há palavras que possam expressar meu carinho e eterna

gratidão por ela, que além de professora, orientadora e amiga, continua sendo minha psicóloga nas horas vagas, dando-me sempre conselhos sobre como ser um bom professor.

Ao professor **Luís Antônio Mathias** (UNESP-Jaboticabal) que aceitou prontamente o desafio de realizar a estatística do projeto “missão aparentemente impossível”, e por ter extraído o melhor dos dados obtidos na pesquisa, para que essa tese fosse concluída em tempo hábil e com maestria.

Aos professores **José Jurandir Fagliari** e **Silvana Martinez Baraldi Artoni** (UNESP-Jaboticabal) pela contribuição direta em suas respectivas áreas de conhecimento, ao me permitir utilizar seus laboratórios para a execução de etapas ímpares da pesquisa, e pelo incentivo e confiança.

Às Pós-graduandas **Fabiana Cirino dos Santos**, **Lismara de Castro Nascimento** (UNESP-Jaboticabal) e **Milena de Oliveira Firmino** (UFCG-Patos), pela indispensável ajuda que prestaram na leitura das lâminas.

Ao meu Residente do HVU/UFCG, **Clédson Calíxto de Oliveira** “o meu preferido” (rsrsrs), por mostrar-se um bom amigo, também amante da pesquisa e que aceitou prontamente contribuir com este projeto realizando um trabalho essencial para sua conclusão.

Ao diretor acadêmico da UFCG, prof. **Carlos Peña**, assim como ao diretor do Hospital Veterinário, prof. **Antônio Flávio**, pelo incentivo à minha formação, apoio e concordância quando precisei me ausentar para assistir as disciplinas e realizar atividades na UNESP. Agradeço, também, aos colegas de trabalho, **Eldinê Miranda**, **Tatiane Rodrigues**, **Daniel Medeiros**, **Josemar Medeiros** e **Julie Nunes** por terem, juntamente com nossos **Residentes**, cuidado de modo tão brilhante da Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais quando precisei me ausentar.

Aos meus seletos estagiários: **Antônio, Nitalmo, Vanessa e Paulo**, que estiveram presentes desde a concepção dessa tese, trabalhando arduamente e com excelência. E aos que ficaram ao longo do percurso: **Airton, Caio, Sthênio e Diogo**, os quais contribuíram de modo tão singular.

A dona **Nevinha** (UFMG, Patos) por ter me ajudado na confecção das lâminas, sempre com a maior disposição e boa vontade.

Finalmente, aos carneiros utilizados neste estudo que, em contribuição à ciência, possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa, para melhoria na qualidade de vida de tantos outros ovinos.

A todos que me ajudaram a realizar este trabalho e que não foram citados nominalmente, o meu muito obrigado.

Thiago Arcoverde Maciel

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1 Introdução	1
2 Revisão de literatura	3
2.1 Urolitíase	3
2.2 Particularidades anatomofisiológicas do trato urinário e a urolitíase	6
2.3 Sinais clínicos	15
2.4 Diagnóstico	17
2.5 Análises laboratoriais	18
2.6 Hemogasometria como auxílio diagnóstico e prognóstico de doenças	21
2.7 Proteínas de Fase Aguda na predição das doenças	23
2.8 Morfologia na avaliação de processos patológicos	24
3 Referências	25
CAPÍTULO 2 – PREDICTIVE ELEMENTS OF OBSTRUCTIVE UROLITHIASIS IN SHEEP	34
ABSTRACT	34
1. Introduction	36
2. Materials and methods	37
2.1 Animals used	37
2.2 Facilities, diets and experimental groups	37
2.3 Clinical evaluation and sample collection	39
2.4 Hemogasometric analysis	39

2.5 Determination of serum concentrations of acute phase proteins	40
2.6 Statistical analysis	40
3. Results	41
4. Discussion	46
5. Conclusions	49
6. References	50
CAPÍTULO 3 – SHEEP URINARY TRACT ARCHITECTURE IS AFFECTED BY ACUTE URETHRAL OBSTRUCTION?	55
Summary	56
1. Introduction	57
2. Materials and methods	59
2.1 Approval of the ethics committee	59
2.2 Study location, animal selection and management	59
2.3 Experimental Design	60
2.4 Harvesting and Analysis	62
2.5 Statistical Analysis	64
3. Results and discussion	64
4. Conclusions	79
5. References	80
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
APÊNDICE	88
APÊNDICE A – Fluxograma dos momentos de coletas de material biológico para análises e de ocorrência de urolitíase	89

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

I- FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA
USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO

LICENÇA N.º.
0481/2013

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS

USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO
PROTOCOLO N.º 23082.013726/2012
RECEBIDO EM: 29/04/2013

D12

No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

Lista das DCBs disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf.

1. FINALIDADE

Ensino	<input type="checkbox"/>
Pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/>
Treinamento	<input type="checkbox"/>

Início: 01/03/2013

Término: 28/02/2015

2. TÍTULO DO PROJETO/AULA PRÁTICA/TREINAMENTO

UROLITÍASE OBSTRUTIVA EM OVINOS: ESTUDOS LABORATORIAIS E O PAPEL DA VITAMINA C NO CONTROLE DA DOENÇA

Área do conhecimento: Medicina Veterinária


Lista das áreas do conhecimento disponível em:

<http://www.cnpq.br/areasconhecimento/index.htm>.

3. RESPONSÁVEL

Nome completo	Daniela Oliveira
Instituição	Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
Unidade	Unidade Acadêmica de Garanhuns - UAG
Departamento / Disciplina	Anatomia dos Animais Domésticos

Experiência Prévia:


CEUA - UFRPE
 Aprovado em
 18/03/2013
 Validade
 18/03/2015

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado **“Influência de dieta calcologênica e vitamina C sobre o proteinograma sérico e histomorfometria do trato urinário de ovinos”**, protocolo nº 8.147/16, sob a responsabilidade da Profª Drª Lizandra Amoroso, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho 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 FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 02 de junho de 2016.

Vigência do Projeto	01/08/2016 a 01/03/2020
Espécie / Linhagem	Ovina
Nº de animais	20 animais
Peso / Idade	20 - 25 kg / 2-3 meses
Sexo	Machos
Origem	Fazenda

Jaboticabal, 02 de junho de 2016.


Profª Drª Paola Castro Moraes
 Vice-Coordenadora – CEUA

ELEMENTOS PREDITIVOS E MORFOLÓGICOS DA UROLITÍASE OBSTRUTIVA EM OVINOS SANTA INÊS

RESUMO – A urolitíase é enfermidade com importância econômica para a ovinocultura, que causa a saída prematura de ovinos machos destinados à reprodução, custos com tratamento e morte. A associação entre avaliação hemogasométrica, pesquisa de proteínas de fase aguda (PFA) como biomarcadores precoces e o estudo morfométrico do trato urinário pode ser empregada como método de auxílio diagnóstico precoce para a doença. Com esse objetivo, foram utilizados 14 ovinos hípidos, machos (não castrados), da raça Santa Inês com idade aproximada de 90 dias. Os ovinos receberam dieta experimental hiperfosfórica durante todo o período experimental, foram examinados semanalmente e após desenvolvimento da urolitíase, reorganizados em dois grupos experimentais distintos D₁ (sem urolitíase) e D₂ (com urolitíase) para análise comparada dos dados. No período pré-experimental e no dia do abate foram coletadas amostras de sangue venoso para avaliação hemogasométrica. Para mensurar as imunoglobulinas (A e G) e as PFA, analisaram-se as amostras dos ovinos que desenvolveram a urolitíase (D₂). As coletas de sangue foram realizadas semanalmente até a manifestação clínica da enfermidade, totalizando 16 amostras. Ao término do experimento foi realizado o abate e necropsia dos ovinos, para descrição das alterações patológicas e a análise morfométrica. Fragmentos do trato urinário e fígado foram coletados e submetidos à rotina histológica e as lâminas histológicas foram descritas, seguindo-se a histomorfometria. Embora o pH sanguíneo não tenha sido diferente ($P < 0,05$) entre grupos, os ovinos que desenvolveram urolitíase apresentaram alcalose metabólica compensatória. Elevação da pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) foi observada entre D₁ e D₂, mas houve diferença ($P < 0,05$) apenas nos momentos finais (MFs). Expressivas diferenças de excesso de base (EB), dióxido de carbono total no plasma (tCO_2), bicarbonato (HCO_3^-) e saturação de bicarbonato ($stHCO_3^-$), foram registradas apenas nos MFs, assim como maiores valores para Na^+ e K^+ . As PFA que apresentaram diferença ($P < 0,05$) ao longo do tempo foram haptoglobina e transferrina. Necrose do processo uretral e bexiga urinária repleta foram observados em todos ovinos que desenvolveram urolitíase. Além disso, um dos ovinos apresentou hidronefrose, extensa área de hemorragia na bexiga urinária, além de ruptura de uretra e edema subcutâneo. Não houve diferença significativa nas variáveis morfométricas macroscópicas entre grupos, com exceção da largura do ureter direito, contrariando a hipótese de sua possível utilização como método de auxílio diagnóstico precoce para a urolitíase. Quanto à avaliação histopatológica, foram observadas áreas multifocais de discreta a moderada congestão dos tufo glomerulares e proteína no lúmen tubular dos rins. No fígado, observou-se nas regiões centrolobulares, discreta a moderada degeneração gordurosa e apenas em um ovino foi observada, macro e microscopicamente, área focal ulcerada na mucosa da bexiga. Os achados da presente pesquisa demonstraram que a dieta formulada foi eficaz na indução da doença clínica. Foram encontradas lesões no fígado e trato urinário, mas não houve alterações histomorfométricas significativas.

Palavras-chave: Carneiro, haptoglobina, equilíbrio ácido-básico, morfometria, transferrina, trato urinário.

PREDICTIVE AND MORPHOLOGICAL ELEMENTS OF OBSTRUCTIVE UROLYTHIASIS IN SANTA INÊS

ABSTRACT – Urolithiasis is an economically important disease for male sheep production that causes the premature calving of sheep for breeding, treatment costs and death. The association between hemogasometric evaluation, acute phase protein (APP) research as early biomarkers and urinary tract morphometric study can be employed as an early diagnostic aid for the disease. For this purpose, 14 healthy male (non-castrated) Santa Inês sheep, approximately 90 days old, were used. Sheep received a hyperphosphoric experimental diet throughout the experimental period, were examined weekly and after development of urolithiasis, reorganized into two distinct experimental groups D₁ (without urolithiasis) and D₂ (with urolithiasis) for comparative analysis of the data. In the pre-experimental period and on the day of slaughter, venous blood samples were collected for hemogasometric evaluation. To measure immunoglobulins (A and G) and APP, samples from sheep that developed urolithiasis (D₂) were analyzed. Blood samples were collected weekly until the clinical manifestation of the disease, totaling 16 samples. At the end of the experiment, sheep were slaughtered and necropsied to describe the pathological changes and the morphometric analysis. Urinary tract and liver fragments were collected and submitted to histological routine and histological slides were described, followed by histomorphometry. Although blood pH was not different ($P < 0.05$) between groups, sheep that developed urolithiasis had compensatory metabolic alkalosis. Carbon dioxide partial pressure elevation (pCO_2) was observed between D₁ and D₂, but there was a difference ($P < 0.05$) only in the final moments (FMs). Significant differences in base excess (BE), total plasma carbon dioxide (tCO_2), bicarbonate (HCO_3^-) and bicarbonate saturation ($stHCO_3^-$) were recorded only in the FMs, as well as higher values for Na^+ and K^+ . The APP that showed difference ($P < 0.05$) over time were haptoglobin and transferrin. Necrosis of the urethral process and full urinary bladder were observed in all sheep that developed urolithiasis. In addition, one of the sheep presented hydronephrosis, extensive area of urinary bladder hemorrhage, urethral rupture and subcutaneous edema. There was no significant difference in macroscopic morphometric variables between groups, except for right ureter width, contrary to the hypothesis of its possible use as an early diagnostic aid method for urolithiasis. Regarding histopathological evaluation, multifocal areas of mild to moderate congestion of the glomerular tufts and protein in the tubular lumen in the kidneys were observed. In the liver, in the centrilobular regions, mild to moderate fatty degeneration was observed, and only in one sheep was observed, macroscopically and microscopically, an ulcerated focal area in the bladder mucosa. The findings of the present research demonstrated that the formulated diet was effective in inducing clinical disease. Liver and urinary tract lesions were found, but there were no significant histomorphometric changes.

Keywords: Sheep, haptoglobin, acid-base balance, morphometry, transferrin, urinary tract.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
AST	Aspartato Aminotransferase
BE/EB	Excesso / Déficit de Bases
C	Concentrado
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	Íons Cálcio
CBG	Clínica de Bovinos de Garanhuns
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CK	Creatina Quinase
Cl ⁻	Íons Cloro
cm	Centímetro
Con.	Concentrado
D	Direito
d.m.s.	Diferença Mínima Significativa
D ₁	Grupo Experimental 1 – sem urolitíase
D ₂	Grupo Experimental 2 – com urolitíase
Da	Dáltons
Dra.	Doutora
E	Esquerdo
EIC	Espaço Intercostal
g	Gramma
h	Hora
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato Plasmático
Hct	Hematócrito
HE	Hematoxilina e Eosina
HVU	Hospital Veterinário Universitário
IgA	Imunoglobulinas A
IgG	Imunoglobulinas G
K ⁺	Íons Potássio
Kcal	Quilocaloria
kDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
L	Litro
LD	Lobo Direito
LE	Lobo Esquerdo
LEC	Líquido Extracelular
m	Metro
MFs	Momentos Finais
mg	Miligramma
Mg ²⁺	Íons Magnésio
MI	Momento Inicial
mL	Mililitro
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mmol	Milimol
MS	Matéria Seca

mS/cm	MiliSiemens por Centímetro
N/n	Número
Na ⁺	Íons Sódio
NGAL	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
°C	Graus Celsius
OH	Hidroxila
P	Fósforo
P.A.	Puro para Análise
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
pCO ₂	Pressão Parcial de Dióxido de Carbono
PFA	Proteínas de Fase Aguda
pH	Potencial Hidrogeniônico
pO ₂	Pressão Parcial de Oxigênio
ppm	Partes Por Milhão
Profa.	Professora
PT	Proteína Total
PV	Peso Vivo
SAS	Statistical Analysis System
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SEMEVE	Serviço de Estágios em Medicina Veterinária
sO ₂	Saturação de Oxigênio
stHCO ₃ ⁻	Saturação de Bicarbonato
tCO ₂	Dióxido de Carbono Total no Plasma
tHb	Hemoglobina
UAG	Unidade Acadêmica de Garanhuns
UAMV	Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UNESP	Universidade Estadual Paulista
Vol.	Volumoso
µm	Micrômetro

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – Predictive Elements of Obstructive Urolithiasis in Sheep

Table 1. Percent composition of experimental diets	38
Table 2. Mean and standard deviation of hemogasometric profile of venous blood of young male sheep, submitted to calculogenic diets (n = 14).....	43
Table 3. Acute phase protein kinetics in healthy young male sheep until clinical manifestation of urolithiasis (D ₂ – n = 5).....	44
Table 4. Serum immunoglobulin A (IgA) and IgG concentrations (mg/dL) in healthy young male sheep until clinical manifestation of urolithiasis (n = 5).....	45

CAPÍTULO 3 – Sheep urinary tract architecture is affected by acute urethral obstruction?

Table 1. Chemical and calculated composition of experimental diets.	60
Table 2. Nutritional composition of experimental diets ingredients	61
Table 3. Chemical analysis of water	61
Table 4. Analysis of variance and mean values ± standard deviation of morphometry (mm) of Santa Inês sheep kidneys (n = 14)	73
Table 5. Analysis of variance and mean values ± standard deviation of length (cm) and width (mm) of ureters and length (cm) of urethral process of Santa Inês sheep (n = 14)	74
Table 6. Renal and hepatic histomorphometric data of Santa Inês sheep (n = 14)..	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

- Fig. 1.** Visão geral do trato genitourinário de ovino ilustrando o rim esquerdo (a), ureter esquerdo (b), bexiga urinária vazia (c), uretra pélvica (d), flexura sigmoide (e), uretra peniana (f), cordão espermático (g), testículos (h) e cauda do epidídimo (i). 7
- Fig. 2.** Disposição retroperitoneal dos rins fixados dorsalmente na cavidade abdominal com rim direito posicionado mais cranialmente (a); cápsula adiposa ao redor do rim direito (*); bexiga urinária repleta (b) com vasos sanguíneos evidentes (setas), ápice da bexiga urinária (c). 8
- Fig. 3.** A – Cápsula renal envolvendo o parênquima (seta branca), hilo renal (h); B – corte longitudinal do rim expondo o parênquima (c – córtex, m – medula, junção corticomedular – jc) e pelve renal preenchida com tecido adiposo, papila renal (seta amarela) (*). 9
- Fig. 4.** Porção distal do trato urinário de ovinos com uretra peniana longa e de pequeno diâmetro (u); flexura sigmoide (s) e processo uretral (*) 12
- Fig. 5.** Deposição de urólitos em diferentes segmentos do trato urinário de ovinos. A – pelve renal; B – bexiga urinária e C – uretra pélvica com ruptura (setas) 13
- Fig. 6.** A – Ovino com urolitíase e edema de prepúcio (seta) 14
- Fig. 7.** A – Urina na cavidade abdominal (*) e peritonite decorrente de uroperitônio (seta); B – bexiga urinária com ruptura em sua porção dorsal (seta) 15
- Fig. 8.** Ovinos com urolitíase. A – mímica de micção improdutiva caracterizada por abdução de membros pélvicos e cauda erguida; B – prostração, evidenciada pelo decúbito lateral, associada a timpanismo; C – lambedura compulsiva de prepúcio

como mímica de dor; D – conjuntiva ocular hiperêmica com ingurgitamento de capilares episclerais 16

Fig. 9. Necrose de processo uretral (setas) e congestão de glânde e prepúcio (*) decorrentes de obstrução por urólitos. 17

Fig. 10. Análise do sedimento urinário. A – cristais de fosfato triplo e células epiteliais escamosas; B – hematúria 19

Fig. 11. A – Amostra de sangue da espécie ovina refrigerada para exame hemogasométrico; B – hemogasometria em aparelho portátil OPTI CCA-TS. 22

CAPÍTULO 2 – Predictive Elements of Obstructive Urolithiasis in Sheep

Fig. 1. Temporal evolution of haptoglobin and transferrin in healthy sheep until clinical manifestation of urolithiasis. 47

CAPÍTULO 3 – Sheep urinary tract architecture is affected by acute urethral obstruction?

Fig. 1. Experimental design scheme. 46

Fig. 2. Necropsy findings of sheep with urolithiasis. (a) Panoramic view of the urinary tract. It is observed discreetly dilated ureter (arrow) and markedly distended urinary bladder (*). (b) Urinary bladder at longitudinal section. Marked necrohemorrhagic cystitis (arrow) was noticed in the body of urinary bladder. (c) Urethral process with extensive area of necrosis and hemorrhage (arrow). (d) Hydronephrosis, characterized by moderate dilation of the renal pelvis (*) and evidence of renal chalices (seta). ... 67

Fig. 3. Urinary bladder and kidney of sheep treated with a calculogenic diet (a) Urinary bladder full of irregular yellowish-white uroliths (arrow). (b) Kidney. Irregular yellowish-white uroliths are observed in renal pelvis (arrows) 68

Fig. 4. Necropsy findings of sheep fed a calculogenic diet with ruptured urethra. (a) Subcutaneous edema around the foreskin, characterized by deposition of slightly reddish gelatinous material (arrow). (b) Urethral rupture with compressed mineral content (arrow) 69

Fig. 5. Overview of sheep urinary tract illustrating the right kidney in cranial position (a), ureter (b), full urinary bladder (c), pelvic urethra (d) sigmoid flexure (e), penile urethra (f) and glans with urethral process (g) 70

Fig. 6. Morphometric evaluation of the sheep urinary tract. (a) measuring kidney width; (b) measurement of renal cortex height; (c) measurement of the ureter; and (d) Measurement of the length of the urethral process 71

Fig. 7. Photomicrograph of liver and kidney. A) Mild fatty degeneration is observed in the centrilobular region (arrow) in the liver. HE. Bar = 100 μ m. B) Large and unique, well-defined vacuoles (arrows) in the cytoplasm of hepatocytes characteristic of hepatic fatty degeneration. HE. Bar = 50 μ m. C) Mild congestion in the glomerular tufts (large arrow) and blood vessels in the cortical region of the kidney (small arrow). HE. Bar = 100 μ m. D) Renal intratubular protein deposition (*). HE. Bar = 100 μ m 76

APÊNDICE

APÊNDICE A – Fluxograma dos momentos de coletas de material biológico para análises e de ocorrência de urolitíase 88

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

A criação de ovinos no Brasil assumiu expressivo destaque a partir da década de 70, quando deixou de ser apenas uma atividade de subsistência e tornou-se uma exploração rentável (Gheller, 2008). Com isso, ocorreram várias mudanças nos sistemas de produção: maior número de rebanhos, propriedades mais tecnificadas e intensificação da ovinocultura, resultando em aumento da ocorrência de doenças nutricionais e metabólicas (Ortolani, 1996). Dentre essas enfermidades destaca-se a urolitíase por apresentar alta taxa de mortalidade com perda de ovinos de alto valor zootécnico (Ortolani, 1996; Afonso e Guaraná, 2008). O desenvolvimento de urólitos seguido da obstrução resulta da interação de numerosos fatores comuns entre os ruminantes confinados, tais como os anatômicos, fisiológicos, nutricionais, de manejo (Smith e Sherman, 1994; Belknap e Pugh, 2002), espécie animal e sexo (Dória et al., 2007). Associados ao baixo consumo de água, que torna a urina saturada, esses fatores favorecem a precipitação e cristalização dos solutos (Radostits et al., 2007). Afonso e Guaraná (2008) apoiam essas opiniões, referindo-se ao surgimento de condições que favorecem o aumento da concentração urinária de solutos, minerais ionizados (cristaloides) que formam cristais insolúveis como o fator mais importante.

Pugh (2004) e Stuchi et al. (2010) concordam que a urolitíase pode ser controlada ou mesmo prevenida por meio de condutas adequadas de manejo nutricional (dieta balanceada, com proporção ideal volumoso/concentrado de 70/30) e hídrico (água de qualidade e sem restrição). Um dos fatores considerados como complicador na resolução da enfermidade é a demora no atendimento clínico dos ovinos acometidos, refletindo nos baixos índices de recuperação (Bruère e West, 1993; Guimarães et al., 2012). Os melhores resultados são obtidos com a prevenção da doença antes que se inicie a formação do urólito, visando à integridade reprodutiva do animal. Para isso, deve-se conhecer a composição química dos urólitos e corrigir os possíveis fatores que podem estar relacionados a sua formação.

A hemogasometria tem sido utilizada como ferramenta capaz de fornecer dados sobre a condição de desequilíbrios ácido-básicos que podem não apenas refletir a

gravidade de determinadas enfermidades, mas também interferir diretamente na recuperação de ovinos enfermos (Sucupira e Ortolani, 2003; Leal et al., 2010; Silva et al., 2018). Outra forma de auxílio diagnóstico precoce que tem sido estudada nas últimas duas décadas para diferentes espécies é a determinação e mensuração de proteínas de fase aguda, que no início de processos inflamatórios e infecciosos se elevam ou diminuem, mantendo suas concentrações alteradas no decorrer da doença e se restabelecendo após o tratamento e recuperação. Portanto, são bons biomarcadores precoces de diagnóstico, prognóstico e monitoramento do tratamento (Céron et al., 2005). No entanto, não há relatos a respeito de sua padronização para a espécie ovina, especialmente na urolitíase.

Uma técnica que tem sido empregada com o intuito de auxiliar no diagnóstico de algumas doenças é a análise morfométrica (Rech et al., 2006; Duarte et al., 2007; Pagnano et al., 2008). A morfologia e morfometria têm sido utilizadas como metodologia laboratorial para ampliar o conhecimento das alterações das estruturas dos órgãos, tecidos e células, em animais de laboratório, contribuindo para os esclarecimentos e os avanços das ciências (Cotrim et al., 1990; Pardini e Assis, 2005). *In vivo*, os parâmetros morfométricos podem ser analisados por meio de ultrassonografia e auxiliar o diagnóstico, e possível prognóstico, quando o aumento ou diminuição de tamanho de determinado órgão ou tecido pode ser sugestivo de alguma enfermidade (Campos et al., 2013). Pesquisas têm sido realizadas para avaliar as alterações morfológicas e morfométricas sofridas pelos órgãos, tecidos e células em decorrência de doenças que acometem os diferentes sistemas orgânicos (Rodrigues et al., 1998; Pereira et al., 2002; Rech et al., 2006; Duarte et al., 2007; Melo, 2007; Lima et al., 2010). Destas, várias tratam sobre o sistema urinário (Reche Júnior e Hagiwara, 2001; Sasahara, 2006; Ortolan et al., 2010). E, como não foi encontrada literatura com esse perfil em ovinos com urolitíase, destaca-se a relevância da presente pesquisa. Desta forma, avaliaram-se os parâmetros hemogasométricos, o perfil das PFA, a análise anatomopatológica, morfométrica e histopatológica do trato urinário de ovinos submetidos à dieta calculogênica, com e sem urolitíase, para demonstrar sua efetividade como fatores preditivos precoces da manifestação da doença.

2. Revisão de literatura

2.1 Urolitíase

Urolitíase é uma doença metabólica de origem multifatorial, marcada pela formação de urólitos no sistema urinário. É a enfermidade de maior importância que acomete o trato urinário de ruminantes, responsável por causar elevados prejuízos, como a saída prematura de ovinos machos destinados à reprodução, gastos com tratamentos e morte (Dória et al., 2007; Melendez et al., 2007).

Há poucas chances de reversão do quadro após o aparecimento dos sinais clínicos da urolitíase, e a maioria dos ovinos torna-se inapta à reprodução quando submetidos a tratamento cirúrgico (Ferreira et al., 2011). A doença torna-se clinicamente importante quando os urólitos causam obstrução (Jones, 2006; Radostits et al., 2007; Riet-Correa et al., 2008). A estase urinária resultante da obstrução provoca inflamação, hidronefrose e uremia (Assis et al., 2009). Nos casos de obstrução total da uretra podem ocorrer ruptura uretral, com infiltração de urina na parede ventral do abdômen ou bexiga e uoperitônio (Tiruneh, 2000).

A urolitíase em pequenos ruminantes tem sido relatada em diferentes países de todos os continentes (Sato e Omori, 1977; Stewart et al., 1991; Tiruneh, 2000; Rogers, 2001; Guimarães et al., 2007; Riet-Correa et al., 2008; Vinodhkumar et al., 2010; Shahrom e Zamri-Saad, 2011; Wen et al., 2011). Apresenta maior incidência em regiões áridas, onde o consumo de água é fator limitante. Possui caráter esporádico, mas pode ocorrer em forma de surtos ou endêmica, refletindo a importância do manejo e da dieta na patogênese da enfermidade (Mcintosh et al., 1974; Bruère e West, 1993; Van Metre e Divers, 2006).

Estudos de caso sobre urolitíase em ovinos no semiárido brasileiro, provenientes da Clínica de Bovinos de Garanhuns, e do Hospital Veterinário Universitário Prof. Ivon Macêdo Tabosa, registraram índices de mortalidade de 45% e 5,77% entre os ovinos atendidos, respectivamente; os autores atribuem esses números ao grau de obstrução e tempo até o atendimento (Guimarães et al., 2007; Riet-Correa et al., 2008). Morais (2012), em estudo retrospectivo de 1.912 pequenos ruminantes atendidos na CBG/UFRPE no período compreendido entre 2001 e 2011

observou que 1.436 (75,1%) eram ovinos e 476 (24,9%) caprinos. Dentre estes, 98 (5,1%) tiveram diagnóstico de urolitíase. Também é importante ressaltar que, dos 98 animais diagnosticados com urolitíase, 83,7% eram ovinos e 16,3% caprinos, revelando maior frequência da doença na espécie ovina. Além disso, todos os ovinos acometidos eram do sexo masculino e as raças mais frequentemente atingidas foram Santa Inês 71,7% e Dorper 25,9%.

A interação de numerosos fatores como os anatômicos (uretra longa e de pequeno diâmetro, flexura sigmoide e processo uretral), fisiológicos (metabolismo), nutricionais (dieta excessivamente proteica ou com alto teor de fósforo, magnésio ou cálcio, e ainda, a ingestão de plantas com grande quantidade de oxalato ou sílica), de manejo (consumo de água) (Smith e Sherman, 1994; Belknap e Pugh, 2002), espécie animal e sexo (Dória et al., 2007), determinam a formação dos urólitos, seguida da obstrução. O surgimento de condições que favorecem o aumento da concentração urinária de solutos, minerais ionizados (cristaloides) que formam cristais insolúveis são relatadas por Afonso e Guaraná (2008) como fatores mais importantes.

Ainda que de origem multifatorial, a formação de urólitos está diretamente relacionada ao manejo nutricional. Ocorre com maior frequência nos ovinos confinados, superalimentados por ração formada basicamente de grãos (milho, sorgo, farelo de algodão) onde a proporção de Ca e P varia de 1:4 a 1:6 (Tiruneh, 2006; Radostits et al., 2007; Riet-Correa, 2007; Wen et al., 2011). A associação entre esse manejo nutricional, e à menor ingestão de água são mencionados por Hay e Suttle (1986), Stewart et al. (1990) e Riet-Correa et al. (2008), como fatores que diminuem o volume urinário, aumentam a concentração de solutos e favorecem a precipitação de sais na urina.

A formação de urólitos ocorre como resultado do desequilíbrio dos teores de Ca/P causado pelas altas concentrações de fósforo contidas nos concentrados fornecidos aos animais, ocasionando hiperfosfatemia e formação de urólitos de estruvita ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Tiruneh, 2006; Riet-Correa et al., 2008). O cálcio é concorrente do fósforo na absorção intestinal, suas baixas concentrações em relação ao fósforo aumentam a excreção urinária de fosfato. Contudo, a predominância de sais de cálcio nos urólitos de ovinos tem sido observada e descrita por vários pesquisadores (Trueman e Stacy, 1969; Osborne et al., 1989; Guimarães et al., 2012).

Este achado pode ser explicado pela dieta acidogênica que ocasiona estado de acidose metabólica crônica, que resulta em excreção do cálcio devido a diminuição de absorção pelos glomérulos (Owens et al., 1998).

Segundo Takagi e Block (1991), a acidose metabólica estimula a transformação de 25(OH)-colecálciferol em 1,25-dihidroxicolecalciferol, aumenta a reabsorção óssea e liberação de cálcio na corrente sanguínea, e eleva a sua excreção urinária. Corroborando estes autores, Del Claro et al. (2006) demonstraram que a utilização de dieta acidogênica aumentou significativamente a excreção de cálcio pela urina em ovinos da raça Santa Inês.

Guimarães et al. (2012) registraram cálcio e oxalato como os principais componentes dos urólitos analisados em seu estudo. Forragens com elevado teor de cálcio e baixo de fósforo e magnésio possuem altos níveis de oxalato, o que aumenta a excreção desse elemento na urina e sua presença nos urólitos (Van Metre e Divers, 2006).

Embora a urina seja solução que contém íons calcilogênicos, a existência de elementos inibidores da cristalização como mucopolissacarídeos, íons e ácidos orgânicos na urina, impede a formação dos urólitos. Apenas quando a urina se torna saturada e os cristaloides excedem a capacidade protetora, inicia-se a formação do urólitos (Radostits et al., 2007). De acordo com estes autores, as causas da formação dos urólitos podem ser divididas em três grupos: 1 – as que favorecem o desenvolvimento de um núcleo, sobre o qual pode ocorrer a concreção; 2 – as que facilitam a precipitação dos solutos sobre o núcleo; 3 – as que favorecem a concreção pela consolidação dos sais precipitados para o desenvolvimento do urólito. Inicialmente ocorre precipitação de solutos orgânicos (descamações epiteliais, mucoproteínas e mucopolissacarídeos que formam a matriz da maioria dos urólitos, servindo como cimento para a agregação dos minerais), e, em seguida, dos inorgânicos (cristais ou depósitos amorfos) (Ribeiro, 2007).

Além das dietas com concentrações elevadas de fósforo, o excessivo consumo de minerais pode ocorrer por meio da ingestão de água “pesada” (Tiruneh, 2006; Radostits et al., 2007; Riet-Correa, 2007; Wen et al., 2011). Nos ruminantes, o fósforo é reciclado por meio da saliva e eliminado do organismo pelas fezes. Dietas ricas em grãos e pobres em volumosos não só apresentam maiores proporções de fósforo em

sua composição, como diminuem a produção de saliva, causada pela ausência de partículas de fibras, de aproximadamente 3 a 5 centímetros, suficientes para sua estimulação. Conseqüentemente, mais fósforo é excretado pelos rins por meio da urina, e aumenta o risco de urolitíase pela precipitação desses solutos sobre o núcleo (Packett e Hauschild, 1964; Packett et al., 1968). O pH da urina interfere na solubilidade de algumas substâncias, tornando-as menos solúveis em meios alcalinos que em meios ácidos, a exemplo dos urólitos de fosfatos mistos (fosfato magnésio amônio, fosfato de cálcio) e carbonatos (Tiruneh, 2006; Radostits et al., 2007; Riet-Correa, 2007; Wen et al., 2011).

2.2 Particularidades anatomofisiológicas do trato urinário e a urolitíase

O trato urinário de ovinos Machos é formado pelos rins e ureteres, aos pares, bexiga urinária e uretra com segmento pélvico e peniano (Figura 1) (Sisson e Grossman, 1986; Frandson et al., 2014; König e Liebich, 2016; Dyce et al., 2019).

Os rins possuem consistência firme e coloração marrom-avermelhada (Dyce et al., 2019). Na espécie ovina, apresentam aspecto reniforme (Frandson et al., 2014; König e Liebich, 2016). Segundo Sisson e Grossman (1986) suas dimensões aproximadas são: 7,5 cm de comprimento, 5 cm de largura, 3 cm de espessura, com peso médio de 100 a 125 g. A principal função dos rins é o equilíbrio do meio interno por meio da filtração do plasma sanguíneo, seguida pela reabsorção seletiva de eletrólitos, água, glicose e proteínas, concentração dos catabólitos e excreção (Frandson et al., 2014; Dyce et al., 2019). Esse processo de manutenção da homeostase está diretamente envolvido no balanço ácido-base, hemodinâmica e regulação da pressão arterial (Samuelson, 2007).

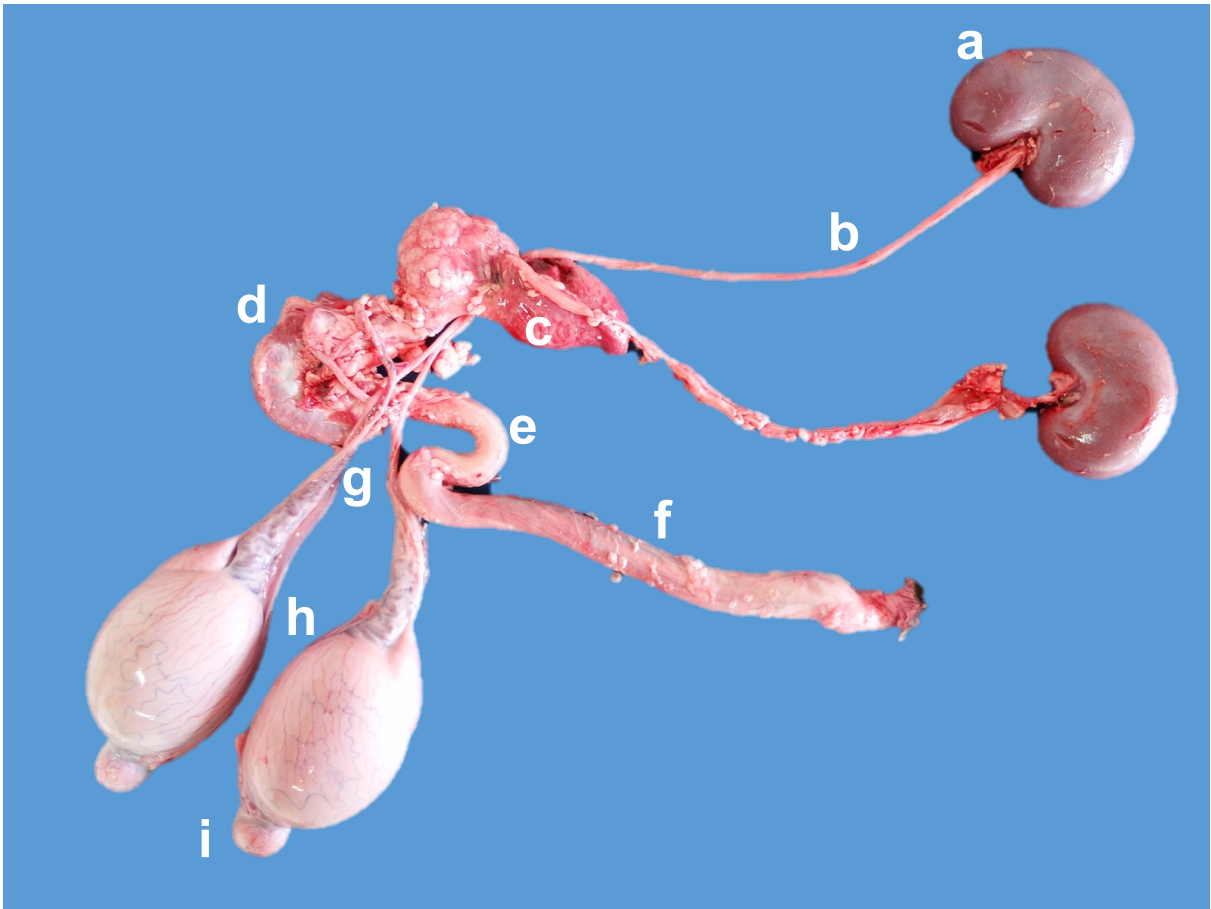


Figura 1. Visão geral do trato genitourinário de ovino macho ilustrando o rim esquerdo (a), ureter esquerdo (b), bexiga urinária vazia (c), uretra pélvica (d), flexura sigmoide (e), uretra peniana (f), cordão espermático (g), testículos (h) e cauda do epidídimo (i).
Fonte. Arquivo pessoal

Os rins encontram-se firmemente aderidos por fáschia, vasos e peritônio. Normalmente, fixam-se na parte dorsal da cavidade abdominal, lateralmente à veia cava caudal e à aorta abdominal (Frandsen et al., 2014). O rim direito posiciona-se mais cranialmente em relação ao esquerdo, entre o 11º espaço intercostal e a 2ª vértebra lombar. Mais externamente, uma cápsula adiposa perirrenal o envolve, protegendo-o de lesões por pressão de órgãos vizinhos (Figura 2) (Sisson e Grossman, 1986; König e Liebich, 2016).

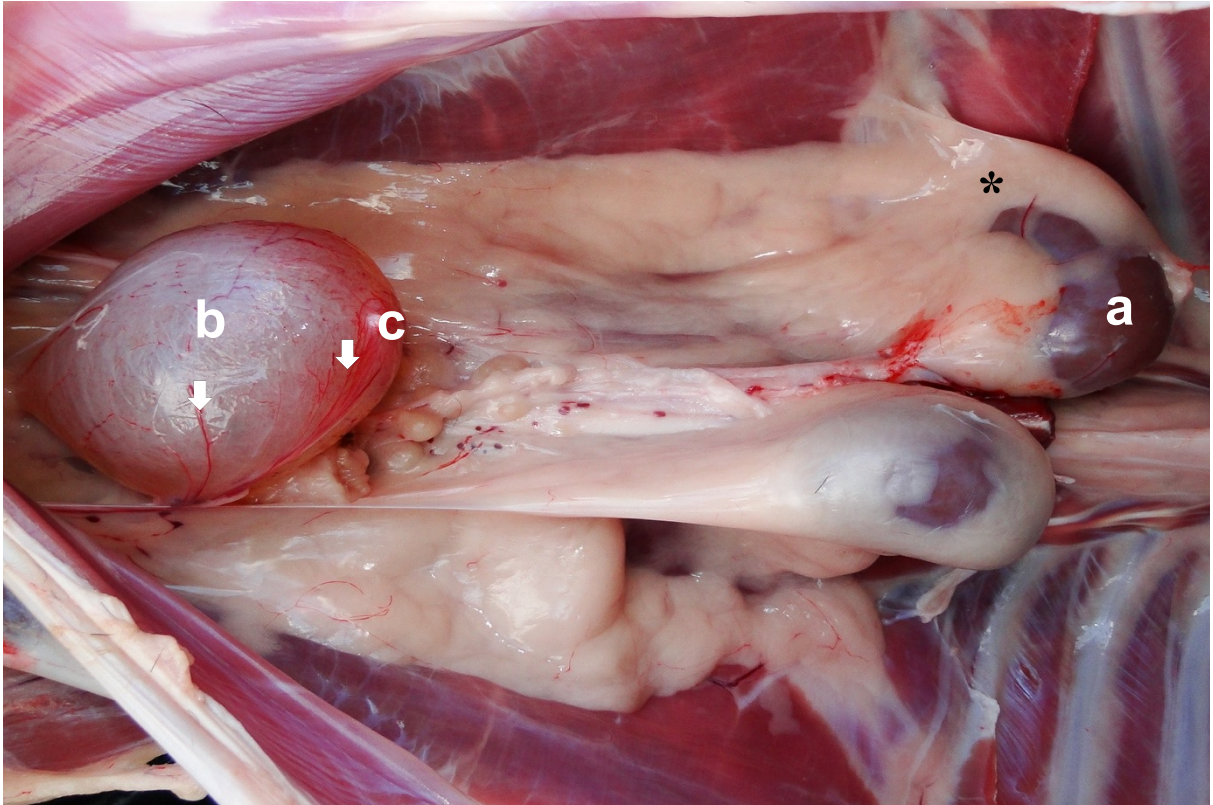


Figura 2. Disposição retroperitoneal dos rins fixados dorsalmente na cavidade abdominal com rim direito posicionado mais cranialmente (a); cápsula adiposa ao redor do rim direito (*); bexiga urinária repleta (b) com vasos sanguíneos evidentes (setas), ápice da bexiga urinária (c).

Fonte. Arquivo pessoal

O parênquima renal é envolto por cápsula resistente de tecido conjuntivo, formada por fibras colágenas e elásticas (Sisson e Grossman, 1986). Essa cápsula restringe a capacidade do rim de se expandir, e resulta em compressão tecidual em casos de edema (Dyce et al., 2019). Sua superfície é ligeiramente convexa com uma depressão em sua margem medial, o hilo (Frandsen et al., 2014; Dyce et al., 2019). O parênquima é dividido em córtex, camada mais externa é de coloração marrom avermelhada e com granulações, e medula, que se projeta dentro da pelve renal e possui duas zonas; uma mais externa de coloração escura e que emite estrias que se estendem até o córtex, e uma interna de coloração vermelho acinzentada, mais pálida (Figura 3) (Sisson e Grossman, 1986; Dyce et al., 2019).

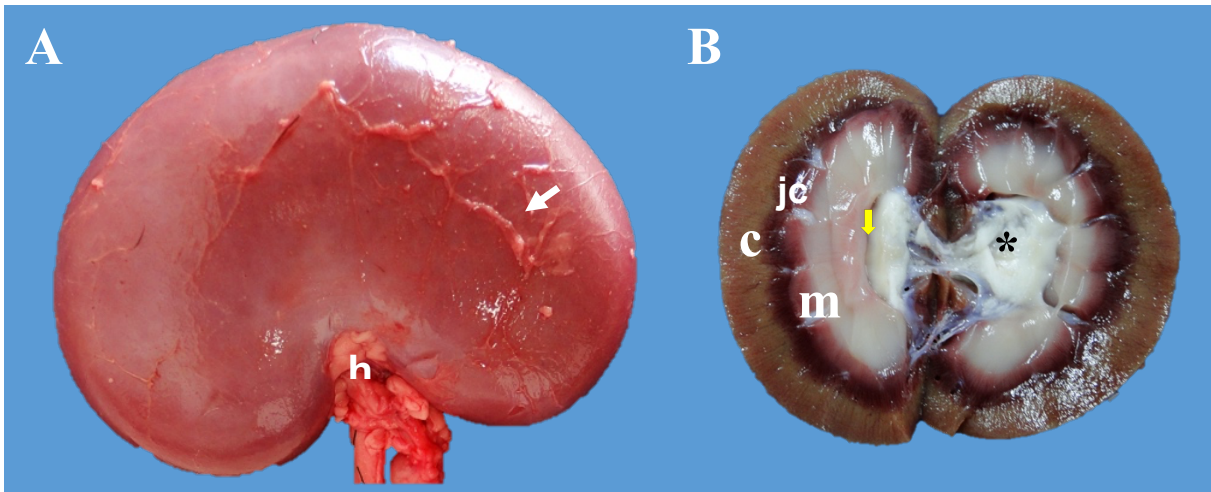


Figura 3. A – Cápsula renal envolvendo o parênquima (seta branca), hilo renal (h); B – corte longitudinal do rim expondo o parênquima (c – córtex, m – medula, junção corticomedularen – jc) e pelve renal preenchida com tecido adiposo, papila renal (seta amarela) (*).

Fonte. Arquivo pessoal

A unidade estrutural e funcional do rim, o néfron, é um conjunto de túbulos conectados, que forma um sistema canalicular de aspecto radiado. Tem início com o corpúsculo renal, dá origem ao túbulo contorcido proximal, seguido da alça néfrica, composta do túbulo reto proximal, que se estreita e torna-se um túbulo fino e em seguida se alarga, formando o túbulo reto distal. Ao adentrar o córtex, o túbulo reto distal retorna ao corpúsculo renal e forma o túbulo contorcido distal do néfron que conflui no túbulo renal coletor e é drenado para o ducto coletor que flui para a pelve renal (Samuelson, 2007; König e Liebich, 2016).

Os três processos que envolvem o néfron e seus suprimentos sanguíneos na formação da urina são: a filtração glomerular; a reabsorção tubular e a secreção tubular. O filtrado glomerular é considerado um ultrafiltrado do sangue pois coloides e células sanguíneas não são filtrados. Muitas proteínas são excluídas do processo de filtração em função do seu peso molecular, no entanto, àquelas com peso inferior a 70.000, como a albumina (69.000) e hemoglobina (68.000) podem aparecer no filtrado em proporções de 0,2 a 03%, e 5% respectivamente (Bradley, 2015).

Por apresentarem tamanho molecular relativamente pequeno, as substâncias importantes para o organismo como Na^+ , glicose e aminoácidos passam facilmente através da membrana glomerular para o fluido tubular, por isso, suas concentrações

no filtrado são semelhantes às do plasma, sendo excretadas pela urina, a menos que retornem ao sangue por mecanismos de reabsorções por transporte ativo. Pequena quantidade de proteína está presente na urina normal, sendo de 40 a 60% dessa fração composta por albumina. Grande parte da proteína é reabsorvida no túbulo proximal e não se perde na urina. Influenciada pelas concentrações de aldosterona, a reabsorção de Na^+ pelo néfron ocorre de modo unidirecional nos túbulos e ductos coletores. Na ausência completa de aldosterona aparentemente 10% do Na^+ (e ânions associados) é perdido na urina. No entanto, apesar da aldosterona estar associada com a reabsorção do Na^+ , ela não regula as concentrações no Líquido Extracelular (LEC) (Reece, 2017).

A regulação dos níveis de K^+ no LEC é realizada no néfron distal e está diretamente relacionada aos níveis desse cátion na dieta. Onde baixos níveis dietéticos promovem maior reabsorção e mínima secreção, enquanto grandes quantidades provocam menor reabsorção e maior secreção, com excreção urinária (Bradley, 2015).

A regulação do Ca^{2+} ocorre primariamente no túbulo contorcido distal e tubo coletor, com a reabsorção estimulada pelo paratormônio e pela vitamina D. Aproximadamente metade desse mineral está associada à albumina e não é filtrado no glomérulo. Os efeitos reguladores do Mg^{2+} não foram até o momento identificados, mas cerca de 75% é filtrado, o restante encontra-se associado a proteínas. Sendo o túbulo proximal responsável por 25 a 30% de sua reabsorção, o restante ocorre na alça néfrica (de Henle) (Reece, 2017).

Aproximadamente 80 a 95% do fósforo filtrado é reabsorvido, principalmente no túbulo proximal. Sua regulação dar-se pela concentração plasmática e pelos níveis de paratormônio. Se há uma pequena quantidade circulante ocorre reabsorção, em situações onde há sobrecarga desse elemento, há excreção urinária, pois, os níveis de paratormônio elevam-se (Swenson, 1996).

A pelve renal representa a continuação do segmento inicial do ureter, parcialmente envolvido pelo seio renal e firmemente aderido ao parênquima renal em toda extensão da região papilar (König e Liebich, 2016). O ureter da maioria dos animais tem início na pelve. Consiste em um tubo muscular de calibre uniforme, envolvido parcialmente pelo peritônio que segue caudalmente até a bexiga urinária

onde penetra obliquamente em sua parede dorsal (Frandsen et al., 2014; König e Liebich, 2016; Dyce et al., 2019).

A bexiga é um órgão muscular, oco e dilatável, responsável pelo armazenamento da urina. Quando vazia e contraída é pequena e globular e situa-se no assoalho da cavidade pélvica. À medida que se enche de urina, adquire forma de pera, suas paredes ficam delgadas e seu tamanho aumenta em direção cranial e para dentro da cavidade abdominal. Quando um volume considerável é atingido, a pressão se eleva e desencadeia o impulso autônomo para eliminação da urina (Frandsen et al., 2014; Dyce et al., 2019). Sua mucosa é constituída por epitélio de transição, com trígono vesical formado entre as aberturas uretéricas e uretral, e colo contínuo com a uretra caudalmente (Sisson e Grossman, 1986; König e Liebich, 2016; Dyce et al., 2019).

A uretra masculina é responsável pela eliminação de urina e sêmen. Apresenta dois segmentos distintos, um interno ou pélvico e um externo ou peniano. A primeira porção tem início no colo da bexiga urinária, no óstio uretral interno, passa pelo colículo seminal, e se estende até a abertura dos óstios das glândulas bulbouretrais. A segunda porção, situa-se num sulco na superfície ventral do corpo cavernoso, que deixa a cavidade pélvica e está amplamente incorporada ao interior do pênis, sendo considerada um componente peniano (Sisson e Grossman, 1986; König e Liebich, 2016; Dyce et al., 2019).

Em pequenos ruminantes a parte terminal da uretra projeta-se, comumente, cerca de três a quatro cm além da glândula do pênis, formando um processo uretral torcido (Sisson e Grossman, 1986; Frandsen et al., 2014). A uretra mais longa, tortuosa e de menor diâmetro no macho oferece maiores chances de obstrução. Fato relatado por Bailey (1981) que observou processos obstrutivos quase que exclusivamente em machos (99%).

A urolitíase constitui importante causa de perdas de ovinos, principalmente com idade inferior a seis meses (Mcintosh et al., 1974). À falta de estímulos hormonais faz com que os ovinos castrados em idade precoce, sejam mais susceptíveis à urolitíase devido ao menor diâmetro da uretra em relação aos não castrados (Pugh, 2004; Riet-Correa, 2007). No entanto, a ocorrência em machos não castrados já foi descrita por Riet-Correa (2007) e Guimarães et al. (2012). Dória et al. (2005) atribuem essas

ocorrências a fatores anatômicos, assegurando que a uretra longa, o curso da flexura sigmoide e o estreito processo uretral facilitam o aprisionamento, até mesmo de pequenos urólitos, na uretra dos machos (Figura 4).

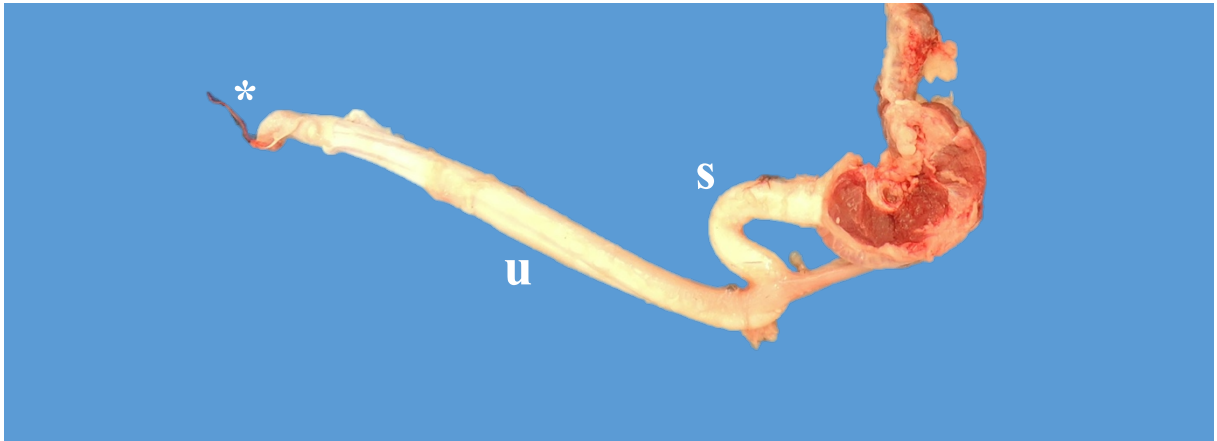


Figura 4. Porção distal do trato urinário de ovinos com uretra peniana longa e de pequeno diâmetro (u); flexura sigmoide (s) e processo uretral (*).

Fonte. Arquivo pessoal

Lôbo (2005) relatou que as raças Santa Inês e Dorper predominam nas criações do Nordeste, e Guimarães et al. (2012) notaram a ocorrência mais expressiva da urolitíase nessas raças. Hay e Suttle (1986), afirmaram que o risco de urolitíase pode ser determinado por variações raciais e por fatores intrínsecos de cada animal, estando relacionado a variações no metabolismo da água e na eficiência de absorção e retenção de minerais.

Os urólitos podem ser encontrados em qualquer região do trato urinário. Quando localizados na porção inferior, causam a retenção de urina que evolui para cistite e lesão da mucosa devido à ação compressiva dos urólitos sob a parede do órgão (Figura 5) (Confer e Panciera, 1998; Van Metre e Divers, 2006; Radostits et al., 2007; Riet-Correa, 2007; Riet-Correa et al., 2008; Vinodhkumar et al., 2010). O quadro clínico varia de acordo com a localização e grau de obstrução. A demora no atendimento é um dos fatores complicadores da enfermidade (Guimarães et al., 2012).

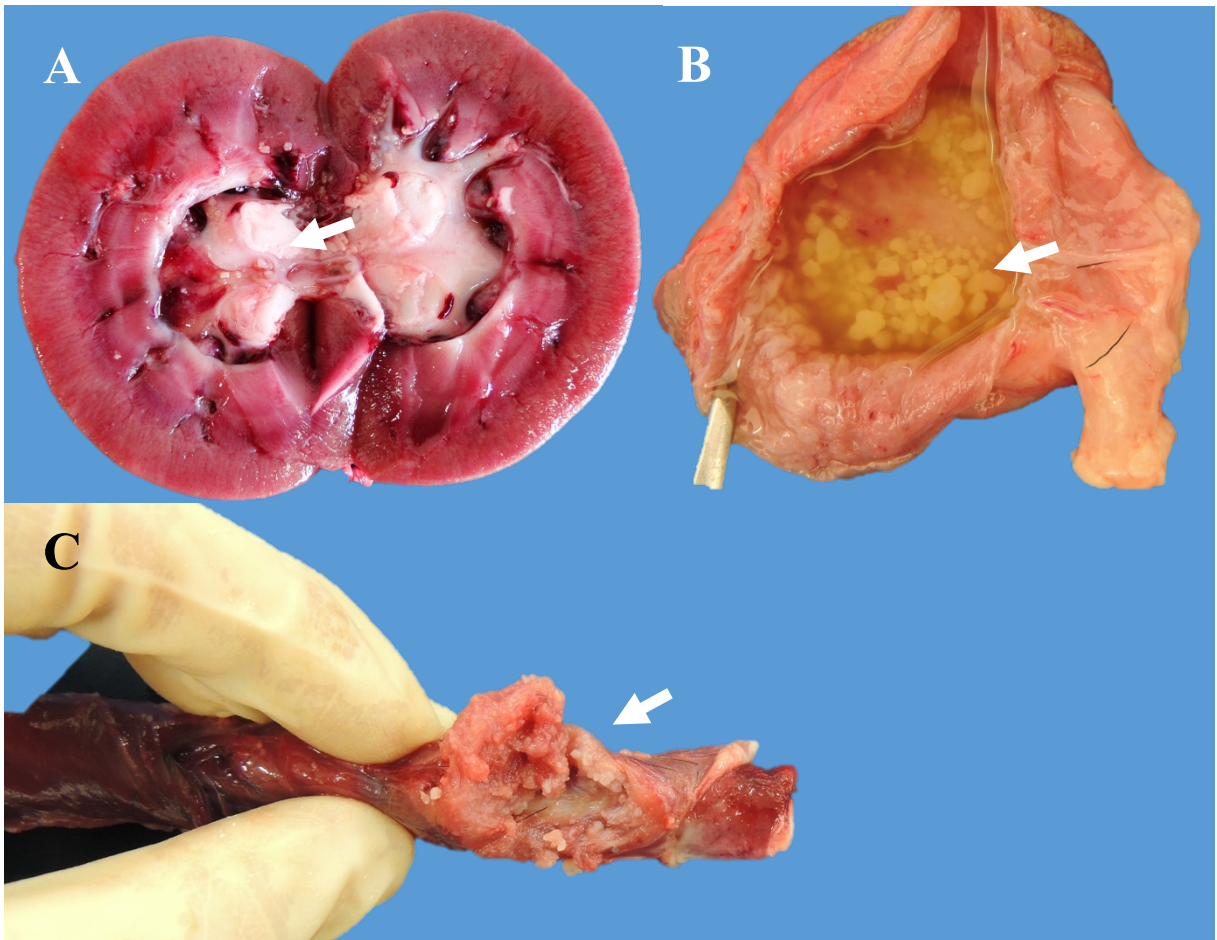


Figura 5. Deposição de urólitos em diferentes segmentos do trato urinário de ovinos.
A – pelve renal; B – bexiga urinária e C – uretra pélvica com ruptura (setas).
Fonte. Arquivo pessoal

A observação de sinais como edema extenso na região do prepúcio, períneo e testículo, além da ausência de micção, refletem maior gravidade e risco de insucesso do tratamento (Figura 6). A severidade dos sinais clínicos pode variar dependendo da localização da obstrução e se esta é completa ou parcial (Bruère e West, 1993). Hay e Suttle (1986), observaram cistite hemorrágica acompanhada por urólitos e uretrite.



Figura 6. Ovino com urolitíase e edema de prepúcio (seta).

Fonte. Arquivo pessoal

O aumento da pressão no interior da bexiga urinária, devido ao refluxo vesicoureteral, predispõe à pielite, pielonefrite e hidronefrose (Confer e Panciera, 1998; Coelho, 2002).

Peritonite ou celulite subcutânea são sequelas do uroperitônio tanto por ruptura da bexiga urinária ou da uretra, quanto por extravasamento em virtude da pressão no lúmen uretral provocada pela estase urinária (Figura 7) (Hay e Suttle, 1986; Radostits et al., 2007).

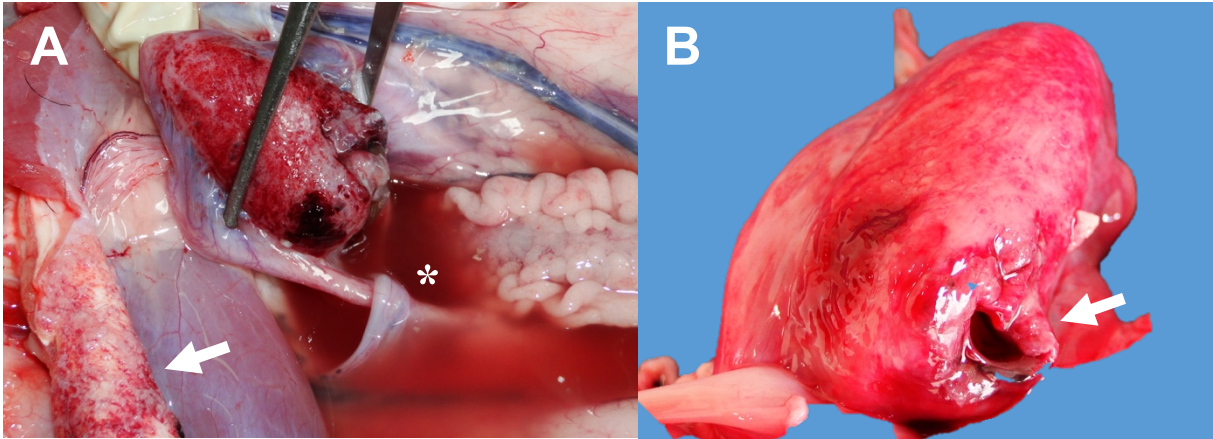


Figura 7. A – Urina na cavidade abdominal (*) e peritonite decorrente de uroperitônio (seta); B – bexiga urinária com ruptura parcial em sua porção dorsal (seta).
Fonte. Arquivo pessoal

Letalidade expressivamente maior foi descrita entre os ovinos que apresentavam obstrução total da uretra (Guimarães et al., 2012). Fato também observado por Donecker e Bellamy (1982), que relataram letalidade de 50,8% em bovinos com obstrução total da uretra e de 10,5% em bovinos com obstrução parcial.

2.3 Sinais clínicos

O quadro clínico varia entre animais de acordo com a localização, grau da obstrução, e duração da doença. De acordo com Riet-Correa et al. (2008), os primeiros sinais de urolitíase geralmente são anorexia e meteorismo. VinodhKumar et al. (2010) observaram agitação na fase inicial, e ranger de dentes após manifestação dos primeiros sinais (Figura 8).

Além disso, Riet-Correa et al. (2008) relataram sonolência, dor abdominal e à palpação da região peniana, escoiceamento dos membros torácicos e balançar da cauda, anúria ou hematúria após grande esforço para urinar, taquicardia, taquipneia e congestão de vasos episclerais (Figura 8D). O que demonstra que, com a evolução da doença, os sinais característicos da obstrução tornam-se evidentes e sua gravidade aumenta, como descrito por Guimarães et al. (2012), referindo-se aos ovinos atendidos na Clínica de Bovinos de Garanhuns, Pernambuco, e confirmando os prejuízos advindos da demora até o atendimento (Tiruneh, 2000).



Figura 8. Ovinos com urolitíase. A – mímica de micção improdutivo caracterizada por abdução de membros pélvicos e cauda erguida; B – prostração, evidenciada pelo decúbito lateral, associada a timpanismo; C – lambedura compulsiva de prepúcio como mímica de dor; D – conjuntiva ocular hiperêmica com ingurgitamento de capilares episclerais.

Fonte. Arquivo pessoal

Stuchi et al. (2010) relataram que no ano de 2008 atenderam, no Hospital Veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira, 40 ovinos de um lote de 80, com quadro clínico de urolitíase. Observaram, ainda, que estes animais apresentavam disúria, estrangúria, contrações da musculatura abdominal, dispneia, distensão de bexiga urinária, alteração da postura e cianose das mucosas da glândula e apêndice vermiforme, sugerindo hipóxia tecidual. Segundo Ortolani (1996), a manifestação de dor abdominal advém da síndrome cólica devido à dificuldade de micção. O estímulo da dor age diretamente no centro gástrico, o que provoca a anorexia e a depressão da motilidade das câmaras gástricas, o que justifica a presença de ovinos com apetite e motilidade ruminal diminuídos ou ausentes. A febre, taquicardia e taquipneia também podem estar relacionadas à dor, pois esta desencadeia a liberação de prostaglandina, adrenalina e noradrenalina que são mediadores destes processos

(Van Metre e Divers, 2006; Radostits et al., 2007). Além disso, há reação inflamatória provocada pela atividade irritativa dos urólitos nos tecidos que pode ser agravada por infecção bacteriana secundária (Confer e Panciera, 1998) e desencadear a liberação dos mediadores da inflamação (Van Metre e Divers, 2006).

O local em que o urólito aloja-se, no processo uretral, pode necrosar (Figura 9) Pugh (2004), e é possível haver ruptura da bexiga urinária ou da uretra, ocasionando a morte, em horas ou dias (Rogers, 2001). A desidratação observada está relacionada à ruptura de bexiga urinária e consequente sequestro de líquido para a cavidade abdominal (Donecker e Bellamy, 1982). Segundo Radostits et al. (2007), a ruptura de uretra ou extravasamento de urina para o tecido subcutâneo devido à distensão uretral excessiva causa edema e o prolapso de mucosa prepucial. A congestão de mucosas está relacionada à uremia decorrente da estase urinária (Confer e Panciera, 1998).

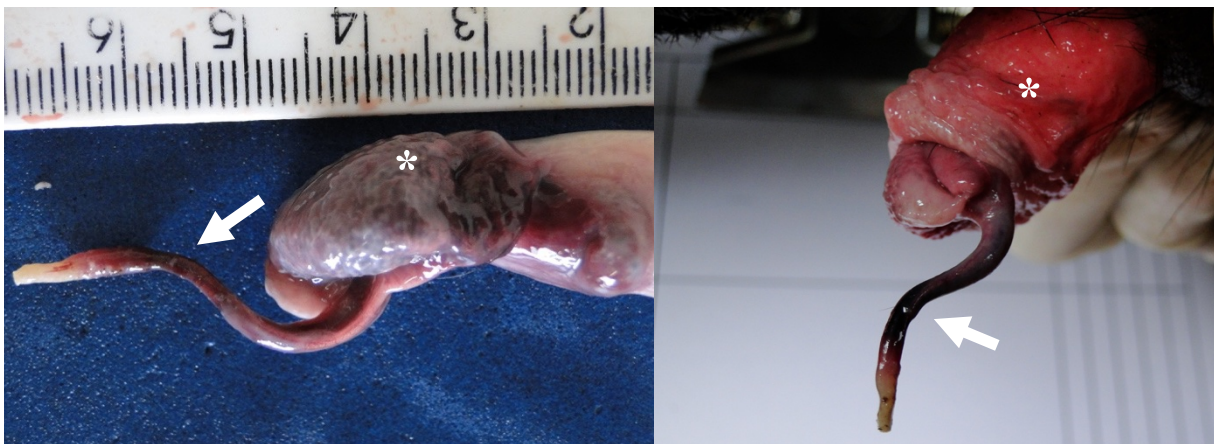


Figura 9. Necrose de processo uretral (setas) e congestão de glândula e prepúcio (*) decorrentes de obstrução por urólitos.

Fonte. Arquivo pessoal

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se principalmente na história e nos achados clínicos da urolitíase (Weeren et al., 1987; Pugh, 2004; Meneses et al. 2007; Radostits et al., 2007; Afonso e Guaraná, 2008; Riet-Correa et al., 2008; Stuchi et al., 2010). Mas, exames complementares podem auxiliar o diagnóstico e prognóstico da doença (Braun et al., 1992; Pugh, 2004). Destes, os exames laboratoriais: urinálise, bioquímica clínica, hemograma e a caracterização dos urólitos são os mais usados na

rotina das clínicas (Tiruneh, 2000; Tiruneh, 2006; Guimarães et al., 2007; Stuchi et al., 2010; Vinodhkumar et al., 2010).

2.5 Análises laboratoriais

No início da urolitíase a contagem de células sanguíneas encontra-se normal, mas, posteriormente ocorre leucocitose com desvio à esquerda (Navarre, 2007; Hunter et al., 2012). No entanto, VinodhKumar et al. (2010) e Guimarães et al. (2012) observaram linfocitopenia e hemoconcentração. De acordo com Pugh (2004) e Van Metre e Divers (2006), esses achados são comuns nos casos de infecção renal aguda, cistite e uretrite. A estase urinária e a reabsorção de ureia e creatinina provocam quadro de azotemia pós-renal (Coelho, 2002; Van Metre e Divers, 2006; Fettman e Rebar, 2007).

O funcionamento do sistema urinário pode ser avaliado por meio da urinálise (Garcia-Navarro, 1996). Significativa cristalúria foi encontrada por Smith e Sherman (2009) na análise do sedimento da urina de ovinos com urolitíase. Já Guimarães et al. (2012) observaram hematúria em mais de 80% de seus casos estudados. Tal condição é encontrada com frequência em casos de obstrução parcial da uretra (Pugh, 2004; Radostits et al., 2007; Riet-Correa, 2007; Riet-Correa et al., 2008; Vinodhkumar et al., 2010), provavelmente em decorrência das lesões provocadas pelos urólitos na mucosa do trato urinário (Confer e Panciera, 1998). A alta concentração de células epiteliais, eritrócitos, leucócitos, bactérias, muco ou cristais tornam a urina de aspecto turvo (Figura 10) (Garcia-Navarro, 1996; Hendrix, 2006).

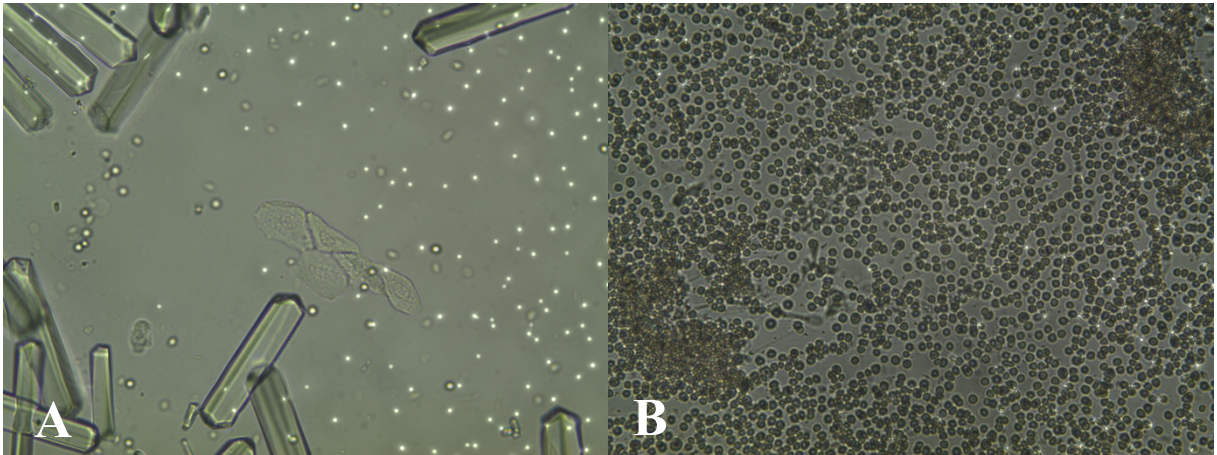


Figura 10. Análise do sedimento urinário. A – cristais de fosfato triplo e células epiteliais escamosas; B – hematúria.

Fonte. Arquivo pessoal

Elevação da creatinina, hipercalemia ou normocalemia, hiponatremia, hipocloremia e elevação das enzimas musculares aspartato aminotransferase e creatina quinase são achados laboratoriais frequentes na urolitíase (George et al., 2007). Concentrações dos íons Na^+ e K^+ dentro dos padrões de normalidade para a espécie ovina foram descritos por Ferreira et al. (2014) que registraram em suas pesquisas valores de 139 a 152 mmol/L e 3,9 a 5,4 mmol/L, respectivamente. Por outro lado, hiperclorêmia foi relatada por Kaneko et al. (2008) que observaram valores entre 95 a 103 mmol/L, possivelmente decorrente do cloreto de amônio que compunha a dieta experimental, visto que os níveis de Cl^- voltaram a normalidade após a interrupção.

A grave proteinúria observada na urolitíase ocorre como resultado da glomerulonefrite, nefrite intersticial, pielonefrite ou nefrose onde as proteínas atravessam a membrana glomerular e apenas as de baixo peso molecular são reabsorvidas (Garcia-Navarro, 1996). No entanto, cautela é necessária durante a interpretação de resultados quando há inflamações no trato urogenital, hemoglobinúria e hematúria, pois estas condições podem influenciar no teste e provocar resultados falso positivos de proteína (Dirksen et al., 1993; Garcia-Navarro, 1996; Pugh, 2004).

De acordo com Confer e Panciera (1998), o extravasamento de proteínas para o filtrado glomerular e para a urina reflete doença glomerular, enquanto que a glicosúria indica lesão tubular. Van Metre e Divers (2006) detalharam que, para haver

insuficiência renal, aproximadamente 75% dos néfrons de ambos os rins devem estar perdidos, o que provoca inadequada excreção de ureia e creatinina, proteinúria, glicosúria e aumento da celularidade do sedimento urinário. Guimarães et al. (2012) observaram altas dosagens de ureia e creatinina sem comprometimento da filtração renal da maioria dos ovinos avaliados (Coelho, 2002). Para os autores supracitados, tal fato se justifica pela estase urinária e consequente reabsorção da ureia e creatinina, o que caracteriza azotemia pós-renal e não por insuficiência renal. Essa conclusão é apoiada pelo fato das dosagens de glicose terem sido encontradas dentro dos parâmetros de normalidade, além disso, a proteinúria pode ter sofrido influência da significativa quantidade de leucócitos e de hemácias urinários.

VinodhKumar et al. (2010) constataram pH urinário entre 8,0 e 8,2 em ovinos com urolitíase. E estes resultados diferem dos descritos por Guimarães et al. (2012) que constataram acidúria. Garcia-Navarro (1996), Van Metre e Divers (2006) atribuem a acidúria, à dieta com grande quantidade de grãos, que provoca queda no pH.

Urólitos são agregados de material cristalino e matriz que se forma quando a urina se torna saturada com substâncias cristalogênicas e a análise de sua composição facilita a tomada de medidas profiláticas (Ulrich et al., 1996). Para Guimarães et al. (2012), a formação dos urólitos só constitui um problema quando esses causam obstrução que impede o fluxo urinário. Os urólitos podem ser classificados quanto a sua composição química, como: fosfato de amônia e magnésio hexahidratado (estruvita), e fosfato de cálcio (apatita), e de acordo com a sua localização: nefrólitos (renólitos), ureterólitos, urocistólitos e uretrólitos (Osborne e Clinton, 1986).

Segundo Pugh (2004), a composição do urólito geralmente é de sais de cálcio e complexos de fosfatos (apatita de cálcio, fosfato de cálcio diidratado, carbonato de cálcio, fosfato amônio magnésiano). Monaghan e Boy (1993) adicionaram ainda que a composição é frequentemente reflexo da dieta, que os urólitos são usualmente constituídos de sais de fosfato e especialmente de cálcio e de amônio magnésiano, este último apontado por Ribeiro (2007), como o principal tipo encontrado em pequenos ruminantes no Brasil. Mas ovinos que pastejam em áreas com plantas ricas em oxalatos e sílica podem desenvolver urólitos de oxalato (Pugh, 2004; Radostits et al., 2007).

2.6 Hemogasometria como auxílio diagnóstico e prognóstico de doenças

A preservação da vida animal depende de uma série de reações orgânicas para manutenção da homeostase e do correto funcionamento do organismo (Levrant et al., 1996; Almosny, 2003). O pH sanguíneo merece destaque, pois precisa permanecer dentro de limites estritos. Para que isso aconteça, o organismo utiliza três mecanismos: o tamponamento químico, especialmente pelo bicarbonato, o ajuste respiratório e a excreção de íons pelos rins. Enquanto os sistemas tampão e respiratório atuam em poucos minutos, os rins respondem lentamente ao excesso de ácido ou de base (Guyton e Hall, 2002; Houpt 2006), demonstrando a importância dos pulmões, intestinos, rins e fígado na manutenção desse equilíbrio (Quiroz-Rocha et al., 2000).

Uma série de doenças que se relacionam com o sistema urinário, digestório, respiratório e endócrino causam desequilíbrio ácido-básico dos ruminantes (Quiroz-Rocha et al., 2000; Ortolani, 2003). A acidose metabólica se caracteriza pela redução do pH e do bicarbonato sanguíneos, enquanto a alcalose metabólica por sua elevação. Nesses processos estão envolvidos mecanismos complexos nos quais os rins assumem papel primordial (Quiroz-Rocha et al., 2000; Martinelli, 2006; DiBartola, 2007). Na acidose respiratória, há aumento da $p\text{CO}_2$ causado por hipoventilação alveolar, o oposto ocorre na alcalose respiratória (Almosny, 2003; DiBartola, 2007).

Embora muitas situações que causam desequilíbrio ácido-básico proporcionem poucos transtornos ao organismo, por serem transitórias ou devidamente compensadas pelo animal, em determinadas circunstâncias a correção do desequilíbrio é essencial para a sobrevivência. Uma forma de avaliação rápida e prática do estado ácido-básico dos animais é a análise hemogasométrica do sangue (Figura 11) (Sucupira e Ortolani, 2003). O exame fornece resultados das $p\text{O}_2$, $p\text{CO}_2$, pH, HCO_3^- , $t\text{CO}_2$, e EB.



Figura 11. A – Amostra de sangue da espécie ovina refrigerada para exame hemogasométrico; B – hemogasometria em aparelho portátil OPTI CCA-TS.

Fonte. Arquivo pessoal

Segundo González e Silva (2017) os valores hemogasométricos normais para a espécie ovina são pH (7,28 a 7,42), HCO_3^- (19 a 25), EB (-4 a 2) e pCO_2 (37 a 42). Levraut et al. (1996) relataram que o sangue arterial, coletado sob anaerobiose em heparina sódica e refrigerado, compõe o material ideal para a análise hemogasométrica rápida. No entanto, Sucupira e Ortolani (2003) demonstraram que o sangue venoso também reflete com precisão o estado ácido-básico, diferindo apenas quanto à pCO_2 e à pO_2 que são maiores no sangue venoso e arterial respectivamente. Ortolani (2003) e DiBartola (2007) sugeriram que após coleta deve-se avaliar inicialmente o pH, o qual indicará o quadro de acidose ou alcalose, e em seguida, identificar o parâmetro que está alterado e caracterizar como metabólico ou respiratório. Um fator considerado, por muitos anos, como limitante na realização desse exame é o curto tempo de processamento das amostras pós coleta. No entanto, Leal et al. (2010) comprovaram viabilidade e confiabilidade de análise na espécie ovina em até 24 horas após a coleta, desde que mantido sob refrigeração (0 a 4°C), e Lisbôa et al. (2001) demonstraram semelhante viabilidade para a espécie bovina por até seis horas, desde que mantido em banho de água gelada (0 a 4°C).

2.7 Proteínas de Fase Aguda na predição das doenças

A inflamação aguda ocorre como resposta fisiológica do organismo à infecção ou injúria, na tentativa de manter a integridade tecidual e limitar os danos locais (Gruys et al., 2006). No entanto, o monitoramento dessa resposta pode ser desafio ao médico veterinário porque os sinais da inflamação nem sempre se manifestam clinicamente. As PFA são constituídas por glicoproteínas sintetizadas pelos hepatócitos como resposta à injúria tecidual, e são encontradas na circulação sanguínea (Murata et al., 2004; Jacobsen, 2007). Por esses motivos, quando comparadas a outras variáveis, tais como hipertermia e a presença de leucocitose associados à neutrofilia, são consideradas biomarcadores precoces mais efetivos da resposta inflamatória sistêmica (Jain, 1989).

A resposta aguda é uma reação inespecífica do hospedeiro que ocorre rapidamente após a injúria tecidual. Tem início quando há liberação de produtos do metabolismo fosfolipídico e peptídeos, ou citocinas pelos tecidos lesionados e, como resultado, há aumento da síntese hepática de PFA, que são importantes limitadores da inflamação e da regulação da resposta imune (Gruys et al., 2006; Eckersall e Bell, 2010). Baseando-se nos princípios de eletroforese, as proteínas séricas são classificadas em α , β e γ globulinas, estando as PFA incluídas nas categorias α e β . Entre elas estão o fibrinogênio, a haptoglobina, a ceruloplasmina, a amiloide A sérica, a proteína C reativa e a α -1glicoproteína ácida (Meyer e Harvey, 2004). De acordo com Kjelgaard-Hansen e Jacobsen (2011) deve haver aumento de pelo menos 25% nas concentrações séricas de PFA durante o processo inflamatório. Essa elevação deve ocorrer no início da doença inflamatória ou infecciosa e permanecer até que haja resposta ao tratamento, só então seus níveis passam a diminuir. Tal comportamento permite demonstrar sua capacidade não apenas diagnóstica, como biomarcador precoce da inflamação, mas também de prognóstico e de tratamento (Martínez-Subiela et al., 2003).

Há vários métodos para a determinação das concentrações séricas das PFA disponíveis (Céron et al., 2005). De acordo com Simplício et al. (2013, 2015) e Sabes et al. (2017), a eletroforese em gel de poliácridamida é excelente forma de quantificar as PFA devido aos seus diferentes pesos moleculares que permitem o fracionamento

das mesmas ao longo do gel. De acordo com esses autores, embora o fibrinogênio plasmático tenha sido a PFA mais comumente utilizada na clínica médica de ruminantes, outras PFA apresentam excelente valor preditivo como a haptoglobina, ceruloplasmina e α -1glicoproteína ácida em diferentes enfermidades, e portanto, precisam ser investigadas.

2.8 Morfologia na avaliação de processos patológicos

A morfologia e morfometria têm sido utilizadas como metodologia laboratorial para ampliar os conhecimentos das alterações das estruturas dos órgãos, tecidos e células, em animais de laboratório, contribuindo para os esclarecimentos e os avanços das ciências (Cotrim et al., 1990; Pardini e Assis, 2005).

Pesquisas têm sido realizadas para avaliar as alterações morfológicas e morfométricas sofridas pelos órgãos, tecidos e células em decorrência de doenças que acometem os diferentes sistemas orgânicos (Rodrigues et al., 1998; Pereira et al., 2002; Rech et al., 2006; Duarte et al. 2007; Melo, 2007; Lima et al., 2010). Dentre elas, várias incluem diferentes aspectos morfométricos do sistema urinário ovino, tais como enfermidades do desenvolvimento fetal (Peters et al., 1991; Shibata et al., 2001; Thiruchelvam et al., 2003), enfermidades materno-fetais (Gibson et al., 2007), influência de doenças infecciosas, como a brucelose (Carvalho-Júnior et al., 2012), manipulação do desenvolvimento pós-natal (Kibria et al., 2016) e comparação de determinadas estruturas em diferentes idades (Belotta et al., 2017). Não foram encontrados estudos morfométricos do trato urinário em ovinos acometidos por urolitíase, até o momento. Como a análise morfométrica fornece suporte à avaliação macroscópica e histopatológica, por meio da contagem e mensuração de estruturas de interesse, sugere-se que estudo morfométrico do sistema urinário de ovinos poderá contribuir com aprimoramento de parâmetros diagnósticos e de prognósticos na urolitíase.

3. Referências

- Afonso JAB, Guaraná ELS (2008) Urolitíase em pequenos ruminantes. **Jornal do Conselho Regional de Medicina Veterinária de Pernambuco: Veterinária e Zootecnia** 1:7-8.
- Almosny N (2003) Equilíbrio ácido-básico em medicina veterinária. In: González FHD, Campos R (Ed.) **Anais de Patologia Veterinária da região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 5-16.
- Assis ACOT, da Silva R, de Aguiar GMN, de Melo DB, de Almeida FC, Medeiros JM, da Nóbrega Neto PI (2009) Urolitíase obstrutiva em bovinos no semiárido. **Ciência Animal Brasileira** 1:41-45.
- Bailey CB (1981) Silica metabolism and silica urolithiasis: A review. **Canadian Journal Animal Science** 61:219-235.
- Belknap EB, Pugh DG (2002) Diseases of the urinary system. In: Pugh DG (Ed.) **Sheep & Goat Medicine**. Philadelphia: Saunders, p. 267-271.
- Belotta AF, Santarosa BP, Ferreira DOL, Carvalho SMF, Gonçalves RC, Padovani CR, Mamprim MJ (2017) Portal vein dopplerflowmetry in healthy sheep according to age. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37:1172-1176.
- Bradley GK (2015) Cunningham Tratado de fisiologia veterinária. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 624 p.
- Braun U, Schefer U, Föhn J (1992) Urinary tract ultrasonography in normal rams and in rams with obstructive urolithiasis. **Canadian Veterinary Journal** 33:654-659.
- Bruère NA, West DM (1993) The sheep: Health, disease and production. Palmerston North (New Zealand): Massey University, 397 p.
- Campos AG, Daneze ER, Terra Júnior JA, Barbosa ABR, Sliuzas GRS, Silva AA, Terra SA (2013) Estudo ultrassonográfico morfométrico do fígado e trato biliar de suínos submetidos a obstrução biliar experimental. **Radiologia Brasileira** 2:89-95.
- Carvalho-Júnior CA, Moustacas VS, Xavier MN, Costa EA, Costa LF, Silva TMA, Paixão TA, Borges AM, Gouveia AMG, Santos RL (2012) Andrological pathologic morphometric and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. **Small Ruminant Research** 102:213–222.
- Céron JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S (2005) Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology** 34:85–96.
- Coelho HE (2002) Patologia Veterinária. São Paulo: Manole, 234 p.

Confer AW, Panciera RJ (1998) Sistema urinário, In: Carlton WW, Mcgavin MD (Eds.) **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 228-260.

Cotrim AEI, Pardi PC, Sakumoto S, Simões MJ (1990) Morfometria e estereologia: algumas considerações gerais. **Acta Cirúrgica Brasileira** 5:28-30.

Del Claro GR, Zanetti MA, Correa LB, Netto AS, Paiva de FA, Salles MS (2006) Balanço cátion-aniônico da dieta no metabolismo de cálcio em ovinos. **Ciência Rural** 36:222-228.

DiBartola SP (2007) Anormalidades de fluidos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico na clínica de pequenos animais. 3 ed. São Paulo: Roca, 664 p.

Dirksen G, Gründer HD, Stöber M (1993) Rosenberger, exame clínico dos bovinos. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 419 p.

Donecker JM, Bellamy JEC (1982) Blood abnormalities in cattle with ruptured bladders and urethras. **Canadian Veterinary Journal** 23:355-357.

Dória RGS, Canola PA, Dias DPM, Pereira RN, Valadão CAA (2007) Técnicas cirúrgicas para urolitíase obstrutiva em pequenos ruminantes: relato de casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 59:1425-1432.

Dória RGS, Canola PA, Pereira RN, Dias DPM, Canola JC (2005) Urolitíase obstrutiva em Caprino: relato de 2 casos. **Revista da Universidade Rural** 25:371-372.

Duarte CA, Cattelan JW, Lucas FA, Godoy GS, Malheiros EB, Oliveira D, Baraldi-Artini SM (2007) Aspectos morfométricos da cicatrização do cólon descendente de equinos submetidos a enterorráfias aposicionais com poliglactina 910 e com cianoacrilato. **Arquivos de Veterinária** 59:49-55.

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG (2019) Tratado de anatomia veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 872 p.

Eckersall PD, Bell R (2010) Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal** 185:23-27.

Ferreira DOL, Santarosa BP, Moraes LF, Takahira RK, Amorim RM, Chiacchio SB, Gonçalves RC (2011) Avaliação da acidificação urinária em ovinos com cloreto de amônio, vitamina C e associação destes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA. Florianópolis: 38.

Ferreira DOL, Santarosa BP, Sacco SR, Dias A, Amorim RM, Chiacchio SB, Lisbôa JAN, Gonçalves RC (2014) Efeito da suplementação de cloreto de amônio sobre os equilíbrios eletrolítico e ácido-básico e o pH urinário de ovinos confinados. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 34:797-804.

Fettman MJ, Rebar A (2007) Avaliação da função renal. In: Thrall MA (Ed.) **Hematologia e Bioquímica Veterinária**. Roca: São Paulo, p. 285-310.

Frandsen RD, Wilke WL, Fails AD (2014) Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 413 p.

Garcia-Navarro CEK (1996) Manual de urinálise veterinária. São Paulo: Livraria Varela, 95 p.

George JW, Hird DW, George LW (2007) Serum biochemical abnormalities in goats with uroliths: 107 cases (1992–2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 230:101-106.

Gheller V (2008) Abordagens laparoscópicas em pequenos ruminantes. **Ciência Veterinária dos Trópicos** 11:52-55.

Gibson KJ, Boyce AC, Karime BM, Eugenie R (2007) Lumbars maternal renal insufficiency alters plasma composition and renal function in the fetal sheep. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** 292:1204–1211.

González FHD, Silva SC (2017) Introdução à bioquímica clínica veterinária. 3 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 538 p.

Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ, Van Dijk E, Muelen RH (2006) Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica** 108:229-232.

Guimarães JA, Dantas AC, Camara ACL, Afonso JAB, Mendonça CL, Costa NA, Souza MI (2007) Achados clínicos e bioquímicos (uréia e creatinina) na urolitíase obstrutiva em ovinos. **Archives of Veterinary Science** 12:127-129.

Guimarães JA, Mendonça CL, Guaraná ELS, Dantas AC, Costa NA, Câmara ACL, Farias CC, Afonso JAB (2012) Estudo retrospectivo de 66 casos de urolitíase obstrutiva em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32:824 – 830.

Guyton AC, Hall JE (2002) Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 918 p.

Hay LA, Suttle NF (1986) Urolithiasis. In: Jensen R (Ed.) Diseases of Sheep. Oxford: Lea & Febiger, p. 250-253.

Hendrix CM (2006) Urinálise. In: Hendrix CM (Ed.) **Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários**. 4ª ed. São Paulo: Roca, p. 227-268.

Haupt TR (2006) Equilíbrio ácido-básico In: Reece WO (Ed.) **Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 147-160.

Hunter BG, Huber MJ, Riddick TI (2012) Laparoscopic-assisted urinary bladder marsupialization in a goat that developed recurrent urethral obstruction following perineal urethrostomy. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 241:778-781.

Jacobsen S (2007) Review of equine acute-phase proteins. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS Orlando: University of Florida, 53:230-235.

Jain NC (1989) Acute phase proteins. In: Kirk RW (Ed.) **Current veterinary therapy X: small animal practice**. Philadelphia: Saunders, p.468-471.

Jones ML (2006) **The use of dietary cation anion difference for the reduction of urine pH in goats**. 63 f. Thesis (Master of Science) – Oklahoma University State, Stillwater, Oklahoma.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (2008) Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6 ed. Academic: San Diego, 916 p.

Kibria GASM, Rahman ML, Ahasan LASM, Uddin MM, Quasem MA (2016) Effects of castration on penile and urethral development in black bengal goat. **Pakistan Journal of Zoology** 48:501-506.

Kjelgaard-Hansen M, Jacobsen S (2011) Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. **Clinics in Laboratory Medicine** 31:51-70.

König HE, Liebich H (2016) Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. 6 ed. Porto Alegre: Artmed 824 p.

Leal MLR, Soares PC, Cyrillo FC, Benesi FJ (2010) Influence of refrigeration on blood gas parameters of caprine venous blood. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 47:105-110.

Levrant J, Labib Y, Chave S, Payan P, Rauncoles, Aime M, Grimaud D (1996) Effect of sodium bicarbonate on intracellular pH under different buffering conditions. **Kidney International**. 49:1262-1267.

Lima PA, Barbosa FO, Melo LQ, Machado Neto OR, Costa SF (2010) Morfometria ruminal de novilhos da raça red norte alimentados com caroço de algodão e vitamina E. In: REUNIÃO REGIONAL DA SBPC. Lavras. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/lavras/resumos/676.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

Lisbôa JAN, Benesi FJ, Maruta CA, Mirandola RMS, Teixeira CMC (2001) Tempo de viabilidade de amostras de sangue venoso bovino destinadas ao exame hemogasométrico, quando mantidas em sob conservação em água gelada. **Ciência Rural** 31:271- 276.

Lôbo RNB (2005) **Sistema de produção de caprinos e ovinos de corte para o nordeste brasileiro: raças. Sistemas de Produção**. Embrapa Caprinos, Sobral. Versão Eletrônica.

Martinelli R (2006) Equilíbrio ácido-básico e hidroeletrolítico. In: Penildo S (Ed.) **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 711-716.

Martínez-Subiela S, Tecles F, Céron JJ (2003) Critical differences of acute phase proteins in canine serum samples. **Veterinary Journal** 166:233–237.

Mcintosh GH, Pulsford MF, Spencer WG, Rosser H (1974) A study of urolithiasis in grazing ruminants in south Australia. **Australia Veterinary Journal** 50:345- 350.

Melendez P, Era O, Risco C (2007) Urinary bladder rupture, urolithiasis, and azotemia in a Brangus Bull: a herd approach. **Bovine Practitioner** 41:121-128.

Melo LQ (2007) **Morfologia ruminal e efeito do pH e do volume da digesta sobre a absorção de ácidos graxos voláteis**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Meneses DCR, Feitosa Júnior FS, Quessada AM, Pereira HM, Silva SV, Neiva CB, Guimarães ALS, Oliveira LL (2007) Fistulação da bexiga para tratamento de urolitíase obstrutiva em caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica** 1:89-93.

Meyer DJ, Harvey JW (2004) Pasma proteins In: Meyer DJ e Harvey JW (Eds.) **Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis** 3 ed. Missouri: Saunders Elsevier, p. 146-168.

Monaghan NL, Boy LG (1993) Sistema renal de ruminantes. In: Smith B (Ed.) **Tratado de Medicina Interna de grandes animais**. v1. São Paulo: Manole. p.894-899.

Morais MV (2012) **Estudo clínico-epidemiológico da urolitíase obstrutiva em caprinos e ovinos**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Murata H, Shimada N, Yoshioka M (2004) Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal** 168:28-40.

Navarre CB (2007) Urolithiasis in Goats. In: PROCEEDINGS OF THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE. p.134-135.

Ortolan MDDV, Pacheco MR, Girardi AM, Silva MHM, Baraldi-Artoni SM, Barreiro FR (2010) Avaliação morfométrica dos túbulos contorcidos proximais de ratos diabéticos tratados com NEEM (*Azadirachta indica*, A. Juss) e estrepto-zootocina 6 CH. **Nucleus Animalium** 2:79-91.

Ortolani EL (1996) Intoxicação e doenças metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica, urolitíase e toxemia da prenhez In: Silva Sobrinho AG, Batista AMV, Siqueira ER, Ortolani EL, Susin I, Coelho Da Silva JF, Teixeira JC, Borba MFS (Eds.) **Nutrição de Ovinos**. Jaboticabal: FUNEP, p. 241-258.

Ortolani EL (2003) Diagnóstico e tratamento de alterações ácido-básicas em ruminantes. In: **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária do Rio Grande do Sul** p.15-29.

Osborne CA, Clinton CW (1986) Urolithiasis: terms and concepts. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practices** 16:3-17.

Osborne CA, Sanna JJ, Unger LK, Clinton CW, Davenport MP (1989) Analyzing the mineral composition of uroliths from dogs, cats, horses, cattle, sheep, goats, and pigs. **Veterinary Medicine** 84:750-764.

Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR (1998) Acidosis in cattle: a review. **Journal Animal Science** 75:727-735.

Packett LV, Hauschild JP (1964) Phosphorus, calcium and magnesium: relationship in ovine urolithiasis. **Journal Nutrition** 84:185-190.

Packett LV, Lineberger RO, Jackson HD (1968) Mineral studies in ovine phosphatic urolithiasis. **Journal Animal Science** 27:1716-1721.

Pagnano LO, Baraldi-Artoni SM, Pacheco MR, Santos E, Oliveira D, Lui JF (2008) Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula. **Ciência Rural** 6:1662-1666.

Pardini LC, Assis GF (2005) Metodologia básica: morfometria e estereologia (conhecimentos básicos). **Revista Brasileira de Teleodontologia** 1:17-24.

Pereira ME, Silveira AF, Silveira SO (2002) Diferentes dietas no desenvolvimento histológico de papilas ruminais de bezerros da raça holandesa. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia** 9:143-154.

Peters CA, Docimo SG, Luetic T, Reid LM, Retik AB, Mandell J (1991) Effect of in utero vesicostomy on pulmonary hypoplasia in the fetal lamb with bladder outlet obstruction and oligohydramnios: a morphometric analysis. **The Journal of Urology** 46:1178-1183.

Pugh DG (2004) Clínica de Ovinos e Caprinos. São Paulo: Roca 513p.

Quiroz-Rocha GF, Bouda J, Ochoa LN (2000) Determinação de transtornos ácido-básicos. In: González FHD, Borges JB, Cecim M (Eds.) **Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 35-38 p.

Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2007) Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10 ed. Edinbourg: Saunders 2156 p.

Rech RR, Rissi DR, Rodrigues A, Pierezan F, Piazer JVM, Kommers GD, Barros CSL (2006) Intoxicação por *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e morfometria das lesões cerebelares. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 26:183-189.

- Reche Júnior A, Hagiwara MK (2001) Histopatologia e morfometria da bexiga de gatos com doença idiopática do trato urinário inferior (DITUI). **Ciência Rural** 31:1045-1049.
- Reece WO (2017) Dukes fisiologia dos animais domésticos. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1594 p.
- Ribeiro S (2007) Urolitíase em ovinos. Disponível em: <<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=1571>>.
- Riet-Correa F (2007) Outras doenças In: Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JRJ (Eds.) **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. vol. 2. 3 ed. Santa Maria: Pallotti p. 623-684.
- Riet-Correa F, Simões SDV, Vasconcelos JS (2008) Urolitíase em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 28:319-322.
- Rodrigues APR, Amorim CA, Lucci CM, Figueiredo de JR, Gonçalves PBD, Bem de AR (1998) Folículos pré-antrais caprinos isolados mecanicamente em diferentes estágios reprodutivos e parâmetros morfométricos ovarianos. **Ciência Rural** 28:471-476.
- Rogers P (2001) Urinary calculi in lambs and calves. **Irish Veterinary Journal** 39:86-90.
- Sabes AF, Girardi AM, Fagliari JJ, Oliveira JA, Marques LC (2017) Serum proteinogram in sheep with acute ruminal lactic acidosis. **International Journal of Veterinary Science and Medicine** 5:35-40.
- Samuelson DA (2007) Tratado de histologia veterinária. Rio de Janeiro: Elsevier, 527 p.
- Sasahara THC (2006) **Efeito da obstrução parcial da uretra na bexiga urinária de coelhos: estudo morfométrico e estereológico**. 59 f. Dissertação (Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – FMVZ, USP, São Paulo.
- Sato H, Omori S (1977) Incidence of urinary calculi in goats fed a high phosphorus diet. **Japanese Journal of Veterinary Science** 39:531-537.
- Shahrom MS, Zamri-Saad M (2011) Urolithiasis in boer bucks. **Journal Tropic Agriculture Sciency Pertanika** 34:363-366.
- Shibata S, Shigeta M, Shu Y, Watanabe T, Nagata M (2001) Initial pathological events in renal dysplasia with urinary tract obstruction in útero. **Virchows Archiv** 439:560–570.
- Silva LP, Lourenço MLG, Paula RA, Verdugo MR, Pereira KHNP, Chiacchio SB (2018) Assessment of serum lactate levels, blood glucose values and blood gas values in sheep, newborn lambs and placenta. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38:1878-1884.

Simplício KMMG, Sanchez DCC, Rocha TG, Cotrim FS, Silva PC, Fagliari JJ (2015) Proteínas de fase aguda em ovinos portadores de enfermidades agudas de ocorrência natural. **Revista Investigação Medicina Veterinária** 14:67-73.

Simplício KMMG, Sousa FC, Fagliari JJ, Silva PC (2013) Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos saudáveis e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 65:1339-1347.

Sisson S, Grossman JD (1986) **Anatomia dos animais domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1134 p.

Smith MC, Sherman DM (1994) **Goat medicine**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins. 620 p.

Smith MC, Sherman DM (2009) **Goat medicine**. 2 ed. Ames: Wiley-Blackwell, 869 p.

Stewart SR, Emerick RJ, Pritchard RH (1990) High dietary calcium to phosphorus ratio and alkali-forming potential as factors promoting silica urolithiasis in sheep. **Journal of Animal Science** 68:498-503.

Stewart SR, Emerick RJ, Pritchard RH (1991) Effects of dietary ammonium chloride variations in calcium to phosphorus ratio on silica urolithiasis in sheep. **Journal of Animal Science** 69:2225-2229.

Stuchi RDS, Vicarivento NB, Bovino F, Peiró JR, Feitosa FLF, Cadioli FA, Ferreira GM, Peres LCT, Mendes LCN (2010) Urolitíase em ovinos-Relato de 40 casos. *Veterinária e Zootecnia*. In: 1º SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E IX SEMANA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP- CAMPUS DE ARAÇATUBA. Botucatu, p. 55.

Sucupira MCA, Ortolani EL (2003) Uso de sangue arterial e venoso no exame do equilíbrio ácido-básico de novilhos normais ou com acidose metabólica. **Ciência Rural** 33:863-868.

Swenson MJ (1996) **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856 p.

Takagi H, Block E (1991) Effects of manipulating dietary cation-anion balance on macromineral balance in sheep. **Journal Dairy Science** 74:4202-4214.

Thiruchelvam N, Nyirady P, Peebles DM, Fry CH, Cuckow PM, Woolf AS (2003) Urinary outflow obstruction increases apoptosis and deregulates Bcl-2 and Bax expression in the fetal ovine bladder. **American Journal of Pathology** 4:1271-1282.

Tiruneh RA (2000) Retrospective study on ruminant urethral obstruction in Debre Zeit Area, Ethiopia. **Revue Médicine Veterinaire** 151:855-860.

Tiruneh RA (2006) Ruminant urolithiasis in Ethiopia: alterations of mineral concentrations in bovine urine and sheep sera according to the geographic origin or the diet regimen. **Reveu Medicine Veterinary** 157:261-164.

Trueman NA, Stacy BD (1969) Ovine urolithiasis: some mineralogic and physiologic observations. **Investigative Urology** 4:185-191.

Tuasaude. **Eletroforese de Proteínas: para que serve e como entender o resultado**. Disponível em: <<https://www.tuasaude.com/eletroforese-de-proteinas/>>. Acesso em: 12 set. 2019.

Ulrich L, Bird KA, Hoehler LA, Swanson L (1996) Urolith analysis: submission, methods and interpretation. **Veterinary Clinics of North America: Small Practices** 26:393-400.

Van Metre D C, Divers TJ (2006) Urolitíase. In: Smith BP (Ed.) **Medicina interna de grandes animais**. 2 ed. São Paulo: Manole, p. 853-860.

Vinodhkumar OR, Swarnkar CP, Shinde AK, Singh D (2010) Clinical, mineral and haemato-biochemical studies of urolithiasis in wearner lambs. **African Journal Agricultural Research** 5:2045-2050.

Weeren RV, Klein WR, Voorhout G (1987) Urolithiasis in small ruminants an retrospective evaluation of urethrostomy. **The Veterinary Quarterly** 9:76-79.

Wen Z, Pan X, Xu Z, Zou X (2011) Effect of dietary cottonseed meal on the occurrence of urolithiasis in Chinese merino Sheep from Xinjiang region (China): A pilot study. **Journal of Animal and Veterinary Advances** 10:1383-1388.

CAPÍTULO 2 – Predictive Elements of Obstructive Urolithiasis in Sheep¹

Thiago Arcoverde Maciel¹, Clédson Calixto de Oliveira², José Augusto Bastos Afonso³,
Rinaldo José de Souto Maior Júnior⁴, José Jurandir Fagliari⁵, Luís Antônio Mathias⁶, Daniela
Oliveira⁷, Silvana Martinez Baraldi Artoni⁸ & Lizandra Amoroso⁸

*Article based on a Thesis submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the PhD Degree. ¹Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV) & ²Programa de residência multiprofissional em clínica e cirurgia de grandes animais do Hospital Veterinário da UFCG, Patos, PB, Brasil. ³Clínica de Bovinos de Garanhuns (CBG) & ⁴Laboratório de Anatomia e Patologia Animal, Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), UFRPE, Garanhuns, PE, Brasil. ⁵Instituto Federal de Alagoas (IFAL), Santana do Ipanema, AL, Brasil. ⁶Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, ⁷Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal & ⁸Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil. CORRESPONDENCE: T. A. Maciel [arcoverde.thiago@hotmail.com - Tel.: +55 (83) 3511-3125 / (87) 9 9906-2083]. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV) – UFCG. Avenida Universitária S/N - Bairro Santa Cecília - Cx Postal 61 -Patos/PB CEP: 58708-110, Campina Grande, PB, Brazil.

ABSTRACT

Background: Urolithiasis is an economically important disease that has considerable significance for sheep farming. With the tissue and biochemical changes resulting from the development of this disease, metabolic disorders and immune response are established. Hemogasometric evaluation allows the identification of systemic acid-base imbalances quickly. Acute phase proteins (APP) have in the last two decades had become the biomarkers of choice in human and veterinary medicine. To date, no biomarker studies have been published for sheep with urolithiasis. Thus, this study aimed to analyze the hemogasometric kinetics in urolithiasis in sheep and the APP that can be used as early biomarkers in this disease.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista Acta Scientiae Veterinariae (ISSN 1679-9216), 47: 1698, 2019.

Materials, Methods & Results: In this study, 14 healthy male Santa Inês sheep, aged approximately 90 days, were fed on calculogenic diet for 120 days. The sheep were examined weekly to observe the clinical signs. Blood and urine analysis were also performed. For comparative analysis purposes, at the end of the experiment, sheep that developed urolithiasis were extracted from the initial experimental group D₁ (without urolithiasis) and moved to the second experimental group D₂ (with urolithiasis). In the pre-experimental period and on the day of slaughter, venous blood was sampled for hemogasometric tests, with a maximum time of 15 minutes between collection and analysis to ensure the reliability of the results obtained. The pH, pCO₂, pO₂, EB, tCO₂, HCO₃⁻, stHCO₃⁻, tHb, sO₂ and Hct, Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ ions were quantified. To identify and measure immunoglobulins (A and G) and APP, samples from sheep that developed urolithiasis (D₂) were analyzed. Blood samples were harvested weekly until the clinical manifestation of the disease, totaling 16 samples, of with IgA, IgG, ceruloplasmina (101kDa), transferrin (75kDa), α1-antitrypsin (60kDa), haptoglobina (44kDa) and α1-acid glycoprotein (38kDa) concentrations were measured. Elevation of pCO₂ was observed between D₁ and D₂, but there was a significant difference ($P < 0.05$) only in the final moments (FMs). Although EB, tCO₂, HCO₃⁻, stHCO₃⁻ increased between moments in the same group and between groups at the same time, significant differences were recorded only in the FMs. Higher values were observed for Na⁺, K⁺ in the FMs. The APP of sheep that developed the disease oscillated between moments, however, significant difference ($P < 0.05$) over time was observed only in haptoglobin and transferrin.

Discussion: The disease occurred in five of the 14 studied sheep, demonstrating the effectiveness of the formulated diet in inducing the disease. Through the analysis of blood gases, plasma bicarbonate concentration and excess base or deficit it was possible to diagnose disturbances in acid base balance, characterizing a picture of metabolic alkalosis in sheep with

urolithiasis. Mean pH was not significantly different between groups, but sheep that developed urolithiasis had alkalosis. Final values of $t\text{CO}_2$ and HCO_3^- indicate the compensatory organic response, that which, together with the analysis of the averages of HCO_3^- and EB, reflect the metabolic alkalosis picture. The APP have different responsiveness among them. Haptoglobin and transferrin were the most reliable biomarkers among the studied APP to predict urolithiasis, with transferrin showing atypical behavior, characteristic of positive APP.

Keywords: Urinary tract, acid-base balance, transferrin, haptoglobin, small ruminants.

INTRODUCTION

Monitoring the inflammatory response is a challenge because the signs of inflammation are not always clear [27]. Hemogasometry is an important technique for assessing acid-base balance in various diseases, capable of clarifying severity and predicting clinical evolution [15,26,28]. However, in the acute phase of disease, it may not detect changes suggestive of inflammatory process [1].

Acute phase proteins are early markers of inflammation, capable of providing an alternative means of monitoring animal health, in addition to those commonly used in clinical routine, such as blood count and biochemistry [12]. There is a difference in responsiveness of different APP due to varied inflammatory stimuli. During the acute phase response, the serum concentration of these proteins changes dramatically [3].

Although the feasibility of venous blood samples for hemogasometric examination is short [15] compared to APP dosing [27], both analysis may provide diagnostic and prognostic information if adequate sampling time is warranted [19,28].

Due to the clinical, surgical and economic importance of urolithiasis in sheep, besides the scarcity of studies on hemogasometric kinetics [8] and on acute phase proteins in urinary disorders [5,7], added to the inexistence of studies on APP in this disease, this study aims to analyze the behavior of these variables in urolithiasis disease in sheep and APP that can be used as early biomarkers to predict the development of this disease.

MATERIALS AND METHODS

Animals used

Fourteen healthy male (non-castrated) Santa Inês sheep, approximately 90 days old, were used. To maintain animal health and prevent interference from other diseases, parasitological examinations, control of endoparasites with oral sulfaquinoxaline (Sulfaquinoxaline)¹ and sodium closantel (Diantel 10%)² and vaccination against clostridiosis (Poly-Star)³ were performed in the pre-experimental period (15 days).

Facilities, diets and experimental groups

Sheep were confined in the small ruminant experimentation pen of Garanhuns Academic Unit (UAG), of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), in individual masonry pens, 2.0 m x 1.0 m, throughout the experimental period. Natural source water was supplied in plastic containers to measure daily consumption. In the pre-experimental phase, the animals received a balanced diet (Table 1), and subsequently, there was a gradual decrease in the roughage: concentrate ratio for 15 days to adapt the rumen microbiota.

Starting the experiment, the sheep received, for 90 days, experimental diet with calculogenic potential, Ca/P ratio 1:2 (Table 1). After this period, the diet was modified to obtain a 1:3 Ca/P ratio, provided for 30 days. Diets were fed fractionally at two times, at 8 and 14 hours, in plastic troughs with dimensions of 50x20x30 cm, and the leftovers were weighed daily to determine consumption.

Table 1. Percent composition of experimental diets.

Ingredient	Pre-experimental diet Roughage/conc. (70/30) Ca/P ratio (1.9:1)	Experimental diet Roughage/conc. (30/70) Ca/P ratio (1:3)
Tifton ₈₅ Hay	70	30
Crushed corn	18.05	56.07
Soybean meal	10	9.6
Anhydrous Dibasic Sodium Phosphate (disponibility 95,4%)	-	2.2
Mineral supplement *	1,5	1.5

* Ovinofós® Mineral Salt: Zinc (3,800.00 mg), Sodium (147,00 g), Manganese (1,300,00 mg), Cobalt (40,00 mg), Iron (1,800,00 mg), Copper (590,00 mg), Sulfur (18.00 g), Selenium (15.00 mg), Iodine (80.00 mg), Chromium (20.00 mg), Molybdenum (300.00 mg), Calcium (120.00 g), Fluorine (max – 870.00 mg), Phosphorus (87.00 g).

The total confinement period of 119 days was established to ensure urolith formation. For the purpose of comparative analysis, at the end of the experiment those that developed urolithiasis were extracted from the initial experimental group D₁ (without urolithiasis), and moved to started a second group D₂ (with urolithiasis).

For experimental safety, the feed ingredients were submitted to bromatological analysis, and the water, to its chemical composition analysis.

Clinical evaluation and sample collection

The sheep were examined daily, which allowed the immediate identification of urolithiasis [6].

Samples of 2 mL of jugular vein blood with sodium heparin were harvested from all sheep in the pre-experimental period (IM) and on the day of slaughter (FM) for the performance of hemogasometric tests [28] following the care of sample conservation [16]. The maximum time elapsed between collection and blood gas analysis was 15 minutes.

To identify and measure APP with predictive value for urolithiasis, we analyzed the samples of sheep that developed the disease (D₂). Blood samples were harvested from all individuals weekly until clinical manifestation of the disease, totaling 16 samples. All blood collections were performed prior to feeding between 6 h and 8 h. To this end, blood was collected by jugular venipuncture after local antisepsis, using vacuum tubes⁴ without anticoagulant. After blood coagulation, the samples were centrifuged for ten minutes. The obtained serum was separated by aspiration, and 1 mL aliquots were stored in 2 mL plastic tubes⁵ and frozen at -20°C until processing.

Hemogasometric analysis

The pH, pCO₂, pO₂, EB, tCO₂, HCO₃⁻, stHCO₃⁻, tHb, sO₂ and Hct were measured in a blood gas analyzer with electrolyte measurement⁶. In addition to these, it was determined Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ ion values using specific cassette according to the manufacturer's recommendations [4,24]. After the introduction of the blood aliquot in the hemogasometer, the hemoglobin and

temperature values were corrected, since the standard value of the device is related to the human species.

Determination of serum concentrations of acute phase proteins

APP analysis were performed at the Research Support Laboratory of the Department of Veterinary Clinic and Surgery (UNESP-Jaboticabal). Serum total protein (TP) concentrations were obtained by the biuret method, with the aid of reagent kits⁷ in a semi-automatic biochemical analyzer. Protein fractionation was performed by polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). After fractionation, the gel was stained for 10 min in Coomassie Blue solution, followed by washing in 7% acetic acid solution to remove excess dye until the protein fractions became clear. The concentration of these proteins was determined by means of a computerized densitometer⁸. As a reference, a marker solution with molecular weights 29,000, 45,000, 66,000, 97,400, 116,000 and 205,000 daltons (Da) was used, as well as purified proteins⁹ - IgA, IgG, ceruloplasmin, transferrin, albumin, α 1-antitrypsin, haptoglobin and α 1-acid glycoprotein.

Statistical analysis

For hemogasometric analysis, a comparison was made between two groups. Data from each group were subjected to the Shapiro-Wilk normality test. With normality ($P > 0.05$), the two groups were compared by parametric tests. Initially, the variances were compared using the F test. If the variances were equal ($P > 0.05$), both groups were compared using the t test; if not, the groups were compared by the Welch test. When data were not normal, the comparison

was performed by means of the Wilcoxon rank sum test. Significant difference was considered when $P < 0.05$. Analyzes were performed using the R software.

For the analysis of APP an evaluation of the effect of time was made. To this end, it was used the methodology of longitudinal data analysis (repeated measures over time) by nonparametric ANOVA [2]. The analysis was performed using the nparLD package, software R.

RESULTS

During the 119 days of the experimental period, five of the 14 sheep manifested total obstructive urolithiasis. At the onset of clinical signs, appetite was not affected but was reduced or absent after 24 hours. The disease was clinically manifested by: apathy or restlessness, strangury, contraction and abdominal kicking with exposure and penis licking, postural changes (back arching, pelvic limbs abduction and raised tail), congested glans and urethral process and areas of necrosis and rigid to palpation, as well as discomfort and sensitivity to the urogenital tract examination. Different degrees of ruminal repletion were observed, ranging from moderately empty to full, and decreased motility. Meteorism was observed in only one of the sheep. Emphasis should be given to the depraved appetite (gnawing cuttings and stall walls) observed in some sheep.

There was dehydration in all sheep, but in varying degrees (from mild to severe), enophthalmia and slightly congested conjunctivae, slight elevation of heart and respiratory rates (124 ± 19 beats/min. and 60 ± 35 movements/min., respectively) revealing a mild metabolic alkalosis. Penile urethral rupture occurred in only one animal, which presented anuria, edema and tenderness to palpation of the ventroabdominal region (from xiphoid cartilage to scrotal

region) and swollen foreskin preventing exposure of the penis, as well as vocalization, bruxism and digging movements.

The hemogasometric findings confirmed the $p\text{CO}_2$ elevation observed between the initial moment (IM) (39.6 ± 3.65) and the final moment (FM) (41.6 ± 3.78) in the group of sheep with urolithiasis, however, significant difference ($P < 0.05$) was found only when there was a comparison between groups in the FMs (healthy 36.33 ± 4.18 , and affected 41.6 ± 3.78). The EB analysis showed elevation between moments in the same group and between groups at the same moment, with significant difference ($P < 0.05$) for FM (healthy 1.34 ± 3.22 , and affected 6.9 ± 3.67) between groups. This behavioral pattern was also observed for $t\text{CO}_2$ (healthy 26.2 ± 3.47 , and affected 32.24 ± 3.58), HCO_3^- (healthy 25.06 ± 3.37 , and affected 30.98 ± 3.55) and stHCO_3^- (healthy 25.44 ± 2.61 , and affected 30.16 ± 3.20), with significant differences only in the FMs. Although there was no significant difference between Na^+ , K^+ and Ca^{2+} ions at the moments or groups, higher values were observed at the final moments for sodium and potassium, with an increase in sodium values and a decrease in potassium and calcium concentrations between IM and FM (Table 2).

Table 2. Mean and standard deviation of hemogasometric profile of venous blood of young male sheep, submitted to calculogenic diets (n = 14).

Parameters	D ₁ (without urolithiasis) (n = 9)	D ₂ (with urolithiasis) (n = 5)	P (t/Welch test)	P (nonparametric test)
IM pH	7.39 ± 0.04	7.42 ± 0.05	0.21	-
FM pH	7.45 ± 0.03	7.49 ± 0.05	0.14	-
IM pCO ₂	40.44 ± 3.43	39.6 ± 3.65	0.67	-
FM pCO ₂	36.33 ± 4.18	41.6 ± 3.78	0.04*	-
IM pO ₂	36.11 ± 3.76	32.2 ± 7.01	0.20	-
FM pO ₂	37.22 ± 4.47	40 ± 9.11	0.46	-
IM EB	-1.04 ± 1.36	0.42 ± 2.24	0.15	-
FM EB	1.34 ± 3.22	6.9 ± 3.67	0.01*	-
IM tCO ₂	25.06 ± 1.15	26.08 ± 2.04	0.25	-
FM tCO ₂	26.2 ± 3.47	32.24 ± 3.58	0.01	0.02*
IM HCO ₃ ⁻	23.82 ± 1.13	24.88 ± 2.03	0.23	-
FM HCO ₃ ⁻	25.06 ± 3.37	30.98 ± 3.55	0.01	0.02*
IM st HCO ₃ ⁻	23.23 ± 1.03	24.64 ± 1.88	0.09	-
FM st HCO ₃ ⁻	25.44 ± 2.61	30.16 ± 3.20	0.01*	-
IM tHb	13.79 ± 0.59	13.46 ± 1.20	0.50	-
FM tHb	12.68 ± 1.05	10.18 ± 3.97	0.23	0.06
IM sO ₂	-	-	-	0.67
FM sO ₂	70.13 ± 4.05	75.75 ± 7.27	0.11	-
IM Ht	41.33 ± 1.80	40.4 ± 3.78	0.54	-
FM Ht	38.11 ± 3.06	36.6 ± 3.85	0.43	0.42
IM Na ⁺	138.78 ± 32.94	149.4 ± 2.07	0.36	1.0
FM Na ⁺	148.56 ± 1.13	151 ± 4.85	0.33	0.63
IM K ⁺	4.49 ± 0.57	4.74 ± 0.60	0.45	-
FM K ⁺	3.68 ± 0.26	4 ± 1.06	0.54	-
IM Ca ⁺	1.29 ± 0.10	1.17 ± 0.14	0.12	-
FM Ca ⁺	0.56 ± 0.07	0.68 ± 0.19	0.24	-

IM – Initial Moment

FM – Final Moment

D₁ – without urolithiasis

D₂ – with urolithiasis

* Significant difference between groups ($P < 0,05$).

pCO₂ (mmHg), pO₂ (mmHg), EB (mmol/L), tCO₂ (mmol/L), HCO₃⁻ (mmol/L), tHb (g/dL), sO₂ (%), Ht (%), Na⁺ (mmol/L), K⁺ (mmol/L), Ca⁺ (mmol/L).

The IgA and IgG and APP analysis of sheep that developed urolithiasis showed a temporal oscillation behavior of the means (Tables 3 and 4). IgA showed peak concentration at M5 (39.86 ± 8.45) and lowest value at M14 (10.99 ± 5.92). IgG increased from M0 (1,286.80 ± 459.01) to M8 (1,698.25 ± 315.03), starting to oscillate and decreasing at M15 (1586.67 ±

674.06). Ceruloplasmin had lower means at M0 (30.76 ± 10.74) and M9 (30.50 ± 12.03), with similar values, but with substantial elevation and peak at M12 (68.90 ± 18.32), decreasing until M15 (67.70 ± 73.00), when it presented new elevation. Already α_1 -antitrypsin and α_1 -acid glycoprotein maintained close average values between M0 (244.60 ± 94.44 and 64.60 ± 35.41) and M15 (313.00 ± 129.98 and 59.63 ± 41.09) respectively.

Table 3. Acute phase protein kinetics in healthy young male sheep until clinical manifestation of urolithiasis (D_2 - $n = 5$).

	Ceruloplasmin (mg/dL)	α_1 -antitrypsin (mg/dL)	α_1 -acid glycoprotein (mg/dL)	Haptoglobin* (mg/dL)	Transferrin* (mg/dL)
M0	30.76 ± 10.74	244.60 ± 94.44	64.60 ± 35.41	13.34 ± 2.45	351.00 ± 52.36
M1	39.74 ± 19.24	159.00 ± 115.44	66.04 ± 44.48	32.94 ± 25.36	359.50 ± 40.07
M2	58.38 ± 34.26	150.40 ± 148.22	74.04 ± 29.11	123.78 ± 92.10	395.20 ± 84.71
M3	39.52 ± 4.69	237.80 ± 155.38	56.60 ± 27.23	30.28 ± 32.70	391.40 ± 61.66
M4	39.78 ± 13.05	203.60 ± 124.18	50.24 ± 18.36	7.62 ± 2.11	400.40 ± 57.99
M5	41.22 ± 13.25	208.00 ± 121.74	50.60 ± 24.71	18.66 ± 27.40	432.00 ± 59.55
M6	56.82 ± 20.90	199.20 ± 120.22	48.40 ± 31.64	131.48 ± 52.39	508.00 ± 61.48
M7	43.06 ± 15.99	201.60 ± 121.20	50.38 ± 26.90	8.07 ± 6.91	510.80 ± 70.94
M8	35.52 ± 19.11	260.50 ± 38.17	57.10 ± 31.74	5.39 ± 3.88	486.50 ± 89.89
M9	30.50 ± 12.03	254.50 ± 114.73	41.15 ± 23.72	7.26 ± 3.12	536.75 ± 90.48
M10	39.06 ± 15.65	305.00 ± 112.60	72.70 ± 44.45	6.80 ± 4.62	520.33 ± 125.43
M11	58.70 ± 26.55	255.66 ± 40.50	65.76 ± 42.16	13.88 ± 7.86	559.00 ± 43.55
M12	68.90 ± 18.32	267.33 ± 72.52	61.46 ± 45.08	40.84 ± 42.06	585.67 ± 85.29
M13	54.76 ± 30.32	259.00 ± 57.58	66.70 ± 37.24	77.56 ± 55.33	490.00 ± 157.77
M14	45.53 ± 14.18	262.00 ± 72.18	63.96 ± 38.33	46.61 ± 57.45	588.00 ± 87.50
M15	67.70 ± 73.00	313.00 ± 129.98	59.63 ± 41.09	69.50 ± 96.08	599.66 ± 98.05

D_2 - with urolithiasis

Data presented as mean \pm standard deviation.

* Variables with significant time effect: Transferrin ($P = 0.0061$) and Haptoglobin ($P = 0.0276$).

Other variables without significant effect of time ($P > 0.05$).

Table 4. Serum immunoglobulin A (IgA) and IgG concentrations (mg/dL) in healthy young male sheep until clinical manifestation of urolithiasis (n = 5).

	IgA	IgG
M0	37.48 ± 14.65	1286.80 ± 459.01
M1	30.62 ± 21.77	1371.80 ± 278.97
M2	32.20 ± 28.70	1780.20 ± 861.19
M3	32.08 ± 29.62	1676.60 ± 367.69
M4	31.60 ± 12.25	1571.00 ± 179.14
M5	39.86 ± 8.45	1596.00 ± 174.05
M6	25.82 ± 14.13	1602.40 ± 139.05
M7	32.16 ± 20.97	1615.80 ± 155.81
M8	24.65 ± 11.19	1698.25 ± 315.03
M9	15.60 ± 6.42	1541.75 ± 182.47
M10	14.99 ± 6.49	1649.67 ± 432.49
M11	26.93 ± 7.36	1522.67 ± 238.04
M12	39.16 ± 20.04	5674.33 ± 7176.02
M13	19.43 ± 0.70	1561.67 ± 298.87
M14	10.99 ± 5.92	1661.33 ± 389.42
M15	29.90 ± 15.69	1586.67 ± 674.06

Data presented as mean ± standard deviation.

Variables without significant effect of time ($P > 0.05$).

Significant difference ($P < 0.05$) could be noted in haptoglobin, which showed large oscillations over time, with peaks at three moments, M2 (123.78 ± 92.10), M6 (131.48 ± 52.39) and M13 (77.56 ± 55.33), and lowest value recorded in M8 (5.39 ± 3.88). Similarly, transferrin showed a significant increase from M3 (400.40 ± 57.99) to M7 (510.80 ± 70.94), and occasional decreases in values, as recorded in M13 (490.00 ± 157.77), but with minimum and maximum values at M0 (351.00 ± 52.36) and M15 (599.66 ± 98.05), respectively (Fig. 1).

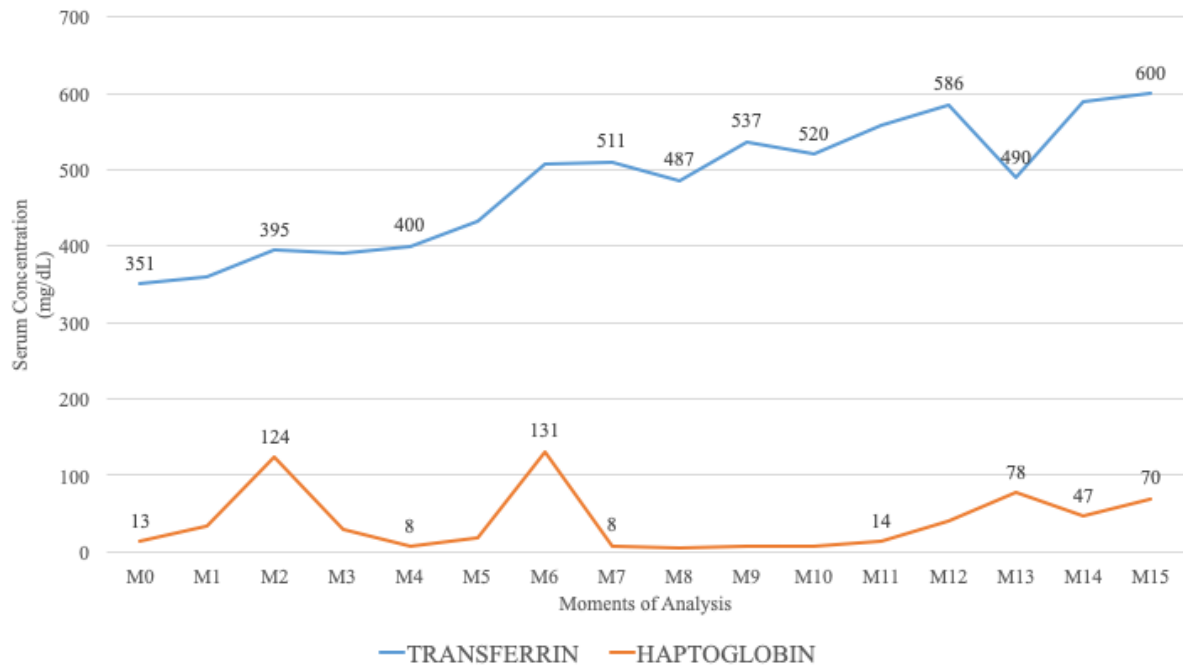


Figure 1. Temporal evolution of haptoglobin and transferrin in healthy sheep until clinical manifestation of urolithiasis.

DISCUSSION

The symptoms observed in the present study for sheep that manifested the clinical picture of urolithiasis is in agreement with the reports of other authors [18,23,25]. Symptoms are due to the release of prostaglandins, adrenaline and noradrenaline after urinary stasis and pain [22,30]. Thus, to evaluate the systemic effects of this disease on blood gas variables, healthy sheep (D.) were compared with those that developed the disease (D.).

The harvesting of jugular blood proved to be effective in reflecting the metabolic status and acid-base balance when compared to the arterial, presenting even easier sampling in ruminants [28]. The methodology of this experiment used the maximum time of 15 minutes for the hemogasometric analysis, deadline already established [16]. Researchers demonstrated the viability of bovine venous blood stored in a cold water bath for up to six hours after harvesting for this examination, and may extend to sheep for up to 24 hours [15].

Hemogasometry provides information that reflects acid-base balance quickly and practically through blood gas analysis, plasma bicarbonate concentration, and base excess or deficit [9]. The mean recorded pH (7.4 ± 0.05) showed no significant difference between groups, but based on the reference values described [11] the sheep that developed urolithiasis had alkalosis.

The averages observed for HCO_3^- and EB were higher than those described (19 to 25 mmol/L and -4.0 to 2.0 mmol/L) respectively [11], and reflect the installed metabolic alkalosis in sheep with urolithiasis, also observed in goats [10,14].

Metabolic alkalosis can settle in different situations. A consequent digestive disturbance, anorexia and cessation of rumination, as well as diseases that result in tubular injury that cause accumulation of blood bicarbonate [21], conditions that could justify such elevations in the group with urolithiasis.

The average recorded for pCO_2 in FMs (41.6 ± 3.78) in sheep with urolithiasis showed a significant difference in the comparison between groups, but with values close to the described upper limit of normality (37 to 42 mmHg) [11]. Unfeasibility of generalizing blood gas analysis between ruminant species can be verified when compared with the goat species. Goat normality data for tCO_2 [20] were higher than those proposed for sheep in Brazil (19 to 26 mmol/L) [21].

In this study, the final tCO_2 values observed in the urolithiasis group (32.24 ± 3.58) were higher than the normal range recorded for the species. And it was found that the higher the bicarbonate contents IM (24.88 ± 2.03) and FM (30.98 ± 3.55), the higher the tCO_2 , IM (26.08 ± 2.04) and FM (32.24 ± 3.58) values, a fact also observed for bovine species [28]. These findings, together with the pCO_2 values reflect the compensatory organic response due to the installed metabolic alkalosis, in which the organism tends to retain CO_2 . The difference between

bicarbonate and $t\text{CO}_2$ concentrations in this study was between 1 and 2 mmol/L, indicating correct sample conditioning and anaerobic maintenance [13].

Mean sodium values for the urolithiasis (149.4 ± 2.07 and 151 ± 4.85) and potassium (4.74 ± 0.60 and 4 ± 1.06) groups in IM and FM respectively were within normal range for sheep (139 to 152 mmol/L and 3.9 to 5.4 mmol/L) [8,13].

The APP have different species responsiveness based on the inflammatory stimulus that has settled, becoming in the last two decades the biomarkers of choice in human medicine and, by extension, in veterinary medicine. Acid α 1-glycoprotein was considered effective as a biomarker for early diagnosis in monitoring the prognosis of sepsis [31], such potential has been proved in cattle with mastitis and photosensitization [27]. Moreover, they demonstrated the sensitivity of ceruloplasmin and haptoglobin in cattle with mastitis, photosensitization and onfalophlebitis.

Some biomarkers have already been used for the early evaluation of urinary injuries such as Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and fetuin-A in humans [17]. Since haptoglobin, ceruloplasmin and albumin, among other acute phase proteins, were increased in camels with urinary tract infection, the authors recommend the investigation of these biomarkers in other species [7].

To date, no early biomarker studies for sheep with urolithiasis have been reported. Thus, we investigated ceruloplasmin, albumin, α 1-antitrypsin, α 1-acid glycoprotein, haptoglobin and transferrin, and immunoglobulins (A and G) in an attempt to identify other biomarkers besides those already studied [7] for urinary tract infections. Haptoglobin and transferrin were the most reliable biomarkers among APP studied in this species to predict urolithiasis.

Although transferrin is classified as negative APP, it was elevated until urolithiasis manifested. Similar behavior has been observed in chickens [29,32], and although this

mechanism remains unexplained so far, it is believed to be involved in passive immunity, which aids host nonspecific defenses against microbial challenges.

CONCLUSIONS

The formulated diet was effective in inducing the disease and can be used as an experimental model in future research.

Hemogasometric evaluation of bases and venous blood gases showed alterations in urolithiasis, which lead to acid-base imbalance, characterized by metabolic alkalosis with an attempt to compensate by retaining CO₂.

Hemogasometric evaluation allowed to evaluate gravity of clinical state, but not help in prediction of disease.

Haptoglobin and transferrin were sensitive biomarkers for urolithiasis in sheep, with transferrin presenting atypical behavior characteristic of positive APP.

MANUFACTURERS

¹Vansil Saúde Animal. Descalvado, SP, Brazil.

²Hipra Saúde Animal. Porto Alegre, RS, Brazil.

³Vallé S.A. São Paulo, SP, Brazil.

⁴BD Vacutainer. São Paulo, SP, Brazil.

⁵Eppendorf do Brasil, Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

⁶OPTI CCA-TS. São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁷Labtest. Lagoa Santa, MG, Brazil.

⁸Shimadzu CS 9301-PC. Tokio, Japan.

®Sigma. St. Louis, EUA.

Ethical approval. All methodology adopted for the development of the present research was submitted and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, under protocol number 13726/2012-97.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 **Birgel D.B. 2013.** Estudo da anemia em ovinos decorrente de verminose gastrintestinal. 118f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós - Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 2 **Brunner E. & Langer F. 2000.** Nonparametric analysis of ordered categorical data in designs with longitudinal observations and small sample sizes. *Biometrical Journal*, 42(6): 663-675.
- 3 **Ceciliani F., Ceron J.J., Eckersall P.D. & Sauerwein H. 2012.** Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics*. 75(140): 4207– 4231.
- 4 **Clark L.C. 1956.** Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Transactions of the American Internal Organs*. 2(1): 41-48.

- 5 **Ding H., He Y., Li K., Yang J., Li X., Lu R. & Gao W. 2007.** Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clinical Immunology*. 123(2): 227-234.
- 6 **Dirksen G., Gründer H.D. & Stöber M. 1993.** *Rosenberger, exame clínico dos bovinos*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 419p.
- 7 **El-Deeb W. M. & Buczinski S. 2015.** The diagnostic and prognostic importance of oxidative stress biomarkers and acute phase proteins in Urinary Tract Infection (UTI) in camels. *PeerJ - The Journal of Life and Environmental Sciences*. 3(4): 1363.
- 8 **Ferreira D.O.L. 2013.** Modelo experimental de urolitíase em ovinos: estudo clínico, laboratorial e hemogasométrico. Botucatu, SP. 199p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- 9 **Ferreira D.O.L., Santarosa B.P., Sacco S.R., Dias A., Amorim R.M., Chiacchio S.B., Lisbôa J.A.N. & Gonçalves R.C. 2014.** Efeito da suplementação de cloreto de amônio sobre os equilíbrios eletrolítico e ácido-básico e o pH urinário de ovinos confinados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34(8): 797-804.
- 10 **George J.W., Hird D.V. & George, L.W. 2007.** Serum biochemical abnormalities in goats with uroliths: 107 cases (1992-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 230(1): 101-106.
- 11 **González F.H.D. & Silva S.C. 2017.** *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 3 ed. – Porto Alegre: Editora da UFRGS, 538p.
- 12 **Jain S., Gautam V. & Naseem S. 2011.** Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 3(1): 118-127.

- 13 **Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. 2008.** *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6 ed. San Diego: Academic Press, 916p.
- 14 **Kinjavdekar P., Amarpal H.P., Aithal A.M., Pawde K.P., Singh T. & Singh K. 2005.** Management of urolithiasis in goats (*Capra hircus*): a retrospective study of 25 cases. *Indian Journal Animal*. 39(1): 8-13.
- 15 **Leal M.L.R., Soares P.C., Bertagnon H.G., Silva P.E.G. Ortolani E.L. & Benesi F.J. 2006.** Efeito da refrigeração sobre o exame hemogasométrico em sangue venoso de ovinos. *Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia*. 43(Supl.): 80-85.
- 16 **Lisbôa J.A.N., Mirandola R.M.S., Benesi F.J., Maruta C.A., Mirandola R.M.S. & Teixeira C.M.C. 2001.** Tempo de viabilidade de amostras de sangue venoso bovino destinadas ao exame hemogasométrico, quando mantidas sob conservação em água gelada. *Ciência Rural*. 31(2): 271-276.
- 17 **Mishra J., Ma Q., Prada A., Mitsnefes M., Zahedi K., Yang J., Barasch J. & Devarajan P. 2003.** Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *American Society of Nephrology*. 14(10): 2534–2543.
- 18 **Morais de M.V. 2012.** Estudo clínico-epidemiológico da urolitíase obstrutiva em caprinos e ovinos. 60 f. Recife, PE. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- 19 **Murata H., Shimada N. & Yoshioka M. 2004.** Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*. 168(1): 28–40.
- 20 **Nunes T.L., Oliveira M.G.C., Paiva A.L.C., Bezerra T.C.G., Barrêto Júnior R.A. & Paula V.V. 2014.** Valores hemogasométricos e eletrolíticos de caprinos (*Capra*

- hircus*) da raça Canindé criados no semiárido nordestino. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 36(3): 255-260.
- 21 **Ortolani E.L. 2003.** Diagnóstico e tratamento de alterações ácido-básicas em ruminantes. In: Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil (Porto Alegre, Brasil). p.15-29.
- 22 **Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007.** Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10 ed. Edinbourg: Saunders, 2156p.
- 23 **Riet-Correa F., Simões S.D.V. & Vasconcelos J.S. 2008.** Urolitíase em caprinos e ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(6): 319-322.
- 24 **Severinghaus J.M. & Bradley A.F. 1958.** Eletrodes for PO₂ e PCO₂ determination. *Annals of Applied Physiology*. 13(3): 515-520.
- 25 **Shahrom M.S. & Zamri-Saad M. 2011.** Urolithiasis in boer bucks. *Journal Tropic Agriculture SciencyPertanika*, 34(2): 363-366.
- 26 **Silva L.P., Lourenço M.L.G., Paula R.A., Verdugo M.R., Pereira K.H.N.P. & Chiacchio S.B. 2018.** Assessment of serum lactate levels, blood glucose values and blood gas values in sheep, newborn lambs and placenta. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38(9): 1878-1884.
- 27 **Simplicio K.M.M.G., Sousa F.C., Fagliari J.J. & Silva P.C. 2013.** Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65(5): 1339-1347.

- 28 **Sucupira M.C.A. & Ortolani E.L. 2003.** Uso de sangue arterial e venoso no exame do equilíbrio ácido-básico de novilhos normais ou com acidose metabólica. *Ciência Rural*. 33(5): 863-868.
- 29 **Tohjo H., Miyoshi F., Uchida E., Niiyama M., Syuto B., Moritsu Y., Ichikawa S. & Takeuchi M., 1995.** Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of chicken serum in acute inflammation induced by intramuscular injection of turpentine. *Poultry Science*. 74(4): 648– 655.
- 30 **Van Metre D.C. & Divers T.J. 2006.** Urolitíase. In: Smith B. P. (Ed.), *Medicina Interna de Grandes Animais*. 2 ed. São Paulo: Manole, pp. 853-860.
- 31 **Xiao K., Longxiang S., Peng Y., Bingchao H., Jia L., Huijuan W., Yanhong J., Xin L. & Lixin X. 2015.** α -1-Acid glycoprotein as a biomarker for the early diagnosis and monitoring the prognosis of sepsis. *Journal of Critical Care*. 30(4): 744-751
- 32 **Xie H., Huff G.R., Huff W.E., Balog J.M., Holt P. & Rath N.C. 2002.** Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. *Poultry Science*. 81(1): 112–120.

CAPÍTULO 3 – Sheep urinary tract architecture is affected by acute urethral obstruction?²

Thiago Arcoverde Maciel^{a*}, Clédson Calixto de Oliveira^b, Millena de Oliveira Firmino^c, Lismara Castro do Nascimento^e, Luís Antônio Mathias^f Silvana Martinez Baraldi Artoni^e, Daniela Oliveira^d, Lizandra Amoroso^e

a – Academic Unit of Veterinary Medicine (UAMV), UFCG/PATOS. Avenida Universitária s/n 58708-110 – Patos, PB, Brazil, +55 (83) 3511-3125.

b – Multiprofessional residency program in large animal clinic and surgery at UFCG/Patos Veterinary Hospital. Avenida Universitária s/n 58708-110 – Patos, PB, Brazil, +55 (83) 3511-3125.

c – Veterinary Medicine Graduate Program, Animal Pathology Laboratory UFCG/Patos. Avenida Universitária s/n 58708-110 – Patos, PB, Brazil, +55 (83) 3511-3125.

d – Academic Unit of Garanhuns – UAG/UFRPE. Avenida Bom Pastor, s/n 55292-270 – Garanhuns, PE, Brazil, +55 (87) 3764-5505.

e – Department of Animal Morphology and Physiology, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Access Road Prof. Paulo Donato Castellane, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil.

f – Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Reproduction, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Access Road Prof. Paulo Donato Castellane, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil.

² Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Research in Veterinary Science (ISSN 0034-5288), e encontra-se em avaliação para publicação.

* Author for Correspondence. Tel: +55 87 99906 2083. Email address: arcoverde.thiago@hotmail.com

Highlights

Rich grain diets provided for long periods result in kidney damage as discrete multifocal areas to moderate congestion of glomerular tufts that predispose the development of urolithiasis.

Summary: Urolithiasis affects the urinary tract of small ruminants, causing the premature exit of animals for breeding. The morphometric study of the organs can be used as a diagnostic aid method. Thus, this study aimed to describe the macroscopic, histopathological and histomorphometric changes of the urinary tract of sheep with urolithiasis. For this purpose, 14 healthy male Santa Inês sheep, approximately 90 days old, were used and given an experimental diet. After the development of urolithiasis the animals were reorganized into two groups D₁ (without urolithiasis) and D₂ (with urolithiasis) for comparative data analysis. The sheeps were necropsied, for description of the pathological changes, followed by macroscopic morphometric analysis and described for histopathological and histomorphometric characteristics. Urethral process necrosis and full urinary bladder were observed in all animals that developed the disease. The comparison between sheep with and without urolithiasis showed no significant difference ($P < 0.05$) in the evaluated macroscopic morphometric variables, except for the right ureter width. Regarding the histopathological evaluation, multifocal areas of mild to moderate congestion of the glomerular tufts and protein in the tubular lumen in the kidneys were observed. In the liver, mild to moderate fatty degeneration was noted in the centrolobular regions, and only in one animal was

observed an ulcerated focal area in the bladder mucosa. The present research demonstrated that the formulated diet was effective in clinical disease induced. In acute urolithiasis in sheep tissue lesions in liver and urinary tract are observed, although there are no significant histomorphometric changes.

Keywords: Ram, Morphometry, Histopathology, Hydronephrosis, Urolith.

1 Introduction

Urolithiasis is the most economically important urinary tract disease in sheep breeding because it has a high mortality rate (Ortolani, 1996; Afonso and Guaraná, 2008). Guimarães et al. (2012) reported lethalties of 69.70% and 30.30% for animals with total and partial obstruction respectively.

Although the processes involved in biomineralization are not fully elucidated, it is known that the formation of uroliths results from the interaction of numerous common factors between ruminants reared in production systems such as anatomical, physiological, nutritional (Smith and Sherman, 1994; Belknap and Pugh, 2002), animal species and sex (Doria et al., 2007). These factors, associated with low water consumption, which makes the urine saturated, favor precipitation and crystallization of solutes (Radostits et al., 2007).

The chemical composition of the urolith is directly related to the diet, being commonly reported the formation of struvite (ammonium magnesium phosphate) and apatite (calcium phosphate) crystals in animals treated with high grain diets (Sun et al.,

2010; Pam et al., 2011). Calcium tartrate uroliths, calcium citrate, hydrated sodium oxalate and hydrated potassium oxalate can also be found (Maciel et al., 2016).

One technique that has been employed to assist in the diagnosis of some diseases is morphometric analysis (Rech et al., 2006; Duarte et al., 2007; Pagnano et al., 2008). *In vivo*, morphometric parameters can be analyzed by complementary examinations such as radiographic and ultrasound images that help the diagnosis and possible prognosis, when there is an increase or decrease in size, or radiolucency and echogenicity changes of a given organ or tissue (Campos et al., 2013).

Different researchers described morphometric changes in urinary tract of sick animals. Lima et al. (2009) and Martins et al. (2013) reported dilated ureters and increased renal volume in cats with lower urinary tract disease. Gooneratne et al. (1986) stated that glomerular and tubular damage is proportional to the degree of hemolysis in copper-poisoned sheep. Farrugia et al. (2006) reported basal urothelium apoptosis in sheep fetuses after 30 days of urethral and uracal obstruction. Lu et al. (2017) observed that reduced storage capacity and bladder emptying ability is a consequence of bladder fibrosis in urinary tract obstructions. These descriptions demonstrate the importance of knowledge and the pathological and histomorphometric analysis in the clinical routine.

Given the above and considering the relevance of this disease for sheep, the purpose of the present study was to verify the effect of phosphorus-rich hyperproteic diet on the development of urolithiasis. Thus, one has described macroscopic, pathological and histomorphometric changes of urinary tract of male Santa Inês sheep with urolithiasis, compared to healthy animals, to contribute to the understanding of the disease.

2 Materials and methods

2.1 Approval of the ethics committee

All methodology adopted for the development of the present research was submitted and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, under protocol number 13726 / 2012-97.

2.2 Study location, animal selection and management

The animals were confined in an experimentation pen for small ruminants in the Academic Unit of Garanhuns (UAG), Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE) in individual stalls 2.0 m x 1.0 m, masonry, throughout the trial period. Natural source water was supplied through plastic containers to measure daily consumption.

Fourteen healthy Santa Ines sheep were used, male (non-castrated), aged approximately 90 days and weighing 23.13 ± 4.08 kg. Prior to the beginning of the experiment, faecal parasitological examination and endoparasite control with oral Sulfaquinoxaline and Sodium Closantel (Sulfaquinoxalina[®] Vansil and Diantel[®] 10%) and clostridial vaccination (Poli-Star[®] Valle, São Paulo, SP, Brazil) were performed. The pre-experimental phase for adaptation of the rumen microbiota corresponded to fifteen days, in which all animals received the same balanced diet. Then, there was a gradual daily reduction in the ratio of roughage / concentrate until reaching 30%

roughage and 70% of concentrate that remained in this proportion until the end of the experiment.

2.3 Experimental Design

The animals were fed for 90 days with feed consisting of Tifton 85 crushed hay (3 to 5 cm fiber) and a mixture of crushed corn and soybean meal, plus anhydrous dibasic sodium phosphate P.A., and Tortuga commercial salt (Ovinofós®) to obtain Ca / P imbalance 1:2 and containing 30:70 forage / concentrate ratio (Table 1). After this period the Ca/P ratio was changed to 1:3 and the animals received the new diet for the period of 29 days.

Table 1. Chemical and calculated composition of experimental diets.

Ingredients	Pre-experimental diet (g/kg of DM)	Calculogenic diet (g/kg of DM) Ca / P ratio (unbalanced)
Tifton85 hay	700.00	300.00
Crushed corn	180.50	560.70
Soybean meal	100.00	96.00
Anhydrous dibasic sodium phosphate (disponibility 95,4%)	-	22.00
Mineral supplement *	15.00	15.00
Chemical composition		
Dry matter (g / kg DM)	860.57	860.94
Crude protein (g / kg DM)	121.79	121.36
Metabolizable Energy (kcal)	2.446	2.774
Ether extract (g / kg DM)	34.00	45.58
Calcium (g / kg DM)	5.67	4.16
Phosphorus (g / kg DM)	2.95	8.38

* Ovinofós® Mineral Salt: Zinc (3,800.00 mg), Sodium (147.00g), Manganese (1,300.00 mg), Cobalt (40.00 mg), Iron (1,800.00 mg), Copper (590.00 mg) Sulfur (18.00 g), Selenium (15.00 mg), Iodine (80.00 mg), Chromium (20.00 mg), Molybdenum (300.00 mg), Calcium (120.00 g), Fluorine (max) (870.00 mg), Phosphorus (87.00 g).

The total ration was fed fractionally in two moments, 8 and 14 hours, in plastic troughs with dimensions of 50 x 20 x 30 cm and the leftovers were weighed daily to determine the consumption.

For experimental safety the total ration was submitted to bromatological analysis (Table 2) and water was submitted to chemical analysis (Table 3).

Table 2. Nutritional composition of experimental diets ingredients

Item	Tifton Hay	Crushed Corn	Soybean	Dibasic Sodium Phosphate (disponibility 95,4%)
Dry matter	860.13	860.34	880.01	990.00
Crude protein (g/kg)	82.90	90.00	470.08	-
Mineral matter (g/kg)	75.30	10.70	62.50	-
Ether extract (g/kg)	28.50	65.39	33.40	-
Phosphorus (g/kg)	-	-	-	230
Sodium (g/kg)	-	-	-	16

Table 3. Chemical analysis of water

Variables	Values
Conductivity	0.633mS/cm
Ph	5.8
Total solids	0.532 ppm
Calcium	6.4 ppm
Magnesium	8.1 ppm
Toughness	42 ppm
Chlorides	7.9 ppm

ppm = parts per million; mS/cm = MiliSiemens per centimeter.

The total confinement period (119 days) was established in this experiment to ensure sufficient time and conditions for urolith formation and development of urolithiasis (Figure 1). After the end of the experiment, the animals were reorganized, forming two distinct experimental groups D₁ (without urolithiasis) and D₂ (with urolithiasis) for the comparative analysis of the data. The average total feed intake was

6.01% of live weight and at the end of the experiment the animals weighed 36.12 ± 7.02 kg, and the average weight gain and standard deviation per group of $0.11 \pm 0,04$ kg and 0.14 ± 0.05 kg respectively.

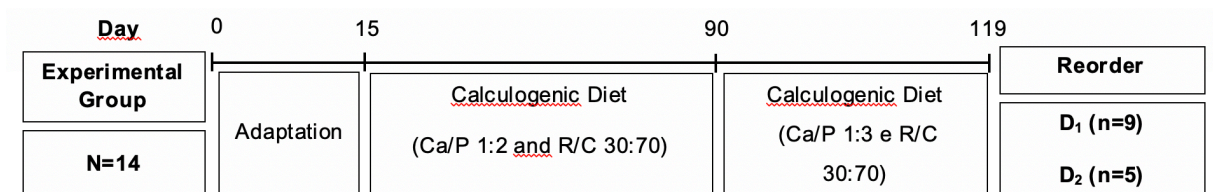


Figure 1. Experimental design scheme.

Legend:

C - concentrate

Ca - Calcium

D₁ - (Without urolithiasis)

D₂ - (With urolithiasis)

P - Phosphorus

R - Roughage

2.4 Harvesting and Analysis

The sheep were examined every seven days, following the technique described by Dirksen et al. (1993) throughout the experimental period. Immediately after clinical confirmation of the development of urolithiasis, the affected sheep were slaughtered according to the current legislation for the species and necropsied.

Macroscopic necropsy findings were photodocumented and described. Bilateral morphometric analysis of the kidneys was performed with the aid of a digital caliper

(Mastercraft[®]), measuring length (distance between cranial and caudal poles), thickness (dorsoventral distance of the mid portion of the organ) and width (distance from the medial to the lateral margin), besides the thickness of the renal cortex and medulla.

The ureters were measured for width and length (from the renal hilum to urinary bladder insertion, excluding the intramural region). For the urethral process the length was recorded, taken from its insertion to the apex. The ureters width and the urethral process length were measured with a digital caliper (Mastercraft[®]) and the ureters length with a common millimeter ruler.

For histopathological and histomorphometric analysis, 2 cm samples from the liver (right and left hepatic lobes), kidneys (longitudinal section involving cortical and medullary region) and urinary bladder (bladder neck - bladder trigone and adjacencies) were fixed in buffered formaldehyde 10% and underwent the histological routine. After 48 hours, the samples were dehydrated in increasing series of ethanol, diaphanized with xylol and impregnated with paraffin. Serial 5 μm sections were then performed and the slides were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) (Tolosa et al., 2003). The histological slides were observed on 4x, 20x and 40x objective lenses in an Olympus binocular photomicroscope and the changes were documented and described. Subsequently, the diameter of the renal corpuscles and hepatocytes was measured and the hepatocyte count per field was performed using the Olympus software (Cell Sens 1.14). The nomenclature used is in accordance with the *Nomina Anatomica Veterinaria* (ICVGAN, 2017).

2.5 Statistical Analysis

For macroscopic morphometry, the data were analyzed using the computer program Statistical Analysis System (SAS, 2009), using the GLM procedure. For all statistical analysis performed the significance level (P) of 5% was adopted. In cases where there was significance in the F test, the means were compared by the minimum significant difference (msd) of the SNK test.

For histomorphometry, data from each group were submitted to the Shapiro-Wilk normality test. With normality ($P > 0.05$), the two groups were compared by parametric tests. Initially, the variances were compared by the F test. If had occurred equality of variances ($P > 0.05$), the two groups were compared by the t test; if not, the groups were compared by the Welch test. When data were not normal, the comparison was made by the Wilcoxon rank sum test. Significant difference was considered when $P < 0.05$. Analyzes were performed using the R software.

2.6 Results and discussion

Physical examination allowed vouching the health of all sheep at the beginning of the experiment, which remained active and fed normally during the experimental period. Over time, faecal changes from solid to pasty were observed in all sheep. Pugh (2002) attributes this change to ruminal acidosis caused by diets with a high percentage of fermentable carbohydrates and starchy foods (cereal grains, wheat, oats, corn and sorghum).

The first case of urolithiasis occurred 56 days after the starting of the experiment, and during the established experimental period of 119 days. Five out of 14 animals showed total urolithiasis confirming the calculogenic potential of the formulated diet, but approximately 64% of sheep did not develop the disease, probably due to high water consumption which minimizes urine saturation and salt precipitation (Tiruneh, 2006, Radostits et al., 2007). Furthermore, the change in diet with initial levels of calcium / phosphorus in the ratio 1:2 to 1:3 may have favored the adaptation of ruminal microbiota to the calculogenic diet optimizing the metabolized phosphorus. Either individual or genetic factors may have contributed to the absence of urolithiasis development in these animals.

The sheeps that manifested the disease presented several typical clinical signs, including: apathy or restlessness, stranguria, abdominal contraction and kicking with exposure and licking of the penis, postural changes (arching of the back, abduction of the pelvic limbs and raised tail), congested glans and urethral process and with areas of necrosis and firm to the palpation, as well as discomfort and sensitivity at the examination of the urogenital tract. There were more exacerbated signs in one of the animals that presented urethral rupture. These signs were not observed by Santarosa et al. (2016), although the animals in their experiment were confined for a total period of 56 days, sufficient time for the uroliths development. They were found at necropsy exclusively in the renal pelvis, without causing obstruction. Therefore, the authors reported absence of signs such as dysuria, urethral obstruction, or bladder rupture. Ferreira (2009, 2013) correlates this absence of signals in confined lambs for slaughter to the short time of termination, which after weaning around 60 days, lasts an average of 39 days.

Penile urethral rupture occurred in only one animal, which presented anuria, edema and sensibility to palpation of the ventroabdominal region (scrotal region to xiphoid cartilage) and swollen foreskin preventing penile exposure, as well as vocalization, bruxism and digging movements. The same signs were observed in 27.4% of sheep and goats studied by Morais (2012). Hay and Suttle (1991) and Riet-Correa et al. (2008) stated that in cases of urethral necrosis and bladder rupture occur leakage of urine into the connective tissue of the ventral abdominal wall and prepuce or abdominal cavity causing edema, tissue irritation, necrosis, urine resorption and uremia.

The main necropsy findings of the affected animals observed were full bladder with extensive area of hemorrhage, necrosis of the urethral process, and dilation of the ureter and renal pelvis (Figure 2), as reported by Lima et al. (2009). Santarosa et al. (2016) observed hydronephrosis and unilateral dilatation of the ureter in only one sheep without presenting clinical pain symptoms.

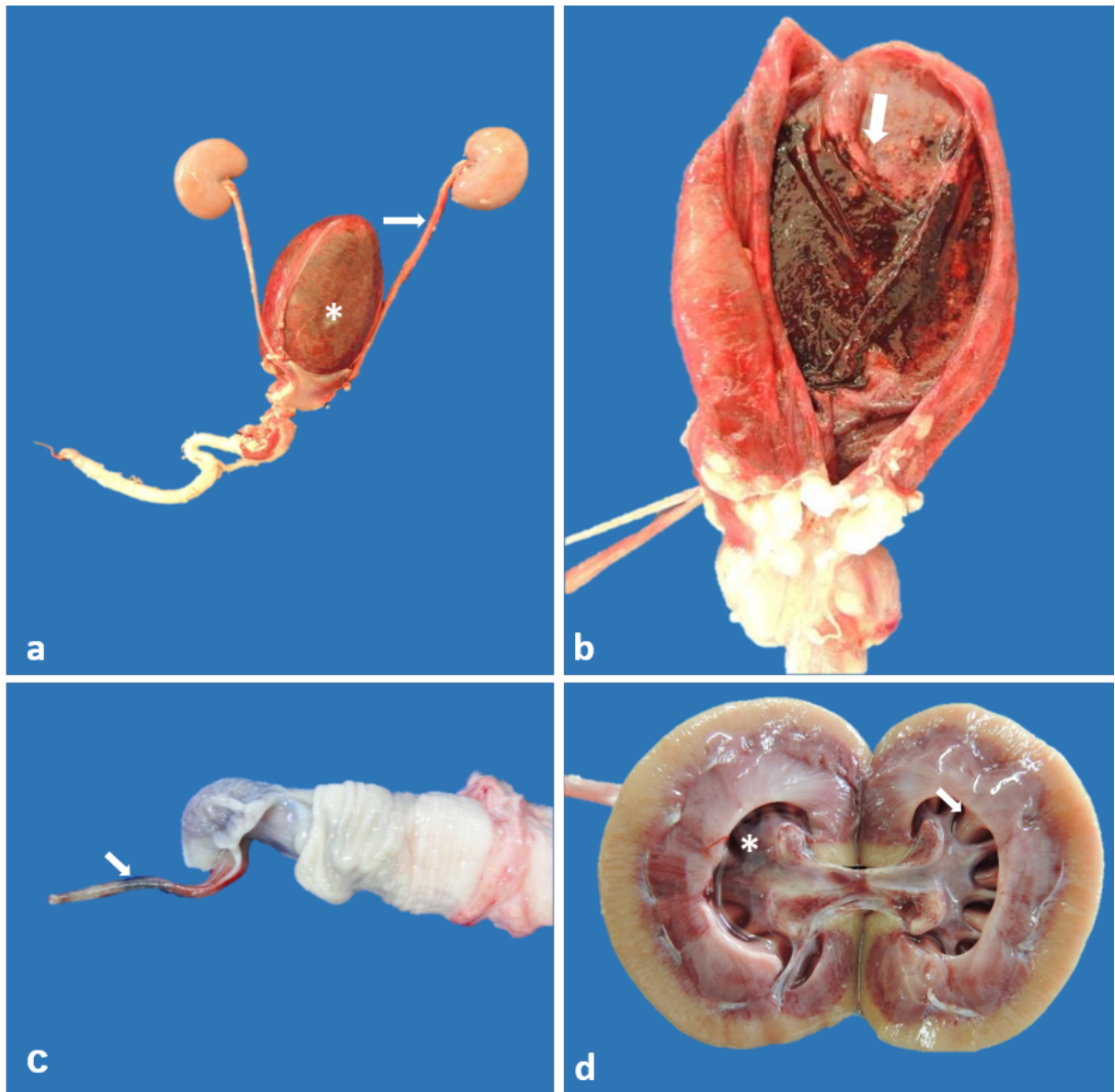
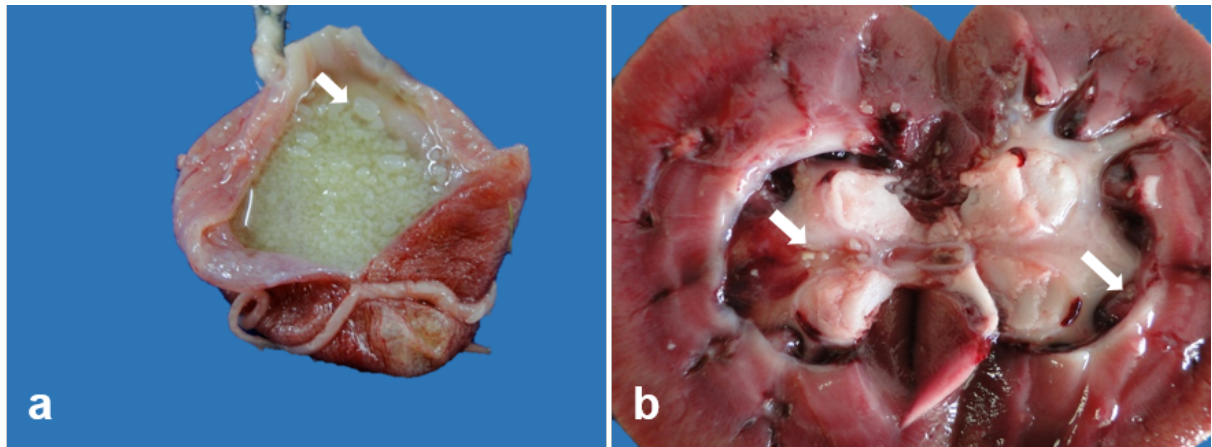


Figure 2. Necropsy findings of sheep with urolithiasis. (a) Panoramic view of the urinary tract. It is observed discretely dilated ureter (arrow) and markedly distended urinary bladder (*). (b) Urinary bladder at longitudinal section. Marked necrohemorrhagic cystitis (arrow) was noticed in the body of urinary bladder. (c) Urethral process with extensive area of necrosis and hemorrhage (arrow). (d) Hydronephrosis, characterized by moderate dilation of the renal pelvis (*) and evidence of renal calices (seta).

Uroliths were mostly deposited in the urinary bladder, although they were also found in the renal pelvis and urethra, especially in sigmoid flexure and the urethral process, mainly obstruction points (Figure 3). While Santarosa et al. (2016) reported sandy aspect calculations exclusively in the kidneys, Assis et al. (2009) observed uroliths mainly in the right kidney and in the bladder outlet to the urethra and sigmoid flexure. Such findings are frequent and their severity is directly related to the clinical evolution of the condition and the degree of obstruction.

Figure 3. Urinary bladder and kidney of sheep treated with a calculogenic diet (a)



Urinary bladder full of irregular yellowish-white uroliths (arrow). (b) Kidney. Irregular yellowish-white uroliths are observed in renal crest (arrows).

In addition to the described lesions above, one of the animals presented urethral rupture. In the region of the penile path there was a large reddish and gelatinous area characteristic of edema. The dissection showed rupture area containing compacted mineral content completely obstructing the urethral lumen (Figure 4), as previously described by Radostits et al. (2007) and Assis et al. (2009).

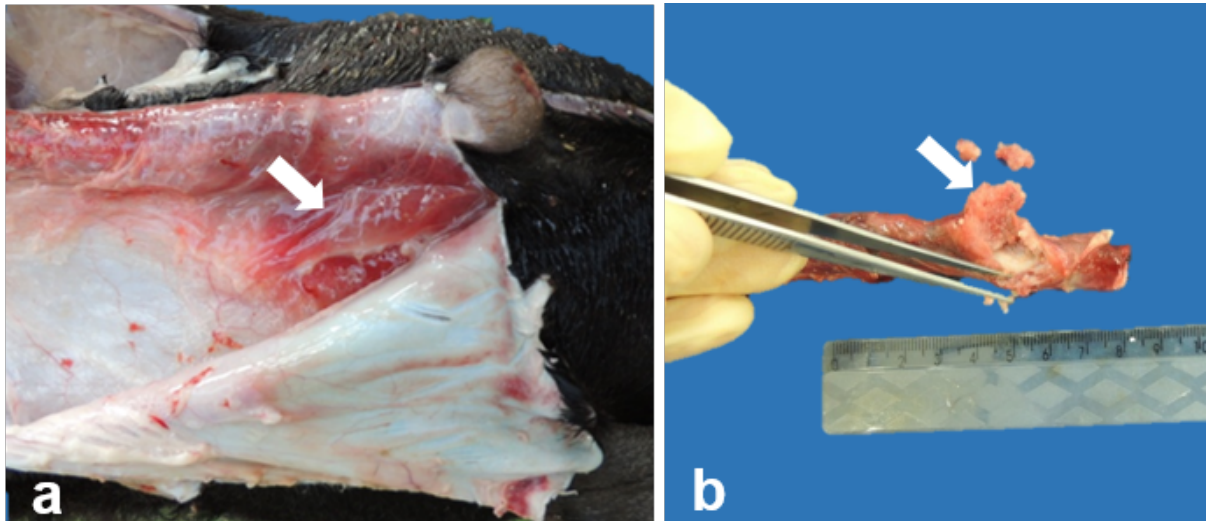


Figure 4. Necropsy findings of sheep fed a calculogenic diet with ruptured urethra. (a) Subcutaneous edema around the foreskin, characterized by deposition of slightly reddish gelatinous material (arrow). (b) Urethral rupture with compressed mineral content (arrow).

Although not correlated with urolithiasis, the more cranial anatomical position of the right kidney reflected significantly higher averages for right ureters ($P < 0.05$) compared to the left ones is a normal condition (Figure 5), as reported by Dyce et al. (2010). In a study to evaluate the renal morphometry of healthy goats by ultrasonography, Rossi et al. (2012) also confirmed the more cranial position of the right kidney.

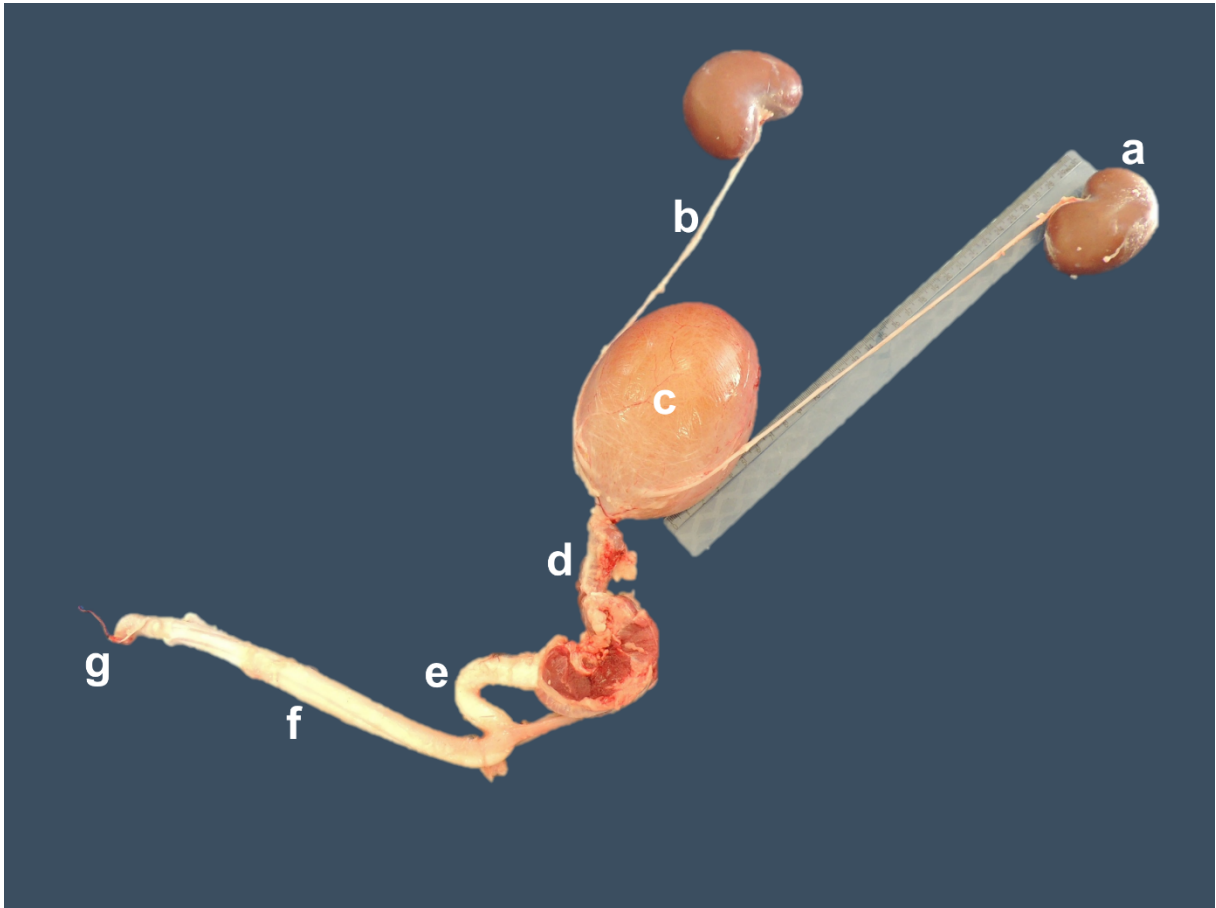


Figure 5. Overview of sheep urinary tract illustrating the right kidney in cranial position (a), ureter (b), full urinary bladder (c), pelvic urethra (d) sigmoid flexure (e), penile urethra (f) and glans with urethral process (g).

When sheep that developed urolithiasis were compared with sheep that did not have the disease, there was no significant difference in the macroscopic morphometric variables evaluated, except for the right ureter width.

Although D₂ animals presented higher values of length, width and thickness of kidneys, there was no statistical difference between groups (Figure 6 and Table 4). Some of these data corroborate the report by Assunção et al. (2018), who observed increased renal volume and weight and cortical volume in rats submitted to contralateral nephrectomy after 24h of ureter obstruction. However, the hypertrophic

response did not occur when the obstructed kidney or ureter was not removed. These authors concluded that the lack of a kidney is less harmful to the contralateral organ than a blocked kidney or ureter. Sisson and Grossman (1986) reported length of 7.5 cm and width of 5 cm of the kidneys of this species, values numerically higher than those found in this study, which may reflect the breed, size and age of the evaluated animals.

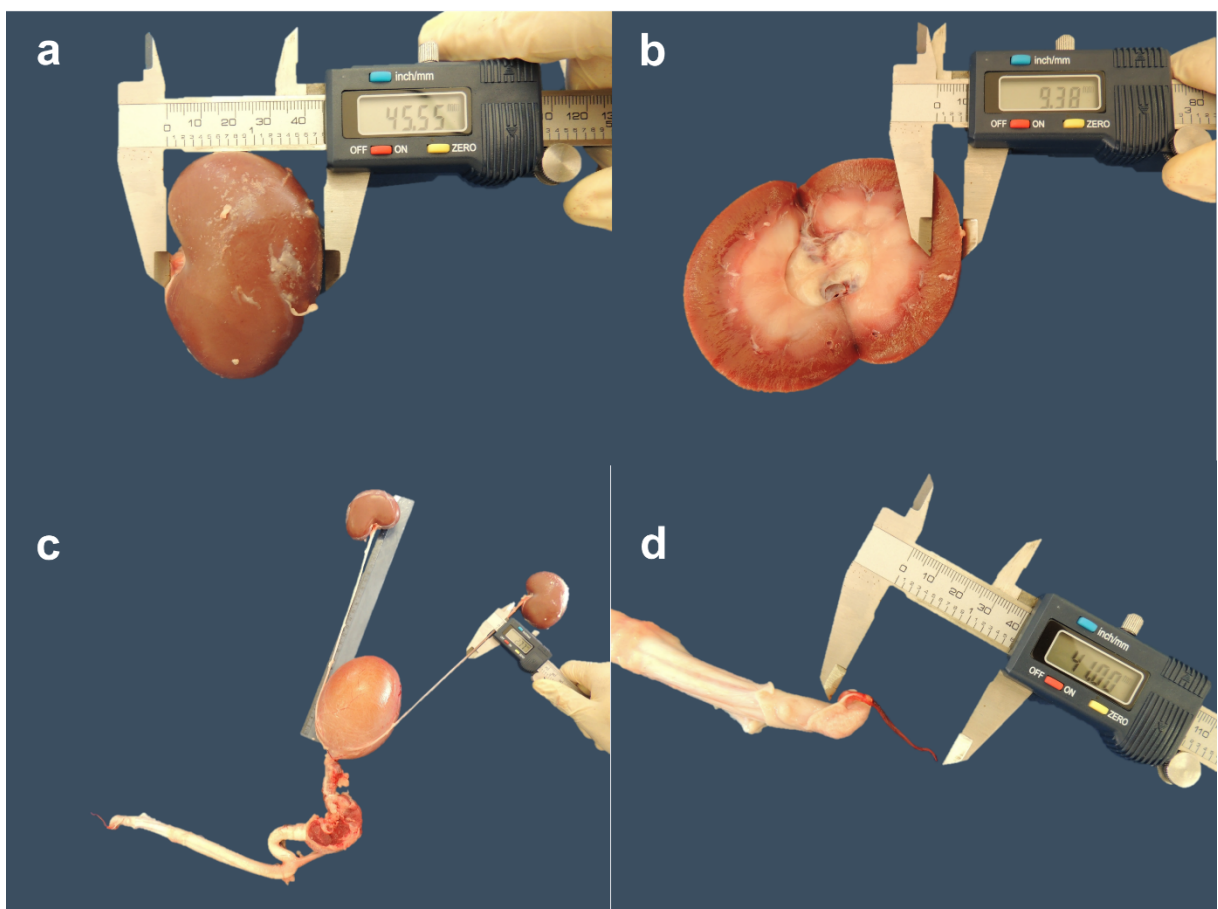


Figure 6. Morphometric evaluation of the sheep urinary tract. (a) measuring kidney width; (b) measurement of renal cortex height; (c) measurement of the ureter; and (d) measurement of the length of the urethral process.

Table 4. Analysis of variance and mean values \pm standard deviation of morphometry (mm) of Santa Inês sheep kidneys (n = 14).

Groups	Right kidney					Left kidney				
	Length	Width	Thickness	Cortex height	Medulla height	Length	Width	Thickness	Cortex height	Medulla height
D ₁	63.31 \pm 3.61	40.73 \pm 5.77	35.64 \pm 7.41	8.8 \pm 0.90	17.55 \pm 1.80	63.99 \pm 3.92	42.36 \pm 5.53	32.86 \pm 5.07	8.32 \pm 0.88	16.74 \pm 1.79
D ₂	65.00 \pm 7.16	46.15 \pm 6.38	36.03 \pm 8.90	8.39 \pm 1.28	17.50 \pm 3.50	68.72 \pm 6.60	47.27 \pm 6.52	35.00 \pm 7.55	8.48 \pm 1.72	17.50 \pm 2.69
P (t / Welch test)	0.56	0.13	0.93	0.50	0.97	0.11	0.16	0.53	0.82	0.53

- There was no significant difference ($P < 0.05$) in the comparison between groups.

D₁ - without urolithiasis (n = 9)

D₂ - with urolithiasis (n = 5)

Sheep that developed urolithiasis (D₂) presented larger ureter widths compared to the other group (D₁), but statistical difference occurred only for the right ureter, which may have contributed to less stone retention at this site (Table 5). These data corroborate the one described by Santarosa et al. (2016), who observed unilateral dilatation of the ureter and Lima et al. (2009), who reported dilated ureters and increased renal volume in domestic cats with lower urinary tract disease, a fact also observed by Martins et al. (2013) when performing image analysis on animals with the same disease. Newman et al. (2009) ensured that ureter dilation and hydronephrosis occur as a result of the delay between the clinical manifestation of the first signs of urolithiasis and slaughter. Faria et al. (2011) also observed right ureter and right kidney dilation in dogs with hydronephrosis and pionephrosis caused by chronic urethral obstruction.

Table 5. Analysis of variance and mean values \pm standard deviation of length (cm) and width (mm) of ureters and length (cm) of urethral process of Santa Inês sheep (n = 14).

Groups	Right ureter		Left ureter		Urethral process
	Length	width	Length	Width	Length
D ₁	25.50 \pm 2.70	2.71 \pm 0.56	22.5 \pm 2.87	2.95 \pm 1.15	4.10 \pm 0.51
D ₂	26.75 \pm 1.26	3.55 \pm 2.53	22.5 \pm 1.29	3.34 \pm 1.65	3.96 \pm 0.45
P (t / Welch test)	0.40	0.50	1.0	0.61	0.63

- (*) - significant difference between groups (P < 0.05).

D₁ - without urolithiasis (n = 9)

D₂ - with urolithiasis (n = 5)

Regarding the length of the urethral process, there was no statistical difference between the studied groups. It is common in urolithiasis in sheep obstruction of the urethral process that progresses to necrosis (Maciel et al., 2017) and a treatment option is the amputation. However, there is a great chance of stenosis beyond urethrostomy and penectomy (Sousa et al., 2011).

Histopathological examination of the kidneys of three animals showed vascular lesions of inflammatory nature, such as discrete multifocal infiltrates of lymphocytes, plasma cells and macrophages in medullar region, and discrete to moderate congestion of multifocal areas of the glomerular tufts, located mainly in the medullar region, and mild presence of protein in the tubular lumen. Nevertheless, Santarosa et al. (2016), described renal vascular congestion with mild and moderate presence of protein in the lumen tube in sheep urolithiasis. According to Frelie et al. (1990) and Garcia-Navarro (2005) the presence of protein in the tubular lumen occurs due to lower resorption capacity, indicating tubular lesion, while post-renal proteinuria characterizes glomerular disease.

In the liver, it was observed in the centrolobular regions, mild to moderate fatty degeneration, characterized by the presence of large and unique vacuoles in the hepatocyte cytoplasm (Figure 7). In the left lobe of the liver, fatty degeneration was higher in group D₁ ($P < 0.05$). In one animal, mild multifocal inflammation with random hepatocyte necrosis was observed. According to Aroeira (1998) and Jones et al. (2000) this fat accumulation occurs as a consequence of the imbalance between the uptake of fatty acids by the liver and its utilization capacity. Souza (2003) highlights the fat cow syndrome, cattle ketosis, pregnancy toxemia in beef cows, sheep and goats, as the main diseases causing lipidosis, reinforcing that husbandry with the provision of hypercaloric diets favor the development of this disease.

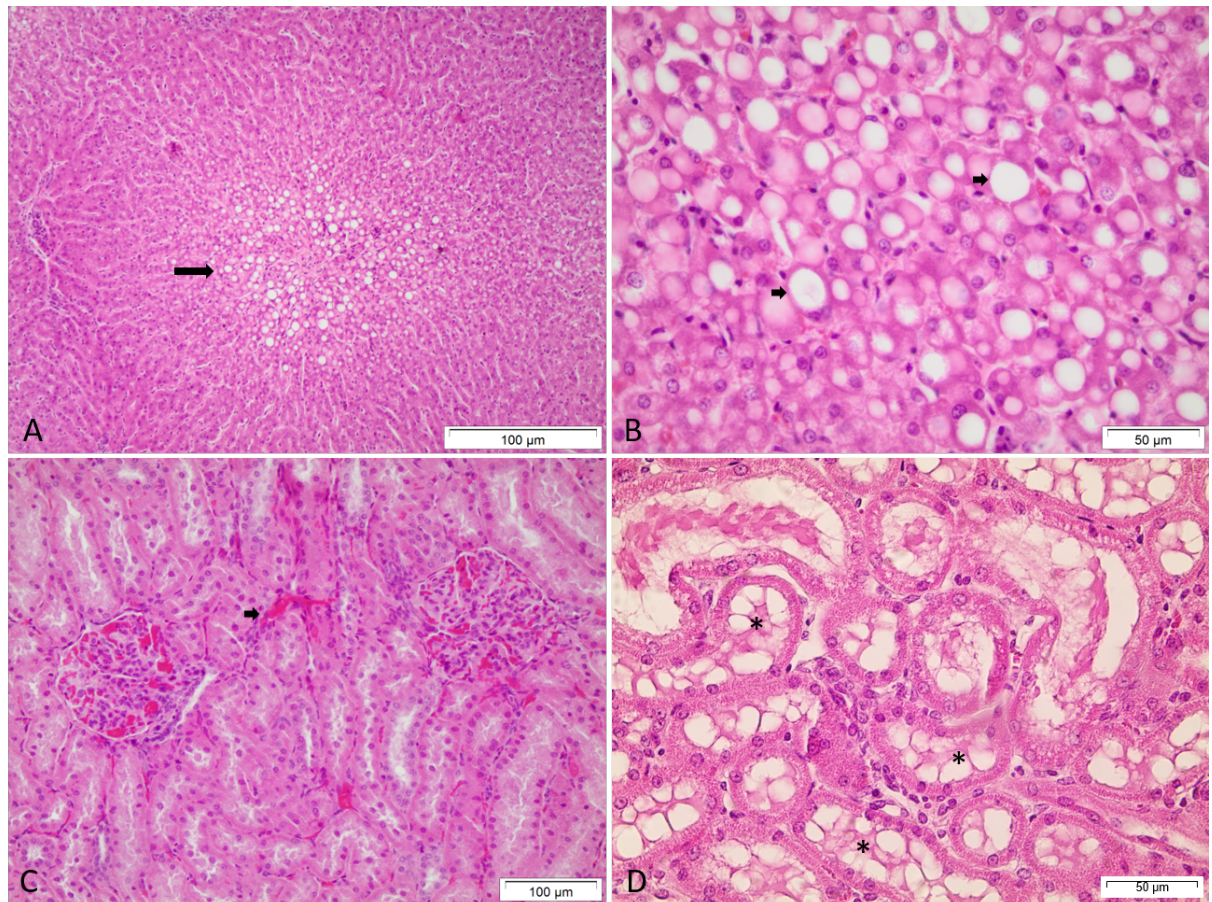


Figure 7. Photomicrographs of liver and kidney of sheep with experimental urolithiasis. A) Mild fatty degeneration is observed in the centrilobular region (arrow) in the liver. HE. Bar = 100 μm . B) Large and unique, well-defined vacuoles (arrows) in the cytoplasm of hepatocytes characteristic of hepatic fatty degeneration. HE. Bar = 50 μm . C) Mild congestion in the glomerular tufts (large arrow) and blood vessels in the cortical region of the kidney (small arrow). HE. Bar = 100 μm . D) Renal intratubular protein deposition (*). HE. Bar = 100 μm .

The other histological morphometric variables did not differ statistically between the groups, as well as between the animals that developed urolithiasis and those that did not (Table 6).

Table 6. Renal and hepatic histomorphometric data of Santa Inês sheep (n = 14).

Variable	Without urolithiasis (D ₁ ; n=9)	Urolithiasis (D ₂ ; n=5)	P (t / Welch test)
Centrolobular Fatty Degeneration RL	1.22 ± 1.09	1.2 ± 1.30	0.973
RL Degeneration Distribution	1.67 ± 1.41	1.6 ± 1.52	0.936
RL congestion	0.56 ± 0.53	0	-
Centrolobular Fatty Degeneration LL	1.22 ± 1.09	1.67 ± 1.53	0.588
LL Degeneration Distribution	1.67 ± 1.41	2 ± 1.73	0.743
LL congestion	0.56 ± 0.53	0	0.013
Cortical Congestion R Kidney	0.22 ± 0.44	0	0.169
Spinal Cord Congestion R Kidney	1.78 ± 0.97	0.8 ± 0.84	0.084
Intratubular Protein R Kidney	1 ± 0.5	1.2 ± 0.45	0.472
Cortical Congestion L Kidney	0.22 ± 0.44	0	0.290
Spinal Cord Congestion L Kidney	1.56 ± 0.88	1 ± 0.71	0.252
Intratubular Protein L Kidney	1 ± 0.5	1.4 ± 0.89	0.297

- There was no significant difference (P <0.05) in the comparison between groups.

D₁ - without urolithiasis (n = 9)

D₂ - with urolithiasis (n = 5)

R - Right

L - Left

RL - Right Lobe

LL - Left Lobe

Congestion: Absent (0), Discreet (1), Moderate (2), Severe

Intratubular Protein: Absence (0), Discrete (1), Moderate (2)

Centrolobular Fat Degeneration: Absent (0), Discrete (1), Moderate (2), Severe (3)

Degeneration Distribution: Absent (0), Focal (1), Multifocal (2), Diffuse (3)

No histological changes were observed in liver and kidneys concerning morphometry (quantity and diameters of glomeruli and hepatocytes) reflecting the resilience of the cells of these organs to acute injuries. Gooneratne et al. (1986) evaluated copper-poisoned sheep and reported that until the onset of hemolysis renal the functions were not altered. In hemolysis, glomerular and tubular damage were proportional to its severity. In animals that recovered from hemolysis, renal functions were restored with time. About three weeks after the hemolytic crisis, tubular function returned to normal, although glomerular function decreased to $\frac{3}{4}$ from the prehemolytic value, indicating the presence of residual glomerular damage.

Therefore, in the acute phase of urolithiasis, as well as in copper intoxication, the renal parenchyma showed high adaptability (resilience) to the organ challenges. Howie et al. (1990) mentioned that although there is consensus on the low correlation between renal excretory function and histological changes in the kidney, especially in acute renal failure and *postmortem* examination, they have developed an immunohistological method that marks tubules brush edge antigens, mainly from the Henle loop, indicating tubular lesions. They reported that this method was useful and practical in correlating function and structure, which can be used even in the *postmortem* kidney.

Most sheep's ureters and urinary bladder were unchanged macro and microscopic. Fact also observed by Santarosa et al. (2016), who reported only mild vascular congestion and mononuclear inflammatory infiltrate, justified by the absence of macroscopic bladder lesions and the non-development of urolithiasis.

Only one animal presented ulcerated focal area in the mucous layer, due to the aggression caused by bladder distension associated with the presence of uroliths.

Farrugia et al. (2006) observed basal urothelium apoptosis in sheep fetuses after 30 days of urethral and uracal obstruction. Additionally, Lu et al. (2017) observed bladder fibrosis in functional or anatomical urinary tract obstructions, reducing bladder storage capacity and emptying ability.

3 Conclusions

The formulated feed was effective in inducing clinical disease after 56 days of consumption, demonstrating that the high grain diet predisposes to the development of urolithiasis, and can be used as an experimental model in future research.

The development of clinical disease from 56 days of consumption demonstrates that high-grain diets, when given for long periods, result in renal lesions that predispose the development of urolithiasis and, therefore, should be used with caution in the feeding of elite sheep. Its supply must be restricted to short periods of time, and preferably interspersed with a 70:30 diet (roughage / concentrate).

In acute urolithiasis in sheep are observed inflammatory vascular lesions such as discrete multifocal infiltrate of lymphocytes, plasmocytes and macrophages in the medullar region, associated with multifocal areas from mild to moderate congestion of the glomerular tufts and protein in the tubular lumen in the kidneys. Similarly in the liver, there is mild to moderate fatty degeneration in the centrolobular regions.

4 References

- 1 Afonso, J.A.B., Guaraná, E.L.S., 2008. Urolitíase em pequenos ruminantes. *Jor. do Cons. Reg. de Med. Vet. de Per.: Veterinária e Zootecnia.* 1:7-8.
- 2 Aroeira, L.J.M, 1998. Cetose e infiltração gordurosa no fígado em vacas leiteiras. EMBRAPA-CNPGL: Juiz de Fora.
- 3 Assis, A.C.O., Silva, T.R., Aguiar, G.M.N., Melo, D.B., Almeida, F.C., Medeiros, J.M., Neto, P.I.I.N., 2009. Urolitíase obstrutiva em bovinos no semiárido paraibano. *Ciência Anim. Bras.* 1, 41 – 45.
- 4 Assunção, R.F., Pereira-Sampaio, M.A., Sampaio, F.J.B., Souza, D.B., 2018. Does a ureteral obstruction affect the contralateral kidney morphology? a stereological analysis in a rodent model. *Urol. Int.* 100, 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.001>
- 5 Belknap, E.B., Pugh, D.G., 2002. Diseases of the urinary system. in: Pugh, D.G. (Ed.) *Sheep & goat medicine.* Saunders: Philadelphia. pp. 267-271.
- 6 Campos, A.G., Daneze, E.R., Alves, J., Júnior, T., Benjamim, A., Barbosa, R., Regina, G., Augusto, A., Terra, S. A., 2013. Sonographic morphometry of the liver and biliary tract in porcine models submitted to experimental biliary obstruction. *Rad. Bra.* 46, 89–95. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-39842013000200012>.
- 7 Dirksen, G., Gründer, H.D., Stöber, M., 1993. *Rosenberger, exame clínico dos bovinos.* third ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- 8 Dória, R.G.S., Canola, P.A., Dias, D.P.M., Pereira, R.N., Valadão, C.A.A., 2007. Técnicas cirúrgicas para urolitíase obstrutiva em pequenos ruminantes: relato de

- casos. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoo.*, 6, 1425-1432. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000600012>.
- 9 Duarte, C.A., Catellan, J. W., Lucas, F.A., Godoy, G. S., Malheiros, E.B., Oliveira, D., Baraldi-Artoni, S. M., 2007. Aspectos morfométricos da cicatrização do cólon descendente de equinos submetidos a enterorragias aposicionais com poliglactina 910 e com cianoacrilato. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoo.*, 1, 49-55. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000100009>
- 10 Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G. 2010. *Tratado de anatomia veterinária*. fourth ed. Elsevier: Rio de Janeiro.
- 11 Faria, L.G., Sampaio, G.R., Campos, I.O., Lacrete Jr, A.C.C., Varaschin, M.S., Kawamoto, F.Y.K., Barros, F.C.R., Mesquita, L.R., 2011. Pionefrose decorrente de obstrução ureteral crônica em cão. *Anais do congresso brasileiro de medicina veterinária*, 38, Salvador.
- 12 Farrugia, M.K., Longa, D.A., Godleya, M.L., Peeblesb, D.M., Fryc, C.H., Cuckowa, P.M., Woolf, A.S., 2006. Experimental short-term fetal bladder outflow obstruction: I. Morphology and cell biology associated with urinary flow impairment. *Journal of Pediatric Urology*. 2, 243-253. <https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2006.01.019>
- 13 Ferreira D.O.L. 2009. Avaliação da acidificação urinária em ovinos com a utilização de três tratamentos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp-Botucatu, SP. 106p.
- 14 Ferreira D.O.L. 2013. Modelo experimental de urolitíase em ovinos - estudo clínico, laboratorial e hemogasométrico. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp-Botucatu, SP. 199p.

- 15 Frelie, P.F., Armstrong, D.L., Pritchard, J., 1990. Ovine mesangiocapillary glomerulonephritis type i and crescent formation. *Vet. Pathol.* 34, 26–34. <http://doi.10.1177 / 030098589002700104>.
- 16 Garcia-Navarro, C.E.K., 2005. *Manual de Urinálise Veterinária*. Varela, São Paulo.
- 17 Gooneratne, S.R., Howell, J.McC., Aughey, E., 1986. An ultrastructural study of the kidney of normal, copper poisoned and thiomolybdate -treated sheep. *Jour. of Comp. Path.* 96, 593-612.
- 18 Guimarães, J.A., Mendonça, C.L., Guaraná, E.L.S., Dantas, A.C., Costa, N.A., Câmara, A.C.L., Farias, C.C., Afonso, J.A.B., 2012. Estudo retrospectivo de 66 casos de urolitíase obstrutiva em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, 9, 824–830. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000900002>
- 19 Hay, L.A., Suttle, N.F., 1991. Urolithiasis. in: Martin, W.B., Aitken, I.D. (Eds.) *Diseases of sheep*. Oxford: Lea & Febiger, pp. 250-253.
- 20 Howie, A.J., Gunson, B.K., Sparke, J., 1990. Morphometric correlates of renal excretory function. *Jour. Pathol.* 160, 245-253. <http://dx.doi.org/10.1002 / path.1711600311>.
- 21 ICVGAN. 2017. *Nomina Anatomica Veterinaria*. World Association of Veterinary Anatomists, Niteroi, RJ.
- 22 Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W., 2000. *Patologia veterinária*. sixth ed. Manole, São Paulo.
- 23 Lima, E.R., Reis, J.C, Menezes, M.M., Santos, F.L., Pereira, M.F., Almeida, E.L., Teixeira, M.N., Silva, M.G.V., 2009. Aspectos anatomopatológicos em gatos domésticos com doença do trato urinário inferior. *Med. Vet.* 4, 17-26.

- 24 Lu, Y.T., Tingskov, S.J., Djurhuus, J.C., Nørregaard, R., Olsen, L.H., 2017. Can bladder fibrosis in congenital urinary tract obstruction be reversed? *Jour. of Ped. Uro.* 13, 574-580. <https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2017.08.013>
- 25 Maciel, T.A., Júnior, N.L., Araújo, V.V., Silva Filho, A.B., Gomes, D.L.S., Barbosa, A.M.S., Oliveira, D., 2016. Avaliação dos perfis minerais séricos, urinários e sedimentares de ovinos recebendo dieta calculogênica. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoo.*, 68, 967–976. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8363>.
- 26 Maciel, T.A., Ramos, I.A., Silva, R.J., Soares, P.C., Carvalho, C.C.D., Souto Maior Jr., R. J., Amoroso, L., Artoni, S.M.B., Afonso, J.A.B., Oliveira, D., 2017. Clinical and biochemical profile of obstructive urolithiasis in sheep. *Act. Sci. Vet.* 45, 1-15.
- 27 Martins, G.S., Martini, A.C., Meirelles, Y.S., Dutra, V., Nespóli, P.E.B., Mendonça, A.J., Torres, M.M., Gaeta, L., Monteiro, G.B., Abreu, J., Sousa, V.R.F., 2013. Avaliação clínica, laboratorial e ultrassonográfica de felinos com doença do trato urinário inferior. *Sem. Ciê. Agr.* 5, 2349-2356. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n5p2349>
- 28 Moraes M.V., 2012. Estudo clínico-epidemiológico da urolitíase obstrutiva em caprinos e ovinos. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- 29 Newman, S.J., Confer, A.W., Panciera, R.J., 2009. Sistema urinário, in: Zachary, J.F., McGavin, M.D. (Eds.) *Bases da Patologia em Veterinária*, fourth ed. Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 613-691.
- 30 Ortolani, E.L., 1996, Intoxicação e doenças metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica, urolitíase e toxemia da prenhez, in: Sobrinho A.G.S., Batista A.M.V.,

- Siqueira E.R., Ortolani E.L., Susin I., Silva J.F.C., Teixeira J.C., Borba M.F.S. (Eds),
Nutrição de Ovinos. Funep, Jaboticabal, pp. 241-258.
- 31 Pagnano, L.O., Baraldi-Artoni, S.M., Pacheco, M.R., Santos, E., Oliveira, D., Lui,
J.F., 2008, Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na
pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula. Ciê. Rur.
6, 1662-1666. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000600026>.
- 32 Pan, X.L., Wen, Z.S., Zou, X.T., Zhou, E.K., Kou, H.Q., Xu, Z.R., Zhang, W.J., 2011.
Chemical composition and microstructure of uroliths associated with the feeding of
high-level cottonseed meal diet to sheep. Res. in Vet. Sci. 91, 405–411.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.09.00>
- 33 Pugh, D.G. 2002. Sheep & Goat Medicine. Saunders Company: Philadelphia.
- 34 Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D., 2007. Veterinary
Medicine: a textbook of diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. tenth ed.,
Saunders Elsevier, Philadelphia.
- 35 Rech, R.R., Rissi, D.R., Rodrigues, A., Pierezan, F., Piazer, J.V.M., Kommers, G.D.,
Barros, C.S.L., 2006. Intoxicação por *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) em
bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e morfometria das lesões cerebelares. Pesq.
Vet. Bras. 26, 183-189. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2006000300010>.
- 36 Riet-Correa, F., Simões, S.D.V., Vasconcelos, J.S., 2008. Urolitíase em caprinos e
ovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 28, 319-322.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000600010>
- 37 Rossi, R.S., Bombonato, P.P., Piva, F.M., Gregory, L., 2012. Avaliação da
morfometria renal através do método ultrassonográfico de fêmeas caprinas (*Capra*

- hircus*) normais da raça Saanen. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 165–173.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000200013>.
- 38 Santarosa, B.P., Ferreira, D.O.L., Rodrigues, M.M.P., Dantas, G.N., Sacco, S.R., Lopes, R.S., Dias, A., Gonçalves, R.C., 2016. Avaliação clínica, laboratorial e anatomopatológica do sistema urinário de ovinos confinados com ou sem suplementação de cloreto de amônio. *Pesqui. Vet. Bras.* 36, 1–12.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2016000100001>.
- 39 SAS Institute Inc., 2009. SAS: System for windows, Release 6.12. CD-ROM, Cary, North Caroline, USA.
- 40 Sisson, S., Grossman, J. D., 1986. *Getty: anatomia dos animais domésticos*. fifth ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- 41 Smith, M.C., Sherman, D.M., 1994. *Goat medicine*. Lea and Fibeger, Philadelphia.
- 42 Sousa, A.A.R., Nunes, V.H.S., Oliveira, R.A., Sousa, A.A.S., Teixeira, W.C., Coelho, M.C.O.C., 2011. Urolitíase obstrutiva em ovino. *Act. Sci. Vet.* 39, 970.
- 43 Souza, A.N.M. Cetose dos bovinos e lipidose hepática. 2003. 18 f. Seminário (Bioquímica do Tecido Animal). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre.
- 44 Sun, W.D., Wang, J.Y., Zhang, K.C., Wang, X.L., 2010. Study on precipitation of struvite and struvite-K crystal in goats during onset of urolithiasis. *Res. in Vet. Sci.* 88, 461–466. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.11.010>
- 45 Tiruneh, R.A., 2006. Ruminant urolithiasis in Ethiopia: alterations of mineral concentrations in bovine urine and sheep sera according to the geographic origin or the diet regimen. *Rev. Med. Vet.* 5, 261-164.

46 Tolosa, E.M.C., Rodrigues, C.J., Behmer, O.A., Freitas-Neto, A.G., 2003. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. second ed. Manole, São Paulo.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dieta formulada foi eficaz na indução de doença clínica após 56 dias de consumo, demonstrando que a alimentação rica em grãos predispõe ao desenvolvimento da urolitíase e pode ser utilizada como modelo experimental em pesquisas futuras.

O desenvolvimento da doença clínica a partir de 56 dias de consumo demonstra que dietas ricas em grãos, quando administradas por longos períodos, resultam em lesões renais que predispõem ao desenvolvimento da urolitíase e, portanto, devem ser usadas com cautela na alimentação de ovinos de elite. Seu fornecimento deve ser restrito a curtos períodos de tempo e, de preferência, intercalado com uma dieta 70:30 (volumoso / concentrado).

A avaliação hemogasométrica de bases e gases sanguíneos venosos mostrou alterações na urolitíase, que levam ao desequilíbrio ácido-base, caracterizado por alcalose metabólica com a tentativa de compensação pela retenção de CO₂.

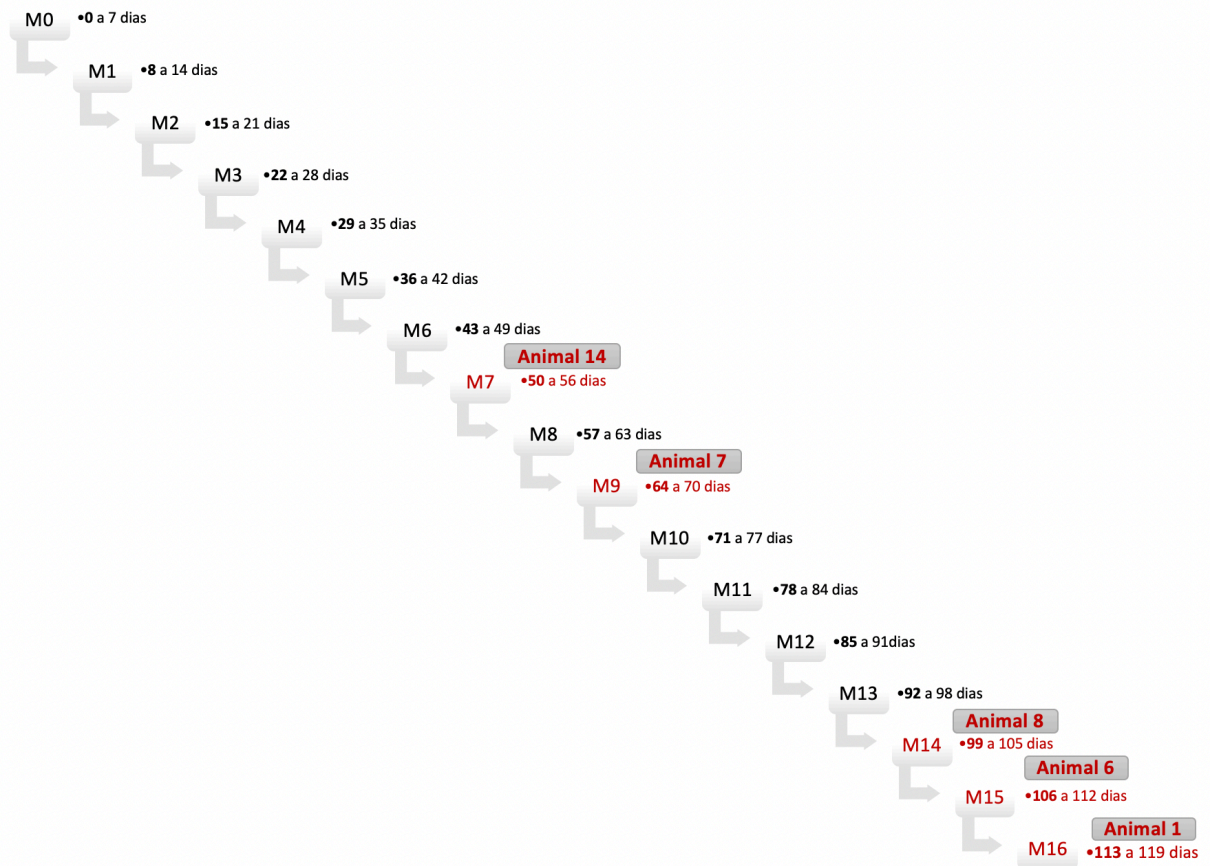
A avaliação hemogasométrica permitiu avaliar a gravidade do estado clínico, mas não ajudou na predição da doença.

Haptoglobina e transferrina foram biomarcadores sensíveis para urolitíase em ovinos, com a transferrina apresentando comportamento atípico característico de PFA positiva.

Na urolitíase aguda em ovinos, são observadas lesões vasculares inflamatórias, como leve infiltrado multifocal de linfócitos, plasmócitos e macrófagos na região medular, associado a congestão leve a moderada dos tufo glomerulares e proteínas no lúmen tubular nos rins. Da mesma forma no fígado, há degeneração gordurosa leve a moderada nas regiões centrolobulares.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Fluxograma dos momentos de coletas de material biológico para análises e de ocorrência de urolitíase



Legenda: Animais que desenvolveram urolitíase e os momentos de manifestação dos sinais clínicos em vermelho, em negrito os dias de coletas. M = momento de coleta.