

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE POLIOENCEFALOMALACIA EM
OVINOS CONFINADOS INGERINDO DIETA COM ALTO TEOR DE
ENXOFRE

DIEGO JOSÉ ZANZARINI DELFIOL

BOTUCATU –SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE POLIOENCEFALOMALACIA EM
OVINOS CONFINADOS INGERINDO DIETA COM ALTO TEOR DE
ENXOFRE

DIEGO JOSÉ ZANZARINI DELFIOL

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Secorun
Borges

BOTUCATU –SP
2012

Nome do autor: Diego José Zanzarini Delfiol

Título: INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE POLIOENCEFALOMALACIA EM
OVINOS CONFINADOS INGERINDO DIETA COM ALTO TEOR DE ENXOFRE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Augusto Bastos Afonso da Silva
Membro
Clínica de Bovinos – Campus Garanhuns
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Data da defesa: 14 de Fevereiro de 2012.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, URANDI RIBEIRO DELFIOL E MARILZA FERNADES ZANZARINI DELFIOL, pelo amor incondicional, amizade, apoio e compreensão.

Aos meus irmãos, CAMILA ZANZARINI DELFIOL E PEDRO RAFAEL ZANZARINI DELFIOL, por terem me proporcionado tantos momentos de alegria e por estarem sempre me apoiando.

Aos meus avós, PEDRO ZANZARINI E ORANIDES ZANZARINI, exemplos de vida, fé e dedicação a família.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que me presenteia todos os dias com disposição e força para buscar meus objetivos. *“O senhor é meu pastor e nada me faltará”*.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Secorun Borges pela oportunidade, confiança, ensinamentos e amizade.

Ao Professor Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, por todo o apoio durante o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos Didier Quevedo Cagnini, Giovane Olivo, José Paes de Oliveira Filho, Mariana Isa Poci Palumbo e Peres Ramos Badial pelo auxílio, amizade e convivência extremamente agradável durante esses anos.

Aos alunos de iniciação científica, Ana Claudia Gorino, Danilo Andrade, Jéssica Marques, Juliana Santos, Mariana Marinheiro e Thatiane Kievitsbosch pela colaboração durante as coletas e análises laboratoriais deste estudo.

Ao professor David Driemeier da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e seus orientados de doutorado Flademir Wouters professor da Universidade Federal de Lavras e Angélica Terezinha Barth Wouters pela leitura das lâminas histológicas do sistema nervoso central.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Dra. Vânia Maria de Vasconcelos Machado e Dr. Luiz Carlos Vulcano por permitir a utilização do aparelho de Tomografia Computadorizada e ao técnico Heraldo André Catalan Rosa pela realização dos exames.

Ao professor Dr. Stélio Pacca Loureiro Luna e a doutoranda Nadia Crosignani do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária pela colaboração no projeto.

Ao Serviço de Patologia Veterinária em nome da professora Reneé Laufer-Amorim, por permitir a utilização do salão de necropsia e equipamentos do serviço.

Ao patologista Didier Quevedo Cagnini, pela realização das necropsias e leitura das lâminas.

A minha namorada Elisa pelo carinho, compreensão e apoio em todos os momentos.

A minha tia Marly, meu tio Antonio e aos meus primos Bruna e Murilo pela amizade e apoio.

Aos amigos Eric de Castro Pereira e Hugo Shisei Toma pela receptividade, amizade e convívio extremamente agradável desde minha chegada em Botucatu.

Aos amigos Carlos Ramires Neto, Dietrich Pizzigatti, Emiliano Cisneros, Leandro Américo, Luiz Mattos e Rodrigo Cavalcante pela amizade e ajuda durante o curso de pós graduação.

Aos professores do Departamento de Clínica Veterinária, Dr. Roberto Calderon Gonçalves, Dr. Rogério Martins Amorim e Dr. Simone Biagio Chiacchio pelos conselhos, ensinamentos e agradável convivência durante esses anos.

Aos funcionários da Clínica de Grandes Animais Cesar Leme e Marco Antônio Simão pela ajuda durante o desenvolvimento do projeto e amizade.

As secretárias do Departamento de Clínica Veterinária, Marlene Dias de Camargo e Izabel Cristina Castro, pela colaboração.

Aos profissionais do Curso de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu, especialmente a Professora Dra. Sheila Canavese Rahal (Coordenadora) e aos funcionários José Roberto de Lalla Júnior (Supervisor) e Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel, pelo auxílio prestado durante meu curso de mestrado.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – Unesp, em nome do seu diretor professor Dr. Luiz Carlos Vulcano, pelo apoio da instituição para o desenvolvimento desta dissertação.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio à pesquisa e a bolsa de mestrado, possibilitando a execução deste projeto.

A todos que colaboraram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser concluído, em especial aos meus familiares e amigos.

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II

- Quadro 1.** Valores médios e desvios-padrão da frequência cardíaca em batimentos por minuto e frequência respiratória em movimentos por minuto dos animais nos 12 diferentes momentos aferidos durante as três fases experimentais..... 44
- Quadro 2.** Valores médios e desvios-padrão da temperatura retal em graus Celsius e dos movimentos ruminais em cinco minutos dos animais dos três grupos nos 12 diferentes momentos aferidos durante as três fases experimentais..... 45
- Quadro 3.** Os valores médios e desvios-padrão do sulfeto de hidrogênio ruminal (ppm) avaliados nos ovinos durante as três fases do protocolo de indução de polioencefalomalacia nos grupos G1 sem adição de sulfato de sódio e G2 e G3 com adição de sulfato de sódio... 46
- Quadro 4.** Os resultados na matéria seca da dosagem de cobre sérico expressos em $\mu\text{g/ml}$ nos momentos M1 e M12 e hepático expressos em ppm no M12..... 47

LISTA DE FIGURAS
CAPÍTULO II

Figura 1. Médias dos valores de pH sanguíneo dos animais do G1, G2 e G3, em todos os momentos do experimento.....	48
Figura 2. Médias de H ₂ S expressas em ppm nos grupos G1, G2 e G3 em cada fase do experimento	49

LISTA DE TABELAS
ANEXOS

Tabela 1. Valores individuais da frequência cardíaca em batimentos por minuto dos ovinos do grupo 1 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.....	60
Tabela 2. Valores individuais da frequência cardíaca em batimentos por minuto dos ovinos do grupo 2 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.....	60
Tabela 3. Valores individuais da frequência cardíaca em batimentos por minuto dos ovinos do grupo 3 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.....	60
Tabela 4. Valores individuais da frequência respiratória em movimentos por minuto dos ovinos do grupo 1 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.....	61
Tabela 5. Valores individuais da frequência respiratória em movimentos por minuto dos ovinos do grupo 2 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.....	61
Tabela 6. Valores individuais da frequência respiratória em movimentos por minuto dos ovinos do grupo 3 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.....	61
Tabela 7. Valores individuais da temperatura retal em graus Celsius dos ovinos do grupo 1 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.....	62

Tabela 8. Valores individuais da temperatura retal em graus Celsius dos ovinos do grupo 2 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento..... 62

Tabela 9. Valores individuais da temperatura retal em graus Celsius dos ovinos do grupo 3 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento..... 62

Tabela 10. Valores individuais dos movimentos ruminais em cinco minutos nos ovinos do grupo 1 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento..... 63

Tabela 11. Valores individuais dos movimentos ruminais em cinco minutos nos ovinos do grupo 2 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento..... 63

Tabela 12. Valores individuais dos movimentos ruminais em cinco minutos nos ovinos do grupo 3 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento..... 63

Tabela 13. Valores individuais do pH ruminal dos ovinos do grupo 1 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento..... 64

Tabela 14. Valores individuais do pH ruminal dos ovinos do grupo 2 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento..... 64

Tabela 15. Valores individuais do pH ruminal dos ovinos do grupo 3 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento..... 64

Tabela 16. Valores individuais do sulfeto de hidrogênio ruminal (H_2S) em ppm dos ovinos do grupo 1 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.....	65
Tabela 17. Valores individuais do sulfeto de hidrogênio ruminal (H_2S) em ppm dos ovinos do grupo 2 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.....	65
Tabela 18. Valores individuais do sulfeto de hidrogênio ruminal (H_2S) em ppm dos ovinos do grupo 3 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.....	65
Tabela 19. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de pH sanguíneo, nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	65
Tabela 20. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores da pressão de CO_2 , nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	66
Tabela 21. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores da pressão de O_2 , nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	67
Tabela 22. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores do excesso de base (BE), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	68
Tabela 23. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de bicarbonato (HCO_3), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	69

Tabela 24. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de total de CO ₂ (TCO ₂), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	70
Tabela 25. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores da saturação de O ₂ (sO ₂), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	71
Tabela 26. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de sódio (Na), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.	72
Tabela 27. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de potássio (K), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	73
Tabela 28. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de cálcio ionizado (i Ca), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	74
Tabela 29. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores do hematócrito (Htc), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	75
Tabela 30. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de hemoglobina (Hb), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	76

LISTA DE GRÁFICOS ANEXOS

Gráfico 1. Médias dos valores de pH sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.....	65
Gráfico 2. Médias dos valores de PCO_2 sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.....	66
Gráfico 3. Médias dos valores de PO_2 sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.....	67
Gráfico 4. Médias dos valores de BE sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.....	68
Gráfico 5. Médias dos valores de HCO_3 sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.....	69
Gráfico 6. Médias obtidas para os valores de TCO_2 , nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.....	70
Gráfico 7. Médias dos valores de sO_2 sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.....	71
Gráfico 8. Médias dos valores de Na dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.....	72

Gráfico 9. Médias dos valores de K dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento..... 73

Gráfico 10. Médias dos valores de i Ca dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento..... 74

Gráfico 11. Médias dos valores de Htc dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento..... 75

Gráfico 12. Médias dos valores de Hb dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento..... 76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO I	
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Polioencefalomalacia ocasionada pelo excesso de enxofre	6
2.2. Fontes de enxofre	6
2.3. Epidemiologia	7
2.3.1. Surtos	7
2.3.2. Indução experimental	8
2.4. Fisiopatogenia da polioencefalomalacia induzida por enxofre	11
2.5. Sinais clínicos	13
2.6. Diagnóstico diferencial	13
2.7. Diagnóstico clínico e patológico	14
2.8. Prognóstico e tratamento	17
2.9. Prevenção	18
CAPÍTULO II Trabalho científico	
Abstract	21
Resumo	22
Introdução	22
Material e Métodos	24
Resultados	29
Discussão	32
Conclusões	38
Referências	39
Quadros	44
Figuras	48
CONCLUSÕES GERAIS	50
REFERÊNCIAS CAPÍTULO I	53
ANEXOS	60

DELFIOL, D.J.Z. **Indução experimental de polioencefalomalacia em ovinos confinados ingerindo dieta com alto teor de enxofre.** Botucatu, 2012. 83p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Em ovinos o excesso de enxofre na dieta é apontado como uma das principais causas de polioencefalomalacia (PEM). Na literatura nacional relatos de PEM induzida por enxofre em ovinos são escassos. O objetivo desta dissertação foi induzir PEM em ovinos fornecendo uma dieta rica em carboidratos e com diferentes níveis de enxofre e realizar avaliações clínicas e laboratoriais. Foram utilizados 18 ovinos divididos em três grupos (G1, G2 e G3) que receberam diferentes níveis de enxofre na dieta 0,2%, 0,9% e 1,2% respectivamente. Exames clínicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e motricidade ruminal) e laboratoriais (concentração de sulfeto de hidrogênio ruminal, hemogasometria venosa, pH do fluido ruminal, concentração de cobre sérico e hepático, tomografia computadorizada, necropsia e histopatológico) foram realizados em diferentes momentos. A temperatura retal, hemogasometria venosa e pH do fluido ruminal estavam dentro dos valores de referência para a espécie. Taquicardia e taquipnéia foram observadas nos três grupos. A motricidade ruminal estava diminuída nos grupos G2 e G3 em relação ao G1. Quanto maior a ingestão de enxofre, menor foram os níveis de cobre sérico e hepático detectados nos ovinos. Elevados valores de sulfeto de hidrogênio foram detectados nos grupos G2 e G3. Nenhum animal apresentou sinais clínicos de PEM. Na tomografia computadorizada, necropsia e exame histopatológico do sistema nervoso central, nenhuma alteração compatível com PEM foi observada. É provável que algum outro fator pode estar associado ao excesso de enxofre na dieta para que os ovinos desenvolvam PEM.

Palavras-chave: necrose cerebrocortical; ovinos; sulfeto de hidrogênio ruminal; cobre.

DELFIOL, D.J.Z. **Polioencephalomalacia experimental induction in feedlot sheep receiving high sulfur diet**. Botucatu, 2012. 83p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The excess sulfur intake in sheep is described as major cause of polioencephalomalacia (PEM). In the national literature are scarce reports of sulfur induced PEM in sheep. This work aimed to feed sheep using a rich carbohydrate diet supplemented with different levels of sulfur in order to induce PEM, and to perform clinical and laboratory tests. Eighteen sheep were divided into three groups (G1, G2, and G3) and supplemented with 0.2%, 0.9% and 1.2% sulfur in diet, respectively. Clinical evaluation (i.e., heart rate, respiratory rate, rectal temperature and rumen motility) and laboratory exams (i.e., ruminal hydrogen sulfide concentration, venous gas analysis, ruminal pH, serum and liver copper concentration, computed axial tomography, necropsy, and histopathological examination) were performed. Rectal temperature, venous gas and ruminal pH were within normal limits. Tachycardia and tachypnea were observed in the three groups. Rumen motility was decreased in groups G2 and G3 when compared with G1. The higher the sulfur intake, the lower the serum and liver levels of copper. Increased ruminal hydrogen sulfide concentration was detected in G2 and G3. None of the animals had clinical signs of PEM. Computed axial tomography, necropsy, and histopathological examination of the central nervous system showed no evidence of PEM. It is thought that other factors are associated with excessive sulfur consumption for a PEM outbreak to occur in sheep.

Key-words: cerebrocortical necrosis; sheep; ruminal hydrogen sulfide; copper,

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho efetivo de 17.380.581 cabeças de ovinos, do total de animais, 56,7% estão localizados no Nordeste brasileiro, embora o maior estado produtor seja o Rio Grande do Sul com 22,9% do rebanho nacional. O Sudeste detém um rebanho de 781.874 animais, o que significa 4,5% do total de ovinos no país, destes 467.253 (59,76%) estão no estado de São Paulo (PPM 2010).

A ovinocultura vem apresentando considerável crescimento nos últimos anos, tanto pelo aumento no número de animais nos rebanhos, quanto pela maior quantidade de propriedades envolvidas nessa atividade. A produção da carne ovina representa uma atividade cuja participação sócio-econômica é crescente e se mostra como alternativa de viabilização da pequena e média propriedade rural (Bueno et al. 2006, PPM 2010).

A espécie ovina, como produtora de carne ocupa posição intermediária em relação às demais (bovinos, aves e suínos). No Brasil o consumo *per capita* da carne ovina é de 0,7 Kg/ano. O baixo consumo de carne ovina no Brasil deve-se principalmente ao fato de que a quantidade necessária para abastecer o mercado brasileiro é inferior ao que é produzido pelo setor, justificando, a ovinocultura tipo corte estar em pleno desenvolvimento (Silva Sobrinho & Moreno 2009).

Para a produção de cordeiros de qualidade, com os padrões exigidos pelo mercado, é necessário intensificar a produção. O número de cordeiros confinados no estado de São Paulo vem crescendo significativamente (PPM 2010) e esse tipo de manejo, pode predispor o animal a uma série de enfermidades, dentre elas a polioencefalomalacia (PEM) (Bueno et al. 2006, Sant'Anna et al. 2009).

PEM é um termo descritivo que se refere ao amolecimento da substância cinzenta do encéfalo (Gould 1998). A doença caracteriza-se por

necrose neuronal no córtex cerebral e posteriormente malácia (McAllister 1992). Alguns autores também a denominam de necrose cerebrocortical (Loew et al. 1969, Gould et al. 1991).

A PEM pode ser ocasionada por quatro fatores na espécie ovina, deficiência ou distúrbio no metabolismo da tiamina (Jensen et al. 1956), intoxicação por cloreto de sódio associada à privação de água (Scarratt et al. 1985), consumo excessivo de enxofre na dieta (Gooneratne et al. 1989) e pela inoculação experimental do herpesvirus bovino 5 (Silva et al. 1998).

Nos Estados Unidos estima-se que aproximadamente 19% dos casos de morte em cordeiros de engorda, ocorrem devido à PEM (Radostits et al. 2007). No Brasil apesar de relatos de PEM em ovinos no Distrito Federal (Moscardini et al. 2003), Pernambuco (Nascimento et al. 2003, Vieira et al. 2007), Paraíba (Lima et al. 2005) e Mato Grosso do Sul (Sant'ana et al. 2009a) a etiopatogenia da síndrome ainda é pouco estudada.

Na literatura internacional a toxicose por enxofre tem sido relatada como uma das principais causas de PEM em ovinos (Gooneratne et al. 1989, Rousseaux et al. 1991, McAllister et al. 1992, Jeffrey et al. 1994, Alves de Oliveira et al. 1996, Low et al. 1996, Bulgin et al. 1996, Krasicka et al. 1999) e bovinos (Sager et al. 1990, Gould et al. 1991, Gould et al. 1997, Loneragan et al. 1998). No Brasil existe suspeita de que o excesso de enxofre na dieta tenha sido responsável por um surto de PEM na espécie ovina, porém testes laboratoriais não foram realizados para comprovar esta hipótese (Lima et al. 2005). Em bovinos existem dois surtos relatados no Rio Grande do Sul (Traverso et al. 2001, Cunha et al. 2010) e um trabalho experimental no estado de São Paulo (Cunha et al. 2011).

Independente da causa da PEM nas diversas espécies, os sinais clínicos identificados são semelhantes (Jensen et al. 1956, Scarratt et al. 1985, Gooneratne et al. 1989) o que torna difícil estabelecer um diagnóstico ante-mortem (Cunha 2010). A literatura nacional é escassa em relação aos achados clínicos e laboratoriais para o diagnóstico diferencial da PEM ocasionada pelo enxofre, principalmente na espécie ovina.

Em ovinos, o consumo excessivo de enxofre além da PEM, pode causar queda no desempenho dos animais, problemas respiratórios e entéricos (Alves de Oliveira et al. 1996, Bulgin et al. 1996, Kung Jr 2008) trazendo prejuízos aos criadores e em muitos casos pode inviabilizar a produção.

Para a compreensão da etiopatogenia de uma doença é importante o desenvolvimento de modelos experimentais. Isto foi bastante caracterizado no estudo da PEM por enxofre em bovinos (Cunha et al. 2011) e por amprólio em ovinos (Sant'Ana et al. 2009). Falta na literatura nacional um modelo experimental capaz de induzir PEM por enxofre em ovinos e que permita que a doença seja estudada.

O objetivo desta dissertação foi induzir PEM em ovinos fornecendo uma dieta rica em carboidratos e com diferentes níveis de enxofre e realizar avaliações clínicas e laboratoriais.

Capítulo I

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Polioencefalomalacia ocasionada pelo excesso de enxofre

Jensen et al. (1956) descreveram pela primeira vez a PEM em ovinos e bovinos. Durante os 25 anos subsequentes sua etiologia foi atribuída à deficiência ou distúrbio no metabolismo da tiamina, principalmente pela presença de tiaminases no rúmen dos animais afetados (Lemos & Riet-Correa 2007) e pela resposta positiva ao tratamento com esta vitamina (Gould 2000).

A partir de 1982 estabeleceu-se que o excesso de enxofre na dieta poderia causar PEM (Raisbeck 1982), o que foi confirmado por vários autores em ovinos (Gooneratne et al., 1989, Bulgin et al., 1996, Low et al., 1996) e bovinos (Sager et al., 1990, Loneragan et al. 1998, Gould 1998).

2.2. Fontes de enxofre

As principais fontes de enxofre associadas a descrições de PEM em ovinos na forma de surtos foram: sulfato de amônio (Jefrey et al. 1994) e flor de enxofre adicionados a ração (Lima et al. 2005), aspersão de solução aquosa de enxofre no solo contaminando a pastagem (Bulgin et al. 1996). Low et al. (1996) associaram um surto de PEM ao consumo de ração peletizada contendo alto teor de enxofre nos ingredientes.

A doença também já foi reproduzida experimentalmente em ovinos utilizando-se hidrossulfeto de sódio fornecido através de sonda esofágica (MacAllister et al. 1992), pela adição de sulfato de amônio (Alves de Oliveira et al. 1996) e sulfato de sódio à ração (Krasicka et al. 1999).

2.3. Epidemiologia

2.3.1. Surtos

Jefrey et al. (1994) relataram um surto de PEM em ovinos que foi associado à ingestão de ração contendo sulfato de amônio. A empresa responsável pelo fornecimento da ração substituiu o bicarbonato de amônio utilizado para acidificar a urina e evitar urolitíase, por sulfato de amônio. A concentração do sulfato não foi informada pelos autores. Esta medida visando diminuir os custos na produção aumentou o teor de enxofre na ração, ocasionando PEM em 25 animais de um total de 120 (21%); desses 25 ovinos nove morreram (36%). Alguns animais foram medicados com 10 mg/kg de tiamina não se obtendo resposta eficaz. Além disso, os níveis de tiamina no sangue estavam dentro dos valores de referência considerados normais.

Low et al. (1996) descreveram que em um lote com 71 ovinos, após ser introduzida na alimentação uma ração peletizada, contendo 0,43% de enxofre na MS, 21 animais (29,6%) apresentaram sinais clínicos de PEM e nove (42,9%) morreram. Os ovinos adoeceram entre o décimo segundo e trigésimo segundo dias consumindo da dieta e após esse período, o fornecimento da ração foi suspenso e mais nenhum animal adoeceu. Na necropsia e no exame histopatológico do encéfalo, as lesões encontradas foram características de PEM.

Bulgin et al. (1996) relataram que um rebanho de 2.200 ovelhas foram transferidas para uma pastagem de alfafa e 2 horas após o início do pastejo 700 ovelhas começaram apresentar sinais de desconforto abdominal e incoordenação. Poucas horas depois os animais foram retirados da pastagem, entretanto 2.000 ovelhas (90,9%) já estavam acometidas e dessas, 228 morreram (11,4%), sendo 206 nas primeiras 24 horas e as outras entre dois e 30 dias. Os achados de necropsia principalmente nos animais que apresentaram curso crônico da doença eram compatíveis com PEM. Uma posterior investigação revelou que a pastagem de alfafa havia sido aspergida

16 horas antes dos animais serem transferidos, com uma solução aquosa com 35% enxofre, o equivalente a 60 kg de enxofre por hectare, com o intuito de reduzir o pH do solo.

Lima et al. (2005) associaram um surto de PEM em um rebanho de 50 ovinos, na cidade de Monteiro na Paraíba à ingestão de uma mistura múltipla contendo 1,3% de flor de enxofre; seis animais (12%) que apresentaram sinais clínicos de PEM morreram. Apesar do nível de enxofre na dieta não ter sido estabelecido, os autores estimaram o consumo de enxofre em 0,4% da MS.

2.3.2. Indução experimental

Gooneratne et al. (1989), forneceram a ovinos, durante 12 semanas, uma dieta contendo cevada, soja e alfafa com 0,63% de enxofre na MS. Os animais foram divididos em dois grupos com 3 animais. O grupo 1 foi suplementado com tiamina (230 mg/kg de MS) e o grupo 2 recebeu a ração sem suplementação. Entre a segunda e a terceira semanas, todos os animais do grupo 2 desenvolveram sinais clínicos de PEM (diminuição de apetite, depressão, pressão da cabeça contra obstáculos e morte). Os animais do grupo 1 não apresentaram nenhum sinal clínico da doença entretanto, na necropsia, os seis animais possuíam lesões cerebrais sugestivas de PEM. Este trabalho demonstrou que o excesso de enxofre na dieta é capaz de causar lesões no cérebro de ovinos independente da suplementação com tiamina na dose proposta.

Rousseaux et al. (1991) forneceram durante 12 semanas uma dieta composta por 59% de cevada, 5% de farelo de soja e 32% de alfafa a 56 ovinos que foram divididos em 4 grupos: grupo 1, nove animais consumindo dieta com nível adequado de enxofre e baixa quantidade de tiamina; grupo 2, nove ovinos consumindo nível adequado de enxofre e suplementados com tiamina (243mg/kg de ração); grupo 3, 22 ovinos consumindo alto teor de enxofre (0,63% na MS) e baixa quantidade de tiamina; e grupo 4, 16 animais consumindo alto e teor de enxofre (0,63% na MS) e suplementados com

tiamina (243mg/Kg de ração). No grupo 3, sete animais (31,8%) apresentaram sinais clínicos de PEM e desses ovinos, cinco (71,4%) morreram e dois se recuperaram. Na necropsia 12 dos 22 ovinos apresentaram alterações macroscópicas (amolecimento e amarelamento do córtex cerebral) e histopatológicas (necrose neuronal e malacia) compatíveis com PEM. No grupo 4 nenhum animal apresentou quadro clínico de PEM, porém, na necropsia e no exame histopatológico foram observadas em oito ovinos, lesões semelhantes às encontradas nos animais do grupo 3. Os níveis sanguíneos de tiamina em todos os animais estavam dentro do intervalo de referência considerado normal para ovinos.

Olkowski et al. (1992) dosaram os níveis de tiamina no sangue, fígado e encéfalo nos animais do experimento realizado por Rousseaux et al. (1991). Os animais suplementados com tiamina tiveram maiores níveis da vitamina detectados no sangue porém, em todos os grupos, os níveis estavam dentro do intervalo de referência para a espécie. No fígado, os animais do grupo 1 mostraram menor concentração de tiamina em relação aos outros grupos ($p < 0,0001$) porém, entre os grupos 3 e 4 que receberam alto teor de enxofre na dieta, não houve diferença. No encéfalo não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Os autores concluíram que o enxofre não interferiu nos níveis de tiamina no sangue, fígado e encéfalo dos ovinos.

McAllister et al. (1992) induziram PEM em cordeiros administrando solução de hidrosulfeto de sódio (75 mg/kg) por sonda esofágica em 10 ovinos. Cada animal recebeu de três a sete doses da solução com intervalo de 20 minutos entre as administrações. Todos os animais apresentaram sinais clínicos de intoxicação, sendo que após 45 minutos da primeira administração um animal apresentou sinais neurológicos (ataxia, tremores, cegueira, nistagmo vertical e opistótono). Todos os animais morreram entre 75 minutos e 4 dias após a intoxicação, mas somente em quatro ovinos o exame histopatológico confirmou PEM. Este modelo experimental é eficaz para indução de PEM em ovinos, porém o hidrosulfeto de sódio é extremamente tóxico para humanos e não deve ser utilizado.

Alves de Oliveira et al. (1996) com o objetivo de avaliar se o alto teor de enxofre na dieta era capaz de modificar os níveis de tiamina e de tiaminase no rúmen utilizaram sete cordeiros, sendo que quatro receberam uma dieta contendo 0,6% de enxofre, (0,2% de sulfato de sódio somados a 0,4% de sulfato de amônio) e três animais (controle) receberam níveis adequados de enxofre na dieta. O experimento durou 16 semanas. Somente um animal do grupo experimental apresentou, na sétima semana sinais clínicos de PEM. Os níveis de tiamina e de tiaminase no rúmen não sofreram alterações.

Krasicka et al. (1999) forneceram a 10 cordeiros durante 12 semanas, uma dieta composta de concentrado (cevada, farelo de soja e fécula de batata) e feno na proporção de 3,7:1. Os animais foram divididos em dois grupos com cinco animais. O grupo 1 ingeriu 0,2% de enxofre e o grupo 2 recebeu 0,8% de enxofre na MS. Como fonte de enxofre foi utilizado o sulfato de sódio. Todos os animais do grupo 2 apresentaram sinais clínicos agudos de PEM durante a 12^a semana de experimento (tremores musculares, convulsão, decúbito, prostração e morte). Os animais do grupo 1 não apresentaram sinais clínicos. Nesse estudo os animais acometidos não responderam ao tratamento com tiamina. Os autores avaliaram também a interferência do enxofre na digestibilidade e no metabolismo das bactérias ruminais, e não observaram diferença entre os grupos.

Neville et al. (2010) realizaram um trabalho onde no primeiro estudo utilizaram 240 ovinos divididos em quatro grupos de 60 animais. Os ovinos receberam uma dieta com 15% de feno de alfafa e 85% de concentrado (60% de grãos secos provenientes de destilaria que são ricos em enxofre devido ao ácido sulfúrico utilizado no processamento), totalizando 0,73 % de enxofre na MS. O grupo 1 serviu como controle e os outros grupos foram suplementados com tiamina (grupo 2 com 50 mg/animal/dia, grupo 3 com 100 mg/animal/dia e grupo 4 com 150 mg/animal/dia), durante 110 dias até os animais atingirem peso para abate. Nenhum animal do experimento apresentou sinais clínicos de PEM. No segundo estudo foram utilizados 55 animais divididos em cinco grupos, quatro grupos receberam tratamentos iguais ao do primeiro estudo e o grupo 5 recebeu dieta com 0,87% de enxofre suplementados com 150 mg/animal/dia de tiamina. O segundo estudo durou 112 dias e nenhum animal

desenvolveu PEM. Neste segundo estudo realizou-se exame histopatológico do encéfalo dos animais e nenhuma alteração de PEM foi observada.

2.4. Fisiopatogenia da polioencefalomalacia induzida por enxofre

O enxofre elemento essencial na nutrição de ruminantes, é importante na formação de vitaminas (tiamina e biotina) e aminoácidos sulfurados (cistina, cisteína e metionina), que são necessários para o crescimento dos microorganismos do rúmen (Ortolani 2001).

Para ovinos recomenda-se a ingestão entre 0,15 e 0,26% de enxofre na matéria seca (NRC 2005). O consumo de enxofre em excesso diminui o desempenho dos ruminantes causando queda no consumo dos alimentos e perda de peso (Gould et al. 1991). Além disso, o alto consumo de enxofre na alimentação aumenta a capacidade dos microorganismos ruminais em gerar sulfeto de hidrogênio também conhecido como gás sulfídrico (H_2S), considerado tóxico (Kandylis 1984). Para Cummings et al. (1995) o H_2S está diretamente envolvido na patogenia da PEM.

No rúmen as formas de enxofre podem ser oxidadas para sulfatos ou reduzidas para sulfeto, caracterizando o ciclo biológico do enxofre. Existem dois tipos de bactérias que reduzem sulfatos: as dissimilatórias e as assimilatórias. As bactérias dissimilatórias usam o enxofre como receptor terminal de elétrons e produzem grande quantidade de H_2S como produto metabólico final, enquanto as assimilatórias reduzem o enxofre para formar aminoácidos que contenham enxofre (Kandylis 1984). Produção e acúmulo excessivo de sulfeto no rúmen poderiam ser causados pela predominância de bactérias dissimilatórias ou por capacidade assimilatória insuficiente (Gould 2000).

Em ruminantes a eliminação de gás sulfídrico através da eructação é um processo normal. Acredita-se que até 60% do H_2S eructado possa ser inalado e absorvido pelo trato respiratório (Bulgin et al. 1996). A inalação do H_2S a

partir de dietas com elevado teor de enxofre, juntamente com sua absorção na parede do rúmen pela corrente sanguínea, tem sido implicada como causa de PEM. Além disso, a inalação do H_2S ainda pode ocasionar lesão no tecido pulmonar predispondo o animal a infecções virais e bacterianas secundárias ocasionando queda de desempenho e muitas vezes morte (Kung Jr 2008).

O H_2S absorvido pela corrente sanguínea na parede do rúmen e em grande quantidade inibe a função da anidrase carbônica, dopa oxidase, catalase, peroxidase, desidrogenase e dipeptidase, afetando negativamente o metabolismo oxidativo e a produção de ATP oxidase (Beauchamp et al. 1984, Bulgin et al. 1996). A depleção de ATP pode causar necrose da substância cinzenta cerebral e os neurônios são altamente susceptíveis a esta condição (MacAllister et al. 1997). No sangue, o sulfeto se liga à hemoglobina criando a sulfahemoglobina reduzindo a capacidade do sangue de transportar oxigênio para os tecidos (Bulgin et al. 1996).

Os elementos da dieta podem participar de forma bastante significativa na produção excessiva de gás sulfídrico ruminal (Gould 2000). Os minerais como zinco, cobre, ferro e molibdênio podem interferir na intoxicação por enxofre. Molibdênio, cobre e enxofre combinam formando o cobre-tiomolibdato que é insolúvel (Burguess 2008). Cobre zinco e ferro formam sal insolúvel com o sulfeto. A formação de sulfeto diminui a absorção da maioria dos minerais, sendo que quantidades extras de cobre, zinco e ferro podem ser necessárias para ruminantes que consomem elevada quantidade de enxofre (Gould 1998). Ingestões de elevadas quantidades de enxofre diminuem a biodisponibilidade de cobre culminando em queda de desempenho (Loneragan et al. 2001). O molibdênio pode inibir a ação das bactérias redutoras de enxofre (Gould 2000).

2.5. Sinais clínicos

Na PEM induzida por enxofre nem sempre os danos estruturais no cérebro se manifestam como um efeito funcional; os animais podem estar acometidos e não apresentarem sinais clínicos (Gooneratne et al. 1989, Rousseaux et al. 1991, Olkowski et al. 1992).

Quando presentes, os sinais clínicos podem se manifestar de forma aguda caracterizada por amaurose, agressividade, decúbito, convulsões e frequentemente morte, e da forma subaguda, caracterizada por inapetência, apatia, depressão, cegueira parcial, pressão de cabeça contra obstáculos, andar em círculos, opistótono, ranger de dentes, tremores e espasmos musculares, incoordenação e ataxia. No início pode-se observar movimento das orelhas ou contrações dos músculos faciais. Os animais acometidos podem apresentar um ou vários sinais clínicos concomitantemente (Gooneratne et al. 1989, Rousseaux et al. 1991, McAllister et al. 1992, Jeffrey et al. 1994, Alves de Oliveira et al 1996, Low et al. 1996, Bulgin et al. 1996, Krasicka et al. 1999).

Os animais acometidos pela forma subaguda têm maior chance de recuperação, podendo permanecer com algumas sequelas neurológicas mínimas (Gould 2000). Alguns animais exalam odor de sulfeto de hidrogênio (ovo em putrefação), que pode ser facilmente identificado, esse odor ocorre pela produção excessiva de H₂S ruminal (Bulgin et al. 1996, Burgess 2008).

2.6. Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da PEM, ocasionada pelo consumo excessivo de enxofre deve incluir todas as enfermidades que causam sinais encefálicos em ovinos como deficiência no metabolismo da tiamina, raiva, encefalomalacia simétrica focal, toxemia da gestação e listeriose (Jensen et al. 1956, Radostits et al. 2007, Burgess 2008).

2.7. Diagnóstico clínico e patológico

O diagnóstico da PEM ocasionada por ingestão excessiva de enxofre deve ser realizado com base na epidemiologia, quadro clínico, na dosagem do teor de gás sulfídrico ruminal, na dosagem do enxofre na dieta e pelas alterações macroscópicas e microscópicas no SNC (Gould 2000, Sant'Ana et al. 2009b).

Ao determinar o teor de enxofre em uma dieta, todas as fontes devem ser incluídas, analisando-se tanto os alimentos sólidos quanto a água (Gould 1998). Fontes de enxofre podem incluir suplementos dietéticos, como metionina, enxofre elementar, sulfato de sódio, sulfato de magnésio, sulfato de amônio e sulfato de cálcio. O enxofre também é encontrado no feno, milho, cana de açúcar, beterraba e agentes acidificantes usados no processamento de melão e fertilizantes (Burgess 2008).

O NRC (2005) recomenda na dieta de ovinos entre 0,14 e 0,26 % de enxofre na matéria seca e essa quantidade não pode ultrapassar 0,4%. Kandylis (1984) considera que animais que ingerem dietas entre 0,3% e 0,4% de enxofre correm o risco de intoxicação. Concentrações de enxofre acima de 1.000 ppm na água e 4.000 ppm na dieta, podem favorecer a intoxicação por esse elemento (Cebra & Cebra 2004).

Na PEM, ocasionada por enxofre não se observa alterações significativas no hemograma e na bioquímica sérica (Olkowski 1997, Radostits et al. 2007). O líquido na maioria dos casos é normal, podendo ocorrer apenas aumento marginal na contagem de células com predominância de linfócitos (Scott, 1992). O exame do líquido auxilia o clínico a excluir causas infecciosas que desencadeiam sinais clínicos neurológicos como raiva, listeriose e meningites bacterianas (Scott, 2010).

Um método semi quantitativo rápido e pratico para detectar a quantidade de H₂S em surtos de PEM foi desenvolvido por Gould et al. (1997). O método consiste na punção do gás ruminal através da fossa paralombar esquerda com

um cateter 14G encaixado a um equipo médico de 13 cm, que se acopla a um tubo colorimétrico de dosagem de gás sulfídrico que por sua vez é acoplado a uma bomba de vácuo manual específica para essa finalidade. A leitura é expressa em ppm e obtida após aspiração de 50 a 300 ml de gás. Os tubos colorimétricos são comercializados em diversas graduações, mas todos contêm o corante nitrato de prata que ao entrar em contato com o gás sulfídrico, coram-se de preto, facilitando a leitura e estabelecendo a concentração do gás sulfídrico ruminal (Gould et al. 1997).

Em bovinos, leituras de H_2S acima de 500 ppm são consideradas tóxicas (Gould et al. 1997). Em ovinos ainda não foi estabelecido o limite tolerável de H_2S ruminal, porém esta metodologia já foi empregada para detectar rebanhos ingerindo dieta com alto teor de enxofre (Neville et al. 2010).

Os achados de necropsia variam de acordo com a severidade e duração dos sinais clínicos. Nos casos de evolução rápida podem ser observados apenas, edema e diminuição da consistência do cérebro, alterações que podem ser de difícil percepção. A evidência mais clara do edema cerebral é o deslocamento caudal do cerebelo, que se apresenta em forma de cone, devido à herniação através do forame magno. Também pode ser observado herniação do girus do parahipocampo por baixo do tentório. Nos casos com curso mais prolongado pode-se notar depressão e achatamento das circunvoluções. Ao corte, principalmente após a fixação e em animais com quatro ou mais dias de evolução áreas do córtex apresentam-se com consistência diminuída e amareladas (Lemos & Riet-Correa 2007).

As lesões necróticas no córtex cerebral podem ser evidenciadas pela autofluorescência utilizando-se uma lâmpada ultravioleta de 366-nm (Gould 2000). A autofluorescência ocorre com maior frequência em animais que tiveram curso prolongado da doença (Lemos & Riet-Correa 2007). MacAllister et al. (1992) relataram autofluorescência no córtex cerebral de um ovino que morreu 20 horas após a indução de PEM com hidrossulfeto de sódio. A autofluorescência acontece devido à presença de um pigmento na área de necrose chamado lipofucsina (Machen et al. 2004).

Os achados histopatológicos incluem necrose laminar nas circunvoluções cerebrais, com separação das substâncias branca e cinzenta. Os neurônios apresentam citoplasma eosinofílico e podem parecer degenerados ou enrugados. Pode haver edema pericelular, cromatólise nuclear e vacuolização (Gooneratne et al. 1989, Krasicka et al. 1999, Machen et al. 2004).

Além das lesões corticais podem ocorrer malacia e edema em estruturas profundas do encéfalo, como mesencéfalo e tálamo. Nestes casos em que há necrose neuronal nas estruturas mais ventrais do encéfalo, o quadro é sugestivo de PEM ocasionada por enxofre, favorecendo a diferenciação da PEM relacionada à deficiência de tiamina (Jeffrey et al. 1994, Low et al. 1996).

Existem outros exames que podem auxiliar no diagnóstico da PEM, como a dosagem de sulfato inorgânico sérico, tomografia computadorizada, ressonância magnética e potencial auditivo evocado.

O sulfato inorgânico sérico pode ser determinado segundo a técnica turbidimétrica descrita por Krijgsheld et al. (1979). Quanto maior a ingestão dietética de enxofre, maior a concentração de sulfato inorgânico no sangue (Barreto Júnior 1996). Alguns autores indicam a dosagem de sulfato inorgânico sérico, a fim de avaliar o status de enxofre nos ruminantes (Kennedy & Siebert 1972; Ortolani et al. 2001, Barreto Júnior et al. 2008).

Exames complementares como a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética são pouco utilizados em animais de produção, principalmente devido ao custo elevado, mas seu uso pode ajudar a avaliar o tamanho das lesões e correlacionar o local lesionado com os sinais clínicos. A TC mostrou-se precisa para avaliar o tamanho e a localização dos cistos cerebrais em ovinos com cenurose (Gonzalo Orden et al. 1999).

A ressonância magnética tem maior capacidade de demonstrar diferentes estruturas no cérebro e têm facilidade em demonstrar mínimas alterações na maioria das doenças. Alterações morfológicas são mais facilmente avaliadas do que na TC (Amaro Júnior & Yamashita 2001). Tsuka et al. (2008) conseguiram detectar alterações no cortex cerebral de um bovino de

2 meses de idade através do exame de ressonância magnética e posteriormente, o exame histopatológico confirmou o diagnóstico de PEM.

O potencial auditivo evocado é uma técnica não invasiva utilizada para detectar anormalidades neurofisiológicas nas vias auditivas periféricas e centrais. Olkowski et al. (1990) utilizaram o teste em ovinos consumindo alto teor de enxofre (0,63%) e detectaram anormalidades nas vias auditivas centrais que posteriormente foram confirmadas com o exame histopatológico de cortes específicos do sistema nervoso central (núcleo coclear e leminisco lateral). Neste trabalho foram utilizados 22 animais e somente três apresentaram sinais clínicos leves de PEM (inapetência, depressão e excitabilidade intermitente) que cessaram em três dias. O experimento durou 14 semanas e o teste foi realizado na sétima e na última semanas sendo que as anormalidades observadas no exame foram maiores na décima quarta semana, na maioria dos animais.

2.8. Prognóstico e tratamento

O prognóstico quanto à vida é reservado, e depende do nível de comprometimento do sistema nervoso central. Em animais afetados que se recuperam é comum a permanência de cegueira e de sequelas de nervos cranianos (Sant'Ana et al. 2009b).

Lemos & Riet-Correa (2007) sugerem a administração de tiamina e dexametasona no tratamento da PEM. Porém, os efeitos benéficos da administração parenteral de tiamina e corticosteróides não são claros (Gould 2000).

Trabalhos realizados por Gooneratne et al. (1989), Rousseaux et al. (1991) e Olkowski et al. (1992) demonstraram que ovinos recebendo dieta com alto teor de enxofre e suplementados com tiamina (230 a 243 mg/kg de ração) não desenvolveram sinais clínicos de PEM. Enquanto, ovinos recebendo a mesma dieta sem a suplementação apresentaram clínica. Um achado em

comum em todos os animais que apresentaram sinais clínicos foi à presença de edema cerebral, enquanto nos animais suplementados com tiamina o edema não estava presente. Segundo Olkowski et al. (1992), a tiamina auxilia na produção de ATP que é essencial para o bom funcionamento da bomba de sódio e potássio que regula a entrada e saída de água no interior das células evitando a formação de edema e consequentemente o aparecimento de sinais clínicos.

Outro possível efeito benéfico da tiamina é que os metabólitos do enxofre, como o sulfeto e o sulfito, originam radicais livres que causam peroxidação lipídica e consequentemente lesões nas membranas celulares. O tecido cerebral, por possuir alta concentração de lipídeos seria altamente vulnerável aos danos causados por este processo. A tiamina age removendo os radicais livres tendo uma função protetora no tecido cerebral (Olkowski et al. 1992).

Segundo Radostits et al. (2007) quando ocorre melhora dos sinais clínicos poucas horas após a administração de tiamina, o quadro é sugestivo de deficiência da vitamina, quando o tratamento não funciona, é indicativo de intoxicação por enxofre.

2.9. Prevenção

Remover os animais dos locais onde existam fontes com alto teor de enxofre é uma medida de controle importante. Analisar o teor de enxofre da ração, forrageira e água é necessário para prevenir doenças quando o consumo de enxofre está acima dos níveis tolerados (Gould 2000).

A dosagem de H_2S ruminal pode identificar ovinos que consomem alto teor de enxofre na dieta. É um teste rápido e prático de ser realizado, sendo útil para monitorar situações de risco (Neville et al. 2010).

Capitulo II

Trabalho a ser enviado para a revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Aspectos clínicos e laboratoriais em ovinos recebendo dieta com diferentes níveis de enxofre visando a indução de polioencefalomalacia

(Clinical and laboratory aspects of sheep supplemented with different levels of sulfur in diet to induce polioencephalomalacia)

Abstract

Polioencephalomalacia (PEM) is a neuropathologic condition of ruminantes that can be induced by a variety of factors of them excessive intake of sulfur. This work aimed to feed sheep using a rich carbohydrate diet supplemented with different levels of sulfur in order to induce PEM, and to perform clinical and laboratory tests. Eighteen sheep were divided into three groups (G1, G2, and G3) and supplemented with 0.2%, 0.9% and 1.2% sulfur in diet, respectively. Clinical evaluation (i.e., heart rate, respiratory rate, rectal temperature and rumen motility) and laboratory exams (i.e., ruminal hydrogen sulfide concentration, venous gas analysis, ruminal pH, serum and liver copper concentration, computed axial tomography, necropsy, and histopathological examination) were performed. Rectal temperature, venous gas and ruminal pH were within normal limits. Tachycardia and tachypnea were observed in the three groups. Rumen motility was decreased in groups G2 and G3 when compared with G1. The higher the sulfur intake, the lower the serum and liver levels of copper. Increased ruminal hydrogen sulfide concentration was detected in G2 and G3. None of the animals had clinical signs of PEM. Computed axial tomography, necropsy, and histopathological examination of the central nervous system showed no evidence of PEM. It is thought that other factors are associated with excessive sulfur consumption for a PEM outbreak to occur in sheep.

INDEX-TERMS: cerebrocortical necrosis; sulphur; ruminal hydrogen sulfide; experimental model.

Resumo

A polioencefalomalacia (PEM) é uma doença neurológica que acomete ruminantes e pode ser desencadeada por diversos fatores dentre eles o consumo excessivo de enxofre. O presente trabalho teve como objetivo induzir PEM em ovinos fornecendo uma dieta rica em carboidratos e com diferentes níveis de enxofre e realizar avaliações clínicas e laboratoriais. Para realização da pesquisa foram utilizados 18 ovinos divididos em três grupos (G1, G2 e G3) que receberam diferentes níveis de enxofre na dieta 0,2%, 0,9% e 1,2% respectivamente. Exames clínicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e motricidade ruminal) e laboratoriais (concentração de sulfeto de hidrogênio ruminal, hemogasometria venosa, pH do fluído ruminal, concentração de cobre sérico e hepático, tomografia computadorizada, necropsia e histopatológico) foram realizados. A temperatura retal, hemogasometria venosa e pH do fluido ruminal estavam dentro dos valores de referência para a espécie. Taquicardia e taquipnéia foram observadas nos três grupos. A motricidade ruminal estava diminuída nos grupos G2 e G3 em relação ao G1. Quanto maior a ingestão de enxofre, menor foram os níveis de cobre sérico e hepático detectados nos ovinos. Elevados valores de sulfeto de hidrogênio foram detectados nos grupos G2 e G3. Nenhum animal apresentou sinais clínicos de PEM. Na tomografia computadorizada, necropsia e exame histopatológico do sistema nervoso central, nenhuma alteração compatível com PEM foi observada. É provável que algum outro fator pode estar associado ao excesso de enxofre na dieta para que os ovinos desenvolvam PEM.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: necrose cerebrocortical; enxofre; sulfeto de hidrogênio ruminal; modelo experimental

Introdução

O enxofre é um macro elemento que tem grande importância na nutrição de ruminantes, componente dos aminoácidos metionina e cisteína, de proteínas e de uma série de outros compostos orgânicos (Burgess 2008). É essencial que a dieta de ovinos contenha entre 0,14 e 0,26% de enxofre na matéria seca (NRC 2005). Em contrapartida, a ingestão excessiva desse mineral pode diminuir o ganho de peso dos animais, causar problemas respiratórios, entéricos e polioencefalomalacia (PEM) (Alves de Oliveira et al. 1996, Bulgin et al. 1996, Kung Jr 2008).

A PEM é uma doença neurológica que acomete ruminantes (Jensen et al. 1956), caracterizada por necrose cerebrocortical e posteriormente malacia (Gould 1998). Diversos fatores estão associados a ocorrência da PEM (Cunha et al. 2010). Em ovinos a doença pode ser causada por deficiência ou distúrbios no metabolismo da tiamina (Jensen et al. 1956, Sant'Ana et al. 2009a) pela intoxicação por sal associada à privação de água (Scarratt et al. 1985), pelo consumo excessivo de enxofre na dieta (Gooneratne et al. 1989) e pela inoculação experimental do herpesvírus bovino 5 (Silva et al. 1998).

A literatura internacional aponta o consumo excessivo de enxofre como uma importante causa de PEM em bovinos e ovinos (Gould 2000). A doença em ovinos tem ocorrido em forma de surtos (Jeffrey et al. 1994, Low et al. 1996, Bulgin et al. 1996) e também tem sido induzida experimentalmente (Gooneratne et al. 1989, Rousseaux et al. 1991, McAllister et al. 1992, Alves de Oliveira et al. 1996, Krasicka et al. 1999). Em bovinos no Brasil, a PEM ocasionada pelo consumo excessivo de enxofre foi relatada no Rio Grande do Sul como forma de surto (Traverso et al. 2001, Cunha et al. 2010) e foi induzida experimentalmente no estado de São Paulo (Cunha et al. 2011). Em ovinos existe apenas um surto de PEM relatado, em que os autores estimaram que os animais estivessem consumindo excesso de enxofre na dieta, porém testes

laboratoriais para confirmar esta hipótese não foram realizados (Lima et al. 2005).

A PEM associada à toxicose por enxofre em ovinos, pode se manifestar de duas formas clínicas (Lemos & Riet-Correa 2007) uma aguda caracterizada por amaurose, agressividade, decúbito, convulsões e frequentemente morte e a outra, subaguda, caracterizada por inapetência, apatia, depressão, cegueira parcial, pressão de cabeça contra obstáculos, andar em círculos, opistótono, ranger de dentes, tremores e espasmos musculares, incoordenação e ataxia (Gooneratne et al. 1989, Rousseaux et al. 1991, McAllister et al. 1992, Jeffrey et al. 1994, Alves de Oliveira et al 1996, Low et al. 1996, Bulgin et al. 1996, Krasicka et al. 1999). Os animais acometidos podem apresentar um ou vários sinais clínicos concomitantemente.

Determinar a causa da PEM em ruminantes é uma tarefa desafiadora para os clínicos, e tem estimulado o desenvolvimento de modelos experimentais para melhor compreensão da doença (Sant'Ana et al. 2009, Cunha et al. 2011). A PEM induzida por enxofre em ovinos pode estar sendo subestimada no Brasil, pelo desconhecimento de ferramentas que possam auxiliar no diagnóstico durante a ocorrência de surtos.

Em bovinos a técnica de determinação da concentração do sulfeto de hidrogênio ruminal (H_2S) utilizando tubos colorimétricos tem sido empregada com sucesso para identificar rebanhos que estejam ingerindo alto teor de enxofre na dieta (Gould et al. 1997, Cunha et al. 2010, Cunha et al. 2011). Em ovinos, a técnica foi utilizada somente por Neville et al. (2010) que identificaram altos níveis de H_2S ruminal em ovinos consumindo alto teor de enxofre porém, os animais não desenvolveram PEM.

O presente trabalho teve como objetivo induzir a PEM e realizar avaliações clínicas e laboratoriais em ovinos pelo fornecimento de dieta rica em carboidratos e com diferentes níveis de enxofre.

Material e Métodos

Foram utilizados 18 cordeiros machos, mestiços da raça Santa Inês com aproximadamente quatro meses de idade e peso médio de 27 ± 3 kg. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais com seis animais e foram mantidos em baias com 12m^2 , durante 111 dias de experimento, permanecendo três animais de um mesmo grupo em cada baia. Uma semana antes do início do experimento os animais foram pesados e vermifugados.

O protocolo de indução de PEM foi adaptado de Cunha et al (2011) com algumas modificações. O experimento foi dividido em três fases: na fase 1 (adaptação) os animais receberam feno de Coast-cross (*Cynodon dactylon*) por 14 dias. Na fase seguinte, passaram por um período de sete dias de transição do feno para a ração (fase 2). Na fase 3 consumiram por 90 dias uma dieta constituída por 95% da ração experimental e 5% de feno de Coast-cross. As sobras da ração eram pesadas todos os dias para mensurar a porcentagem de matéria seca ingerida pelos animais.

A ração experimental era composta pelos seguintes ingredientes 30,8% de casca de aveia, 18,5% de farelo de soja, 17% de amido, 17% de dextrose, 4% de óleo de milho, 3% de uréia, 2% de bicarbonato de sódio, 2,5% de fosfato de cálcio, 0,5% de cloreto de potássio, 0,2% de óxido de magnésio e 4,5% de água, com adição das vitaminas, A 2000, D 100 e E 20 (UI/Kg de ração) conforme descrito por Sager et al. (1990).

Cada grupo recebeu diferentes níveis de enxofre na ração experimental. No grupo 1 controle (G1) a ração continha 0,2% de enxofre na matéria seca (MS). Nos grupos 2 (G2) e 3 (G3) adicionou-se a ração sulfato de sódio de modo que as concentrações finais de enxofre ficassem em 0,9% na MS para o grupo 2 e 1,2% na MS para o grupo 3.

Antes do início do experimento foram obtidas amostras de água, feno e ração para determinação do teor de enxofre. Amostras do feno e da ração

foram submetidas à análise bromatológica e mineral em laboratórios comerciais. Também realizou-se dosagem de tiamina na ração experimental.

Durante o experimento os animais foram inspecionados quatro vezes ao dia onde eram avaliadas possíveis alterações no sistema nervoso central (nível de consciência, alteração de comportamento, postura e alterações no padrão de locomoção) no momento em que alguma alteração fosse observada o ovino seria submetido ao exame neurológico conforme descrito por Borges (2004).

Os animais foram examinados e realizou-se colheita de materiais nos seguintes momentos: no primeiro e no décimo quarto dias da fase 1 (M1 e M2), no sétimo dia da fase 2 (M3) e de dez em dez dias na fase 3 (M4 a M12), totalizando 12 momentos. Em cada momento os ovinos foram submetidos ao exame físico e à colheita de sangue total para obtenção de soro, colheita de sangue venoso para realização de hemogasometria, colheita de líquido ruminal para aferição do pH e também foi dosado a concentração de H_2S ruminal.

Nos momentos M1, M3, M5, M7, M9, M11 e M12 os animais foram pesados. E nos momentos M1 e M3 realizou-se exame de OPG.

Para obtenção de soro, amostras sanguíneas foram colhidas em tubos sem anticoagulante. Após a observação da retração do coágulo, as amostras foram imediatamente centrifugadas e os soros resultantes foram armazenados em tubo plástico e congelados (- 20°C) até a realização da dosagem de cobre.

Para determinação da concentração de H_2S ruminal foi realizada ruminocentese utilizando a técnica descrita por Cunha et al. (2011). Inicialmente foi realizada tricotomia da fossa paralombar esquerda e antissepsia com iodopovidona (PVPI). A punção ruminal foi realizada no ponto médio da porção mais dorsal da fossa paralombar esquerda utilizando-se a agulha do cateter intravenoso 14G. Em seguida, foi encaixado ao conector da agulha, um equipo intravenoso com 15 cm de comprimento. A ponta cortada do equipo adaptado foi acoplada ao tubo colorimétrico de dosagem de gás sulfídrico, previamente inserido na bomba manual de vácuo (modelo AP-20S, Sensidyne®). As mensurações foram realizadas de acordo com o manual do fabricante da bomba de vácuo, padronizando em 100 mL de gás para valores

entre 25 a 1.000 ppm (modelo 120 SF, Sensidyne®) e para valores de 1.000 a 40.000 ppm (modelo 120 SH, Sensidyne®) de H₂S com tempo de amostragem de 1,5 minutos.

As amostras sanguíneas para realização do exame hemogasométrico foram colhidas por venopunção da jugular externa, utilizando uma seringa de 1mL heparinizada, acoplada a uma agulha 30x8. O exame foi realizado com o aparelho portátil i-STAT 1® no qual era inserido o cartucho de leitura i-STAT EG7+®, responsável por fornecer os resultados de pH sanguíneo, pressão de CO₂ sanguíneo (PCO₂), pressão de O₂ sanguíneo (PO₂), excesso de bases (BE), bicarbonato (HCO₃⁻), total de CO₂ sanguíneo (tCO₂), saturação do oxigênio (sO₂), sódio (Na⁺), potássio (K⁺), cálcio Ionizado (iCa²⁺), hematócrito (Hct) e hemoglobina (Hb).

As amostras de líquido ruminal para aferição do pH foram colhidas quatro horas após o fornecimento da ração, utilizando-se uma bomba de sucção a vácuo, acoplada a um recipiente de vidro e a uma sonda oroesofágica de siliconizada de 12 mm (Dirksen et al., 1993). Para evitar contaminação com a saliva os primeiros 40 mL eram desprezados e mais 40 ml eram colhidos para realização imediata da análise (pH 100- PhTek®).

No nonagésimo dia da fase 3 (M12), quatro animais de cada grupo foram induzidos à anestesia geral com cetamina (5 mg/kg I.V), para posterior intubação e manutenção do plano anestésico com isoflurano em circuito com reinalação, usando 100% de oxigênio (Riebold 2007). Anestesiados os ovinos foram submetidos ao exame de tomografia computadorizada contrastada do encéfalo no Centro de Diagnóstico por Imagem da FMVZ – Unesp – Botucatu. Foi utilizado o aparelho, Shimadsu®, modelo SCT 7800 TC.

Após o exame de tomografia computadorizada todos os animais foram sacrificados utilizando-se xilazina (0,10 mg/Kg I.V.), tiopental sódico (8 mg/Kg I.V.) e por último cloreto de potássio. Posteriormente realizou-se necropsia onde foram registradas as alterações anatomopatológicas observadas.

Para o do exame histopatológico foram colhidas as seguintes porções do sistema nervoso central (SNC): córtex frontal direito e esquerdo, córtex parietal

direito e esquerdo, córtex temporal direito e esquerdo, córtex occipital direito e esquerdo, núcleos da base direito e esquerdo, diencéfalo, mesencéfalo, leminisco lateral, ponte, bulbo, cerebelo e medula espinhal. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10%, emblocadas em parafina e posteriormente cortadas para confecção das lâminas histológicas que foram coradas com Hematoxilina e Eosina para a realização do exame histopatológico, utilizando-se a classificação sugerida por Sant'ana et al. (2009) e Cunha et al. (2011). Foram avaliadas a presença de necrose neuronal, gliose, edema, tumefação endotelial, congestão, hemorragia, neuronofagia, manguitos perivasculares, malacia e infiltrados inflamatórios. Todas as lâminas sem identificação foram lidas sem identificação por três patologistas com experiência em neuropatologia.

Também foi colhido um fragmento de fígado de cada animal para dosagem de cobre na matéria seca. A dosagem dos níveis de cobre sérico e hepático foram realizados no Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) do Instituto de Biociências da Unesp – Botucatu, utilizando-se a espectrometria por absorção atômica no aparelho GBC – Scientific Equipment Pty Ltda, modelo 932 AA.

Os procedimentos realizados foram previamente aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ/UNESP/Botucatu (Protocolo nº127/2009-CEUA).

Análise estatística

Os resultados obtidos em cada momento geraram médias aritméticas e desvios padrão que foram submetidos à análise estatística no programa GraphPad InStat versão 3.0 para Windows (GraphPad Software). Os resultados da frequência cardíaca, frequência respiratória e pH ruminal foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Os resultados dos movimentos ruminais e da dosagem de sulfeto de hidrogênio ruminal foram avaliados pelo teste Wilcoxon para comparações feitas dentro de

um mesmo grupo e o teste de Mann Whitney para comparações entre os grupos. Os valores de H₂S ruminal inferiores a 25 ppm foram considerados como 24 para realização da análise estatística. Os valores de cobre sérico nos dois momentos aferidos foram comparados dentro do mesmo grupo pelo teste t de Student pareado. Os valores do cobre sérico no mesmo momento entre os grupos e os valores do cobre hepático foram comparados pelo teste t de Student não pareado. A diferença estatística foi considerada para $p \leq 0,05$ (Sampaio 2010).

Resultados

Os elementos fornecidos na dieta continham os seguintes níveis de enxofre: água 8 mg/L, feno 0,26% da MS e ração 0,2% da MS.

As análises bromatológicas revelaram os seguintes resultados: feno de Coast-cross (*Cynodon dactylon*) com, 89,3% de matéria seca, 10,3% de proteína bruta, 6,2% de minerais, 81,8% de fibra detergente neutra, 40,3% de fibra detergente ácida, 4,6% de lignina e 33,5% de celulose; ração experimental 89,7% de matéria seca, 16,9% de proteína bruta, 5,0% de extrato etéreo, 12,6% de minerais, 20,7% de fibra detergente neutra, 10,4% de fibra detergente ácida, 5,1% de lignina e 7,7% de celulose.

O teor de minerais encontrados no feno foram, 13 g/kg de nitrogênio, 1 g/kg de fósforo, 5 g/kg de potássio, 3 g/kg de cálcio, 1,9 g/kg de magnésio, 9 g/kg de boro, 6 mg/kg de cobre, 189 mg/kg de ferro, 383 mg/kg de manganês e 35 mg/kg de zinco. Na ração encontrou-se 5,3 g/kg de fósforo, 5,9 g/kg de cálcio, 3 g/kg de magnésio, 7,5 g/kg de boro, 15 mg/kg de cobre, 480 mg/kg de ferro, 116,5 mg/kg de manganês, 146 mg/kg de zinco e 5,75 mg/kg de molibdênio. Não foi detectada tiamina na ração.

A quantidade de ração consumida pelos ovinos nos três grupos variou entre 3 e 3,6% do peso vivo durante todo o período experimental. O ganho de

peso médio diário durante as três fases do experimento em gramas por dia foram: G1 46g, G2 40g e G3 33g.

No grupo controle um animal morreu no sexagésimo segundo dia da fase 3 após desenvolver urolitíase. No exame físico entre o M4 e M12 quatro animais do grupo G1 e todos os animais do grupo G2 e G3 apresentaram em algum momento, durante a auscultação pulmonar focos de crepitação grossa. Durante do exame físico a partir do M3 era possível sentir nos grupos G2 e G3 o odor de H_2S exalado pelos animais. Os ovinos dos grupos que receberam alto teor de enxofre na dieta apresentaram a partir do M3 episódios recorrentes de diarreia, sendo que nos animais do G3 esses episódios foram mais frequentes. Os animais com broncopneumonia e diarreia não foram tratados. Nenhum animal apresentou sinais clínicos de PEM durante o experimento.

As médias e desvios-padrão nos diferentes momentos aferidos para frequência cardíaca e frequência respiratória estão apresentadas no quadro 1. A média e desvio padrão em cada fase da frequência cardíaca em batimentos por minuto (FC bpm) para cada grupo foram: fase 1, G1 85 ± 16 , G2 89 ± 18 e G3 80 ± 16 ; fase 2, G1 87 ± 20 , G2 93 ± 13 e G3 89 ± 26 e fase 3, G1 115 ± 19 , G2 111 ± 15 e G3 101 ± 18 , não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

A média e desvio padrão em cada fase da frequência respiratória em movimentos por minuto (FR mpm) foram: fase 1, G1 25 ± 6 , G2 26 ± 12 e G3 25 ± 5 ; fase 2, G1 41 ± 19 , G2 44 ± 17 e G3 42 ± 21 ; fase 3, G1 40 ± 23 , G2 46 ± 28 e G3 40 ± 24 . Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Os valores médios da temperatura retal aferidos em cada momento estão expressos no quadro 2, não houve diferença estatística entre os grupos. O número de movimentos ruminais aferidos durante cinco minutos estão descritos no quadro 2. Na fase 3 o número de movimentos ruminais nos animais dos grupos G2 e G3 foram estatisticamente inferiores aos dos animais do grupo G1 ($p > 0,05$).

Nenhum animal apresentou quadro clínico de acidose metabólica. O pH sanguíneo nas fases 2 e 3 teve aumento significativo em relação a fase 1 nos três grupos ($p < 0,05$) (Fig. 1). Quando se comparou o pH sanguíneo, PCO_2 ,

PO₂, BE, HCO₃⁻, tCO₂, sO₂, Na⁺, K⁺, iCa²⁺, Hct e Hb entre os grupos, em um mesmo momento, não houve diferença estatística ($p>0,05$).

As médias e desvios padrão do pH ruminal aferidos em cada fase foram as seguintes: fase 1, G1 $7,19 \pm 0,30$, G2 $7,06 \pm 0,40$ e G3 $7,11 \pm 0,14$; fase 2, G1 $6,61 \pm 0,14$, G2 $6,63 \pm 0,21$ e G3 $6,81 \pm 0,44$; fase 3 G1 $6,43 \pm 0,27$, G2 $6,20 \pm 0,27$ e G3 $6,17 \pm 0,26$. Não houve diferença estatística nos valores do pH ruminal entre os grupos, durante as fases experimentais ($p>0,05$).

Os valores de H₂S ruminal no grupo controle não mostraram diferença estatística, quando comparados entre as fases 1, 2 e 3. Nos ovinos dos grupos G2 e G3 observou-se diferença significativa ($p<0,05$) entre as fases 1 e 2 e fase 1 e 3 (Quadro 3).

Quando a comparação foi feita entre os grupos G1 e G2 e G1 e G3, houve diferença significativa na fase 2 e na fase 3 ($p\leq 0,05$). Já na comparação feita entre os grupos G2 e G3 não houve diferença estatística ($p>0,05$) (Quadro 3). Os valores de H₂S aferidos na fase 2 e fase 3 foram cerca de 50 vezes maiores nos grupo G2 e G3, em relação às mesmas fases do grupo controle (Fig. 2).

No exame de tomografia computadorizada contrastada, nenhuma alteração foi observada no encéfalo dos animais.

Os resultados da dosagem de cobre sérico e hepático estão apresentados no quadro 4. Apesar de não haver diferença estatística, quando a comparação entre o M1 e M12 foi realizada, dentro de cada grupo, ocorreu uma queda nos níveis séricos de cobre no M12 (G1: 11,47%, G2: 21,90% e G3: 36,88%). No fígado a dosagem de cobre foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) entre o G1 e G2, G1 e G3 e G2 e G3.

Na necropsia não foram observadas lesões macroscópicas no encéfalo, sugestivas de PEM. Pneumonia foi encontrada em quatro animais do grupo G1 e em todos os animais dos grupos G2 e G3. Nos grupos G2 e G3 era maior a gravidade e a intensidade das lesões. Em cinco animais do G2 e em cinco animais do G3 já haviam áreas de hepatização pulmonar. Enterite foi observada em quatro animais do G2 e em quatro animais do G3. No exame

histopatológico das 17 regiões do encéfalo, colhidas de cada animal, não foram observadas lesões compatíveis com PEM.

Discussão

Os resultados das análises bromatológica e mineral da ração fornecida aos ovinos foram semelhantes aos obtidos por Sager et al. (1990) e Cunha et al. (2011) que utilizaram ração com os mesmos ingredientes e conseguiram induzir PEM em bovinos pelo consumo excessivo de enxofre.

A quantidade de ração consumida pelos ovinos nos três grupos variou entre 3 e 3,6% do peso vivo de MS durante todo o período experimental, quantidade adequada para ovinos entre quatro e sete meses de idade (NRC 2007). Porém o ganho de peso dos animais não foi satisfatório em nenhum grupo, quanto maior a ingestão de enxofre, menor foi o ganho de peso médio diário, estando de acordo com os achados de Alves de Oliveira et al. (1996), que forneceram dieta a base de feno e concentrado a dois grupos de ovinos, um ingerindo alto teor de enxofre na dieta 0,63% e o outro ingerindo 0,2% de enxofre na MS. Em nenhum dos grupos o ganho de peso foi satisfatório, no grupo ingerindo 0,63% de enxofre registrou-se menor ganho. Kung Jr (2008) também observou que o excesso de enxofre na dieta pode diminuir o ganho de peso dos animais.

O confinamento pode predispor os ovinos a apresentarem doenças respiratórias (Martin, 1996). O aumento da frequência respiratória e lesões no tecido pulmonar são comuns em ruminantes ingerindo alto teor de enxofre (Krasicka et al. 1999, Bulgin et al. 1990, Rousseaux et al. 1991, Cunha et al. 2011). Taquipnéia foi observada nos três grupos a partir do M3, este achado foi devido à broncopneumonia apresentada por quatro animais do G1 e por todos os animais dos grupos G2 e G3 durante as fases 2 e 3 e também, a ração fornecida era farelada, o que pode causar irritação as vias aéreas. A maior gravidade nas lesões pulmonares encontradas durante a necropsia nos animais dos grupos G2 e G3 é explicada pelo fato de que até 60% do H₂S

eructado possa ser inalado (Bulgin et al. 1996) e a inalação deste gás pode lesionar o tecido pulmonar (Kung Jr 2008).

O alto teor de enxofre na dieta também pode provocar distúrbios digestórios (Bulgin et al. 1996) como a diarreia observada nos animais dos grupos G2 e G3. A maior frequência dos episódios de diarreia observados nos ovinos do G3 pode ser explicada pela ação laxativa do sulfato de sódio (Ramos et al. 1988). A quantidade de sulfato de sódio ingerida pelos animais do G3 era maior do que a ingerida pelos animais do G2. A enterite observada em animais dos grupos G2 e G3 também já foi descrita em ovinos (White 1964) e bovinos (Gunn et al. 1987) ingerindo dieta com alto teor de enxofre.

Uma das preocupações no desenvolvimento de um modelo experimental para indução de PEM por enxofre, com dieta rica em carboidratos e pobre em fibras, é a acidose metabólica, apontada como um dos fatores responsáveis por desencadear a PEM por deficiência de tiamina em ruminantes (Lemos & Riet-Correa, 2007). No presente estudo esta situação foi monitorada pela hemogasometria venosa e pela aferição do pH ruminal. Nos 12 momentos aferidos, tanto o pH sanguíneo quanto o pH ruminal mantiveram-se dentro dos valores de referência considerados normais para a espécie (Radostits et al. 2007) e inclusive, o pH sanguíneo aumentou significativamente nas fases 2 e 3, em relação à fase 1 nos três grupos. Neste trabalho além da substituição gradativa do feno pela ração (fase 2), havia de 2% bicarbonato de sódio na dieta, o que segundo Damir et al. (1990) aumenta o pH sanguíneo, além de ajudar a prevenir a acidose láctica ruminal, e consequentemente a acidose metabólica.

Quando se comparou o pH sanguíneo, PCO_2 , PO_2 , BE, HCO_3^- , tCO_2 , sO_2 , Na^+ , K^+ , iCa^{2+} entre os grupos em um mesmo momento não houve diferença estatística, demonstrando que o alto teor de enxofre na dieta não interferiu nestas variáveis.

Em bovinos o odor, de H_2S exalado pelos animais, foi associado com o início dos sinais clínicos de PEM (Sager et al. 1990, Gould et al. 1997). No presente estudo, apesar de nenhum animal ter desenvolvido sinais clínicos

durante o exame físico a partir do M3 até o M12 era possível sentir odor de H_2S exalado pelos animais dos grupos G2 e G3.

O elevado teor de H_2S detectado nos animais dos grupos G2 e G3 a partir da fase 2 demonstrou que a técnica também é eficiente na espécie ovina para identificar rebanhos que estejam consumindo alto teor de enxofre na dieta. Porém, apesar dos níveis de H_2S detectados estarem elevados, nenhum animal desenvolveu quadro clínico de PEM, corroborando com Neville et al. (2010). A técnica de dosagem de H_2S ruminal foi desenvolvida por Gould et al. (1997) e outros autores comprovaram a eficácia do teste para identificar rebanhos de bovinos ingerindo grande quantidade de enxofre na dieta (Loneragan et al. 1998, Cunha et al. 2010, Cunha et al. 2011). Segundo Burgess (2008), valores de H_2S ruminal acima de 500 ppm são tóxicos para bovinos; para ovinos este valor ainda não foi estabelecido. Em bovinos, após o aumento do H_2S ruminal os animais desenvolveram PEM (Gould et al. 1997), portanto é possível que bovinos e ovinos tenham tolerâncias diferentes a os níveis de H_2S no rúmen.

Um problema observado durante o experimento, na técnica de dosagem de H_2S ruminal foi que devido à repetitivas punções, alguns animais desenvolveram pequenos abscessos no local puncionado. Porém para o monitoramento de rebanhos afim verificar se esta ocorrendo à ingestão excessiva de enxofre o procedimento será realizado apenas uma vez. Cunha et al. (2011) realizaram mensurações seriadas em bovinos (de 4 em 4 dias, totalizando 8 punções) e não observaram nenhum efeito adverso no local da punção. A dosagem em ovinos, assim como descrita em bovinos (Loneragan et al. 1998), foi simples e rápida de ser realizada.

A alta concentração de H_2S no rúmen pode diminuir a motricidade ruminal (Kandylis 1984), o que explica o número de movimentos ruminais nos animais dos grupos G2 e G3 estarem diminuídos em relação ao grupo G1.

O enxofre é um importante antagonista do cobre (Humphries et al. 1983) e isto pode ser evidenciado pelas dosagens de cobre realizadas no soro dos animais no M1 e M12 e no fígado no M12 (quadro 4). Quanto mais enxofre na dieta menor foram os níveis de cobre detectados nos grupos, sendo que no

grupo 3 no M12, tanto os níveis de cobre sérico quanto hepático estavam abaixo do valor mínimo considerado normal para a espécie ovina, que é de 0,7 µg/ml no soro e 88 ppm no fígado (Pugh 2004). A razão pela qual os níveis de cobre sérico não serem significativamente menores no M12 em relação ao M1 pode ser explicada pelo fato do fígado ter capacidade de armazenar cobre, portanto primeiramente os níveis hepáticos de cobre diminuem, para depois essa queda ser refletida do soro (Blakley & Hamilton 1985).

Os minerais como o cobre, zinco, ferro e molibdênio podem interferir na toxicose por enxofre (Gould 1998). O molibdênio, o cobre e o enxofre podem se ligar formando o cobre tiomolibdato que é insolúvel e não utilizável (Vásquez et al. 2001), assim como o cobre o zinco e o ferro também formam sais insolúveis com o sulfito (Suttle 1991). Portanto, animais que estejam ingerindo dietas com alto teor de enxofre necessitam que seja fornecida uma quantidade maior dos outros minerais (Gould 1998). Animais que estejam ingerindo dietas com baixos níveis de cobre também ficam mais susceptíveis a desenvolver PEM por excesso de enxofre (Low et al. 1996). Na ração fornecida, os níveis de cobre, molibdênio, ferro e zinco estavam dentro dos níveis recomendados para ovinos (NRC 2005) e somente os níveis de enxofre diferia entre as rações, o que deixa claro que o enxofre foi o responsável pela queda nos níveis de cobre sérico e hepático.

O intuito de realizar o exame de tomografia computadorizada nos ovinos foi verificar, se durante a apresentação dos sinais clínicos de PEM, era possível identificar através da imagem o local da lesão no encéfalo e correlacionar o achado com os sinais clínicos apresentados pelo animal. Porém nenhum ovino desenvolveu sinais clínicos da doença, consequentemente, nenhuma lesão foi observada nos animais submetidos ao exame.

O exame de tomografia computadorizada pode auxiliar no diagnóstico de doenças neurológicas; a técnica já foi empregada com sucesso no diagnóstico cenurose em ovinos (Gonzalo Orden et al. 1999). Por outro lado, o exame de ressonância magnética tem maior capacidade de identificar diferentes estruturas no cérebro, além da facilidade em demonstrar mínimas alterações na maioria das doenças. Alterações morfológicas são mais facilmente

avaliadas do que na tomografia computadorizada (Amaro Júnior & Yamashita 2001), inclusive o exame tem auxiliado no diagnóstico de PEM em bezerros (Tsuka et al. 2008), mas infelizmente este exame ainda não está disponível na instituição onde a presente pesquisa foi realizada.

Os animais dos grupos G2 e G3 do presente estudo consumiram elevado teor de enxofre na dieta, 0,9 e 1,2% da MS, respectivamente e produziram grande quantidade de H_2S no rúmen, porém não apresentaram sinais clínicos de PEM. Resultados semelhantes foram obtidos por Neville et al. (2010) que em um primeiro estudo utilizaram 240 ovinos divididos em quatro grupos com 60 animais. Esses ovinos receberam dieta à base de restos de grãos de destilaria ricos em enxofre (0,73%). O grupo 1 serviu como controle e os outros grupos foram suplementados com tiamina (grupo 2, 50 mg/animal/dia; grupo 3, 100 mg/animal/dia; e grupo 4, 150 mg/animal/dia); esta dieta foi fornecida por 110 dias até os animais atingirem o peso para abate. Nenhum animal do experimento apresentou sinais clínicos de PEM. Em um segundo estudo utilizaram 55 animais divididos em cinco grupos, quatro grupos receberam tratamentos iguais ao do primeiro estudo e o grupo 5 recebeu dieta com 0,87% de enxofre e foram suplementados com 150 mg/animal/dia de tiamina. O segundo estudo durou 112 dias e nenhum animal desenvolveu PEM. Neste segundo trabalho realizou-se exame histopatológico do encéfalo dos animais e nenhuma alteração de PEM foi observada, apesar dos autores terem detectado elevado teor de H_2S ruminal. Edwin et al. (1968) também não conseguiram induzir PEM em um ovino ingerindo 9 gramas por dia de sulfato de sódio durante um ano. Resultados que corroboram os obtidos no presente experimento.

Em contrapartida, outros autores conseguiram induzir PEM em ovinos, fornecendo dieta rica em carboidratos e com níveis de enxofre inferiores aos utilizados na presente pesquisa. Gooneratne et al. (1989) induziram PEM em três ovinos que consumiram dieta à base de cevada, farelo de soja e alfafa com 0,63% de enxofre na MS; o experimento durou 12 semanas e na segunda e terceira semanas os animais apresentaram sinais clínicos de PEM. Rousseaux et al. (1991) induziram PEM em sete de 22 ovinos que consumiram ração contendo 64% de concentrado e 36% de volumoso, com 0,63% de enxofre na

MS durante 14 semanas, os animais apresentaram sinais clínicos entre a terceira e a sétima semana. Alves de Oliveira et al. (1996) forneceram uma dieta com 67% de concentrado e 33% de volumoso, com 0,6% de enxofre na MS durante 12 semanas a quatro ovinos e um animal apresentou sinais clínicos de PEM na sétima semana. Krasicka et al. (1999) forneceram a cinco ovinos uma dieta com 79% de concentrado e 21% de volumoso, com 0,8% de enxofre na MS durante 12 semanas e todos os animais apresentaram sinais clínicos de PEM na última semana de experimento.

Alguns autores não informaram a fonte de enxofre utilizada para induzir PEM (Gooneratne et al. 1989). Outros citam apenas que utilizaram sulfato inorgânico (Rousseaux et al. 1991). Alves de Oliveira et al. (1996) utilizaram sulfato de amônio (4%) associado a sulfato de sódio (0,2%) e Krasicka et al. (1999) utilizaram sulfato de sódio (0,8%). Em um trabalho realizado por MacAllister et al. (1992) com ovinos, a PEM foi induzida em poucas horas através do fornecimento via sonda esofágica de hidrossulfeto de sódio, porém este modelo experimental não é recomendado devido a alta toxicidade do hidrossulfeto de sódio, também para humanos. Em bovinos, o sulfato de sódio tem sido utilizado por vários autores para indução de PEM (Gould et al. 1997, Cunha et al. 2011). Portanto, utilizamos sulfato de sódio como fonte de enxofre, baseados nos bons resultados obtidos em pesquisas anteriores.

Nos surtos de PEM induzida por enxofre em ovinos, a morbidade variou entre 12 e 91% (Jefrey et al. 1989, Low et al. 1996, Bulgin et al. 1996, Lima et al. 2005). Já nos trabalhos experimentais, a morbidade variou entre 0 e 100% (Gooneratne et al. 1989, Rousseaux et al. 1991, McAllister et al. 1992, Alves de Oliveira et al. 1996, Krasicka et al. 1999, Neville et al. 2010). Isto demonstra uma susceptibilidade individual dos animais em resposta a altos níveis de enxofre na dieta. Além disso, a exigência de enxofre é maior em ovinos do que em bovinos (NRC 2005), portanto, os ovinos podem ser mais resistentes que os bovinos quando alimentados com alto teor de enxofre.

Vale ressaltar que o teste realizado na ração não detectou tiamina, o que foi importante, pois segundo Gooneratne et al. (1989), Rousseaux et al. (1991) e Olkowski et al. 1992) suplementar com tiamina, ovinos que estejam ingerindo

alto teor de enxofre na dieta, pode evitar que os animais apresentem sinais clínicos de PEM.

Na PEM nem sempre os danos estruturais no cérebro se manifestam como um efeito funcional; os animais podem estar acometidos e não apresentarem sinais clínicos (Gooneratne et al. 1989, Rousseaux et al. 1991, Olkowski et al. 1992). Portanto, somente após o exame histopatológico do encéfalo de todos os animais não revelar nenhuma alteração, foi possível afirmar que a dieta com alto teor de enxofre, fornecida nas condições descritas neste experimento, não foi capaz de induzir PEM nos ovinos. Resultados que corroboram os obtidos por Neville et al. (2010).

Conclusões

O protocolo utilizando dieta rica em carboidratos e com alto teor de enxofre não induz PEM, apesar do alto teor de H_2S ruminal detectado. Recomendamos a utilização da técnica de dosagem de H_2S ruminal também na espécie ovina para identificar rebanhos ingerindo alto teor de enxofre na dieta. Comparando os resultados obtidos com aqueles presentes na literatura, sugerimos que é possível que algum outro fator ainda não identificado precisa estar associado ao consumo excessivo de enxofre para indução de PEM em ovinos.

Agradecimentos

Este estudo teve suporte financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, em forma de bolsa de estudo e auxílio regular à pesquisa (processos N° 2009/12500-2 e 2010/01684-2) respectivamente.

Referências

- Alves de Oliveira L., Blain C.J., Corso V.B., Durix A. & Komisarczuk Bony S. 1996. Effect of a high sulfur diet on rumen microbial activity and rumen thiamine status in sheep receiving a semi-synthetic, thiamine-free diet. *Reproduction Nutrition Development*. 36: 31-42.
- Amaro Júnior E. & Yamashita H. 2001. Aspectos básicos de tomografia computadorizada e ressonância magnética. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 23: 1-2.
- Blakley B.R. & Hamilton D.L. 1985. Ceruloplasmin as an indicator of copper status in cattle and sheep. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 49:405-408.
- Borges, A.S. 2004. Semiologia do sistema nervoso de grandes animais. In: Feitosa, F.L.F. *Semiologia Veterinária a Arte do Diagnóstico*, São Paulo, Roca, 506-526.
- Bulgin M.S., Stuart S.D. & Mather G. 1996. Elemental sulfur toxicosis in a flock of sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 208:1063-1065.
- Burgess B.A. 2008. Polioencefalomalacia. *Large Animal Veterinary*. 8: 1-6.
- Cunha P.H.J., Badial P.R., Cagnini D.Q., Oliveira-Filho J.P., Moares L.F., Takahira R.K. & Amorim R.L., Borges A.S. 2011. Polioencefalomalacia experimental em bovinos induzida por toxicose por enxofre. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31(1):41-52.
- Cunha P.H.J., Bandarra P.M., Dias M.M., Borges A.S. & Driemeier D. 2010. Surto de polioencefalomalacia por ingestão excessiva de enxofre na dieta em bezerros no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(8):613-617.
- Damir HA., Scott D., Thomson JK., Topps J.H., Buchan W. & Pennie K. 1990. The effect of a change in blood acid-base on body composition and mineral retention in growing lambs. *Animal Production*. 51: 527-534.
- Dirksen G., Gründer H.D. & Stober M. 1993. *Exame Clínico dos Bovinos*. 3ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.373-381.

- Edwin E.E., Lewis G. & Allcroft R. 1968. Cerebrocortical necrosis: A hypothesis for the possible role of thiaminases in its pathogenesis. *The Veterinary Records*. 83:175-176.
- Feitosa F.L.F. 2004. *Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico*. Roca, São Paulo, 807p.
- Gonzalo-Orden J.M., Díez A., Altonága J.R., Gonzalo J.M. & ORDEN M.A. 1999. Computed tomographic findings in ovine coenurosis. *Veterinary Radiology Ultrasound*. 40(5):441-444.
- Gooneratne S.R., Olkowski A.A. & Christensen D.A. 1989. Sulfur-induced polioencephalomalacia in sheep: Some biochemical Changes. *Canadian Journal Veterinary Research*. 53:462-467.
- Gould D.H. Update on sulphur-related polioencephalomalacia. 2000. *Veterinary Clinics of the North America: Food Animal Practice*. 16(3): 481-496.
- Gould D.H., Cummings B.A. & Hamar D.W. 1997. In vivo indicators of pathologic ruminal sulfide production in steers with diet-induced polioencephalomalacia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 9: 72-76.
- Gould D.H. 1998. Polioencephalomalacia. *Journal of Animal Science*. 76: 309–314.
- Gunn M.F., Baird J.D., Wilkie J.S.N. 1987. Accidental sulfur poisoning in a group of Holstein heifers. *Canadian Veterinary Journal*. 28(4):188-192.
- Humphries W.R., Phillippo M., Young B.W. & Bremner I. 1983. The influence of dietary iron and molybdenum on copper metabolism in calves. *British Journal Nutrition*. 49:77-86.
- Jeffrey M., Duff J.P., Higgins R.J., Simpson V.R., Jackman R., Jones T.O., Mechie S.C. & Livesey C.T. 1994. Polioencephalomalacia associated with the ingestion of ammonium sulphate by sheep and cattle. *Veterinary Record*. 134(14): 343-348.
- Jensen R., Griner L.A. & Adams O.R. 1956. Polioencephalomalacia of cattle and sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 129: 311-321.

- Kandylis K. 1984. Toxicology of sulfur in ruminants: review. *Journal Dairy Science*. 67:2179-2187.
- Krasincka B., Gralak M.A., Sieranska B. & Kulasek G. 1999. The influence of dietary sulphur loading on metabolism and health in young sheep fed low fibre and high starch diet. *Reproduction Nutrition Development*. 39: 625-636.
- Kung Jr L. Burping can be dangerous if you are a ruminant: Issues with high sulfur diets. IN. 4º - State Dairy Conference, Dubuque, IA. 2008.
- Lemos R.A.A. & Riet-Correa F. 2007. Polioencefalomalacia. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. *Doenças de ruminantes e eqüídeos*. 3ed. Santa Maria: Pallotti. 2: 658-670.
- Lima E.F., Riet-Correa F., Tabosa I.M., Dantas A.F.M. & Medeiros J.M. 2005. Polioencefalomalacia em caprinos e ovinos na região semi-árida do Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 25(1): 9-14.
- Loneragan G.H., Gould D.H., Callan R.J., Sigurdson C.J. & Hamar, D.W. 1998. Association of excess sulfur intake and an increase in hydrogen sulfide concentrations in the ruminal gas cap of recently weaned beef calves with polioencephalomalacia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 213(11): 1599-1604.
- Low J.C., Scott P.R., Howie F., Lewis M., Fitzsimons J. & Spence J.A. 1996. Sulphur-induced polioencephalomalacia in lambs. *The Veterinary Record*. 138: 327-329.
- Martin W.B. 1996. Respiratory infections of sheep. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 19(3): 171-179.
- McAllister M.M., Gould D.H. & Hamar D.W. 1992. Sulphide-induced polioencephalomalacia in lambs. *Journal Comparative Pathology*. 106: 267-278.
- Mayhew I.G. 1989. *Large Animal Neurology: a handbook for veterinarians clinicians*. Lea & Febiger, Philadelphia, 380p
- Neville B.W., Schauer C.S., Karges K., Gibson M.L., Thompson M.M., Kirschten L.A., Dyer N.W., Berg P.T. & Lardy G.P. 2010. Effect of thiamine concentration

- on animal health, feedlot performance, carcass characteristics, and ruminal hydrogen sulfide concentrations in lambs fed diets based on 60% distillers dried grains plus solubles. *Journal of Animal Science*. 88: 2444-2455.
- NRC. 2007. National Research Council. Nutrient requirements of small ruminants. Washington, D.C.: National Academy Press, 2007. 362p.
- NRC. 2005. National Research Council. Mineral Tolerance of animals, 2. ed. Washington, DC: National Academy of Sciences. 385p.
- Olkowski A.A., Gooneratne S.R., Rousseaux C.G. & Christesen D.A. 1992. Role of thiamine status in sulphur induced polioencephalomalacia in sheep. *Research of Veterinary Science*. 52: 78-85.
- Pugh D.G. 2004. Clínica de Ovinos e Caprinos. Roca, São Paulo, 468p.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Veterinary Medicine: A textbook of the disease of cattle, sheep, goats, pigs and horses. 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh. 2065p.
- Raisbeck M.F. 1982. Is polioencephalomalacia associated with high-sulfate diets? *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 180(11): 1303-1305.
- Ramos J.R., Pinho M., Simoes D.L., Baptista A.S. & Souza P.C.T. 1988. Preparo de colon para operações colorretais eletivas pela ingestão de sulfato de sódio. *Revista Brasileira de Colon Proctologia*. 8(2): 56-58.
- Riebold T. W. 2007. Anesthesia, Analgesia, and Immobilization of selected species and classes of animals. In: Lumb & Jones Veterinary Anesthesia and Analgesia. 4ed. Blackwell Publishing: Iowa, EUA, 731-747.
- Rousseaux C.G., Olkowski A.A., Chauvet S.R., Gooneratne S.R. & Christenson D.A. 1991. Ovine polioencephalomalacia associated with dietary sulphur intake. *Journal of the Veterinary Medical Association*. 38: 229-239.
- Sager R.L., Hamar D.W. & Gould D.H. 1990. Clinical and biochemical alterations in calves with nutritionally induced polioencephalomalacia. *American Journal of Veterinary Research*. 51(12): 1969-1974.

- Sampaio I.B.M. 2010. Estatística aplicada à experimentação animal. 3ª ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 264p.
- Sant'ana F.J.F., Nogueira A.P.A., Souza R.I., Cardinal S.G., Lemos R.A.A. & Barros C.S.L. 2009. Polioencefalomalacia experimental induzida por amprólio em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(9): 747-752.
- Scarratt, W.K., Collins, T.J. & Sponenberg, D.P. 1985. Water deprivation sodium chloride intoxication in a group of feeder lambs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 186(9):977-978.
- Silva A.M., Flores E.F., Weiblen R., Botton S.A., Irigoyen L.F., Roehe P.M., Brum M.C.S. & Canto M.C. 1998. Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 18: 99-106.
- Suttle N.F. 1991. The interactions between copper, molybdenum and sulphur in ruminant nutrition. *Annual Veterinary Nutrition*. 11:121-140.
- Traverso S.D., Colodel E.M., Loretto A.P., Seitz A.L., Correa A.M., Krauspenhar C. & Driemeier D. 2001. Polioencefalomalacia em bovinos leiteiros no Rio Grande do Sul suplementados com enxofre. 10º Enapave, Pirassununga, p72. (Resumo)
- Tsuka T., Taura Y., Okamura S., Tamura H., Okamoto Y., Okamura Y & Minami S. 2008. Imaging diagnosis – polioencephalomalacia in a calf. *Veterinary Radiology and Ultrassound*. 49(2): 149-151.
- Vásquez E.F.A., Herrera A.D.N. & Santiago G.S. 2001. Interação cobre, molibdênio e enxofre em ruminantes. *Ciência Rural*. 31(6):1101:1106.
- White J.B. 1964. Sulphur poisoning in ewes. *The Veterinary Record*. 76:278.

Quadros

Quadro 1: Valores médios e desvios-padrão da frequência cardíaca em batimentos por minuto e frequência respiratória em movimentos por minuto dos animais nos 12 diferentes momentos aferidos durante as três fases experimentais.

	Frequência cardíaca			Frequência Respiratória		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Fase 1						
M1	89 ± 19	99 ± 15	82 ± 20	27 ± 8	29 ± 16	26 ± 4
M2	82 ± 14	79 ± 16	78 ± 12	23 ± 5	23 ± 5	25 ± 5
Fase 2						
M3	87 ± 20	93 ± 13	89 ± 26	41 ± 19	44 ± 17	42 ± 21
Fase 3						
M4	117 ± 27	112 ± 9	105 ± 19	37 ± 22	39 ± 11	26 ± 7
M5	126 ± 20	115 ± 13	95 ± 28	48 ± 25	51 ± 24	49 ± 35
M6	119 ± 22	118 ± 19	103 ± 17	41 ± 30	29 ± 07	35 ± 4
M7	119 ± 14	104 ± 15	98 ± 20	43 ± 38	62 ± 35	35 ± 14
M8	115 ± 20	114 ± 16	115 ± 11	46 ± 27	52 ± 35	47 ± 31
M9	103 ± 14	116 ± 8	96 ± 15	42 ± 23	38 ± 16	47 ± 28
M10	110 ± 24	104 ± 22	98 ± 22	34 ± 17	57 ± 49	39 ± 19
M11	109 ± 15	112 ± 21	101 ± 15	30 ± 17	37 ± 15	44 ± 37
M12	114 ± 13	106 ± 7	99 ± 17	33 ± 7	45 ± 37	40 ± 21

Quadro 2: Valores médios e desvios-padrão da temperatura retal em graus Celsius e dos movimentos ruminais em cinco minutos dos animais dos três grupos nos 12 diferentes momentos aferidos durante as três fases experimentais.

	Temperatura Retal			Movimentos Ruminal		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Fase 1						
M1	38,7 ± 0,3	39,5 ± 0,5	38,8 ± 0,8	8 ± 2	7 ± 2	7 ± 3
M2	38,6 ± 0,6	39,1 ± 0,6	39,0 ± 0,7	8 ± 2	8 ± 2	7 ± 3
Fase 2						
M3	38,8 ± 0,8	39,4 ± 0,3	39,2 ± 1,2	10 ± 3	8 ± 4	8 ± 3
Fase 3						
M4	38,8 ± 0,6	39,6 ± 0,5	38,8 ± 1,2	12 ± 2	8 ± 4	9 ± 3
M5	39,5 ± 0,8	39,4 ± 0,4	39,0 ± 0,9	10 ± 2	5 ± 2	8 ± 4
M6	38,8 ± 0,5	39,5 ± 0,5	39,1 ± 0,6	8 ± 4	6 ± 1	7 ± 2
M7	39,1 ± 0,8	39,4 ± 0,4	39,1 ± 0,4	11 ± 3	4 ± 2	6 ± 2
M8	39,6 ± 0,4	39,2 ± 0,4	39,3 ± 0,4	7 ± 2	7 ± 2	7 ± 2
M9	38,8 ± 0,4	39,1 ± 0,2	39,1 ± 0,6	8 ± 3	8 ± 2	8 ± 2
M10	38,9 ± 0,2	39,5 ± 0,8	39,1 ± 0,7	10 ± 4	6 ± 4	8 ± 2
M11	38,3 ± 0,3	39,1 ± 1	39,3 ± 0,7	10 ± 3	8 ± 2	7 ± 3
M12	38,9 ± 0,4	39,2 ± 0,2	39,0 ± 0,5	8 ± 2	7 ± 3	7 ± 5

Quadro 3. Os valores médios e desvios-padrão do sulfeto de hidrogênio ruminal (ppm) avaliados nos ovinos durante as três fases do protocolo de indução de polioencefalomalacia nos grupos G1 sem adição de sulfato de sódio e G2 e G3 com adição de sulfato de sódio.

	G1	G2	G3
Fase 1			
M1	121 ± 107	314 ± 267	216 ± 385
M2	376 ± 434	188 ± 244	233 ± 184
Média	249 ± 329 Aa	251 ± 253 Aa	225 ± 288 Aa
Fase 2			
M3	62 ± 31	3442 ± 2752	2650 ± 2162
Média	62 ± 31 Aa	3442 ± 2752 Bb	2650 ± 2162 Bb
Fase 3			
M4	137 ± 107	2283 ± 884	4150 ± 2155
M5	91 ± 152	2967 ± 1368	3633 ± 1693
M6	61 ± 79	4450 ± 1677	3750 ± 2770
M7	71 ± 76	2633 ± 1606	4367 ± 1571
M8	48 ± 37	4900 ± 219	4400 ± 1490
M9	54 ± 44	4467 ± 2066	4883 ± 1280
M10	24 ± 0	3800 ± 1442	5000 ± 1517
M11	24 ± 0	2267 ± 1491	3533 ± 1986
M12	24 ± 0	2633 ± 1244	3850 ± 1985
Média	64 ± 80 Aa	3378 ± 1638 Bb	4171 ± 1802 Bb

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as fases do período experimental e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($< 0,05$) entre os grupos.

Quadro 4. Os resultados na matéria seca da dosagem de cobre sérico expressos em μml nos momentos M1 e M12 e hepático expressos em ppm no M12.

	G1	G2	G3
Soro M1	$1,19 \pm 0,22$ Aa	$1,23 \pm 0,27$ Aa	$0,99 \pm 0,35$ Aa
Soro M12	$1,06 \pm 0,30$ Aa	$0,96 \pm 0,45$ Aa	$0,62 \pm 0,07$ Ab
Fígado	$197,49 \pm 52,06$ a	$135,18 \pm 26,62$ b	$74,86 \pm 18,42$ c

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos dentro do mesmo grupo e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos em cada momento.

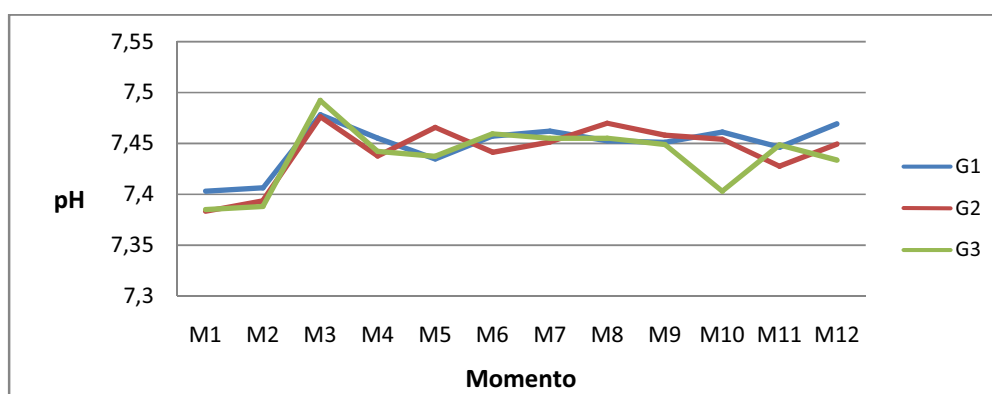
Figuras

Fig 1. Valores de pH sanguíneo dos animais do G1, G2 e G3, em todas os momentos do experimento.

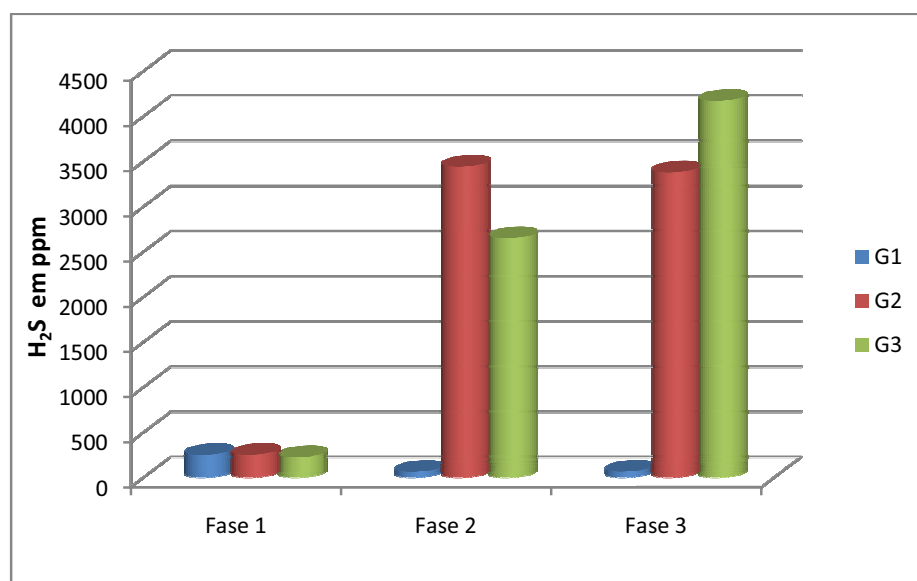


Fig. 2. Médias de H₂S expressas em ppm para os grupos G1, G2 e G3 em cada fase do experimento.

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

Nas condições em que este experimento foi realizado, o fornecimento de dieta rica em carboidratos e com alto teor de enxofre não induziu PEM nos ovinos.

O excesso de enxofre na dieta causa problemas respiratórios e entéricos nos animais.

O alto teor de enxofre na dieta associado à alta produção de H_2S diminui a motricidade ruminal.

A técnica de dosagem de H_2S ruminal utilizando tubos colorimétricos é rápida e simples de ser realizada e identifica animais que estejam ingerindo alto teor de enxofre.

Quanto maior a ingestão de enxofre menor são os níveis séricos e hepáticos de cobre, detectados nos animais.

O alto teor de enxofre na dieta não influencia nos resultados dos exames de hemogasometria venosa e no pH ruminal de ovinos.

Faltam modelos experimentais que permitam maior entendimento da ação do enxofre na patogenia da PEM. Comparando os resultados obtidos com aqueles presentes na literatura, notamos que é possível que algum outro fator ainda não identificado possa estar associado ao consumo excessivo de enxofre para indução de PEM em ovinos.

Referências Capítulo I

REFERÊNCIAS CAPÍTULO I

- ALVES DE OLIVEIRA, L.; BLAIN, C.J.; CORSO, V.B.; DURIX, A.; KOMISARCZUK BONY, S. Effect of a high sulfur diet on rumen microbial activity and rumen thiamine status in sheep receiving a semi-synthetic, thiamine-free diet. *Reproduction Nutrition Development*, v.36, p.31-42, 1996.
- AMARO JÚNIOR, E.; YAMASHITA, H. Aspectos básicos de tomografia computadorizada e ressonância magnética. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.23, p.1-2, 2001.
- BARRETO JÚNIOR, R.A.; MINERVINO, A.H.H.; MORI, C.S.; SUCUPIRA, M.C.A.; ORTOLANI, E.L. Levantamento da concentração de enxofre em capins e de sulfato inorgânico sérico em bovinos criados em fazendas no estado de São Paulo. *Acta Scientiarum Animal Science*, v.30, p.327-332, 2008.
- BEAUCHAMP, R.O.; BUS, J.S.; POPP, J.A.; BOREIKO, C.J.; ANDJELKOVICH, D.A.; LEBER, P. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, v.13, p.25-95, 1984.
- BULGIN, M.S.; STUART, S.D.; MATHER, G. Elemental sulfur toxicosis in a flock of sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.208, p.1063-1065, 1996.
- BURGESS, B.A. Polioencephalomalacia. *Large Animal Veterinary*, v.8, p.1-6, 2008.
- CEBRA, C.K.; CEBRA, M.L. Altere de mentation caused by polioencephalomalacia, hypermetria, and lead poisoning. *Veterinary Clinics of the North America: Food Animal Practice*, v.20, n.2, p. 287-302, 2004.
- CUMMINGS, B.A.; GOLD, D.H.; CALDWELL, D.R.; HAMAR, D.W. Ruminant microbial alterations associated with sulfide generation in steers with dietary sulfate-induced polioencephalomalacia. *American Journal of Veterinary Research*, v.56 p.1390:1395, 1995.

- CUNHA, P.H.J. *Polioencefalomalacia experimentalmente induzida pela ingestão de dieta com alto teor de enxofre ou pelo herpesvírus bovino 5 em bovinos*. 2010. 214f. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- GONZALO-ORDEN, J.M.; DÍEZ, A.; ALTONÁGA, J.R.; GONZALO, J.M.; ORDEN, M.A. Computed tomographic findings in ovine coenurosis. *Veterinary Radiology Ultrasound*, v.40, n.5, p.441-444, 1999.
- GOONERATNE, S.R.; OLKOWSKI, A.A.; CHRISTENSEN, D.A. Sulfur-induced polioencephalomalacia in sheep: Some biochemical Changes. *Canadian Journal Veterinary Research*, v.53, p.462-467, 1989.
- GOULD D.H. Update on sulphur-related polioencephalomalacia. *Veterinary Clinics of the North America: Food Animal Practice*, v.16, n.3, p.481-496, 2000.
- GOULD, D.H.; CUMMINGS, B.A.; HAMAR, D.W. In vivo indicators of pathologic ruminal sulfide production in steers with diet-induced polioencephalomalacia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.9, p.72-76, 1997.
- GOULD D.H. Polioencephalomalacia. *Journal of Animal Science*, v.76, p.309–314, 1998.
- GOULD, D.H.; MCALLISTER, M.M.; SAVAGE, J.C.; HAMAR, D.W. High sulfide concentrations in rumen fluid associated with nutritionally induced polioencephalomalacia in calves. *American Journal Veterinary Research*, v.52, n.7, p.1164-1169, 1991.
- JEFFREY, M.; DUFF, J.P.; HIGGINS, R.J.; SIMPSON, V.R.; JACKMAN, R.; JONES, T.O.; MECHIE, S.C.; LIVESEY, C.T. Polioencephalomalacia associated with the ingestion of ammonium sulphate by sheep and cattle. *Veterinary Record*, v.134, n.14, p.343-348, 1994.
- JENSEN, R.; GRINER, L.A.; ADAMS, O.R. Polioencephalomalacia of cattle and sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.129, p.311-321, 1956.

- KANDYLIS, K. Toxicology of sulfur in ruminants: review. *Journal Dairy Science*, n.67, p.2179-2187, 1984.
- KRASINCKA, B.; GRALAK, M.A.; SIERANSKA, B.; KULASEK, G. The influence of dietary sulphur loading on metabolism and health in young sheep fed low fibre and high starch diet. *Reproduction Nutrition Development*, v.39, p.625-636, 1999.
- KENNEDY, P.M.; SIEBERT, B.D. The utilization of spear grass (*Heteropogon contortus*): The influence of sulphur or energy intake and rumen and blood parameters in cattle and sheep. *Australian Journal of Agriculture Research*, v.23, n.1, p.45-56, 1972.
- KRIJGSHELD, J.J.; FRANKENA, H.; SCHOLTENS, E. Absorption, serum levels and urinary excretion of inorganic sulfate after oral administration of sodium sulfate in the conscious rat. *Biochimica Biophysica Acta*, v.586, n.3, p.492-500, 1979.
- KUNG JR, L. Burping can be dangerous if you are a ruminant: Issues with high sulfur diets. IN. 4^o - *State Dairy Conference*, Dubuque, IA. 2008.
- LEMOES, R.A.A.; RIET-CORREA, F. Polioencefalomalacia. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. *Doenças de ruminantes e eqüídeos*. 3ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. Chap. 2, p.658-670.
- LIMA, E.F.; RIET-CORREA, F.; TABOSA, I.M.; DANTAS, A.F.M.; MEDEIROS J.M. Polioencefalomalacia em caprinos e ovinos na região semi-árida do Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, n.1, p.9-14, 2005.
- LOEW, F.M.; RADOSTITS, O.M.; DUNLOP, R.H. Polioencephalomalacia (Cerebrocortical Necrosis). *Canadian Veterinary Journal*, v.10, n.2, p.54-56, 1969.
- LONERAGAN, G.H.; GOULD, D.H.; CALLAN, R.J.; SIGURDSON, C.J.; HAMAR, D.W. Association of excess sulfur intake and an increase in hydrogen sulfide concentrations in the ruminal gas cap of recently weaned beef calves with polioencephalomalacia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 213, n.11, p.1599-1604, 1998.

- LONERAGAN, G.H.; WAGNER J.J.; GOULD D.H.; GARRY, F.B.; THOREN, M.A. Effects of water sulfate concentrations on performance, water intake, and carcass characteristics of feedlot steers. *Journal of Animal Science*, v.79, n.12, p. 2941-2948, 2001.
- LOW, J.C.; SCOTT, P.R.; HOWIE, F.; LEWIS, M.; FITZSIMONS, J.; SPENCE J.A. Sulphur-induced polioencephalomalacia in lambs. *The Veterinary Record*, v.138, p.327-329, 1996.
- MACHEN, M.R.; WALDRIDGE, B.M.; CEBRA, C.; CEBRA, M.; BELKNAP, E.B.; WILLIAMSON, L.H.; PUGH, D.G. Enfermidades do Sistema Neurológico. In: PUGH, D.G. *Clínica de Ovinos e Caprinos*, São Paulo: Roca, 2004. Chap.11, p.311-352.
- MCALLISTER, M.M.; GOULD, D.H.; HAMAR, D.W. Sulphide-induced polioencephalomalacia in lambs. *Journal Comparative Pathology*, v.106, p.267-278, 1992.
- MCALLISTER, M.M.; GOULD, D.H.; RAISBECK, M.F.; CUMMINGS, B.A.; LONERAGAN, G.H. Evaluation of ruminal sulfite concentrations and seasonal outbreaks of polioencephalomalacia in beef cattle in a feedlot. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 211, n.10, p.1275-1279, 1997.
- MOSCARDINI, A.R.C.; PALUDO, G.R.; PERECMANIS, S.; REIS JR, J.L.; HEINEMANN, M.B.; ZAMBRANO, M.; ARAÚJO, G.R.S.; CUNHA, P.H.J.; FRANÇA, R.O.; RIBEIRO, L.; FERREIRA, R.F.; BORGES, J.R.J. Doenças com sinais neurológicos em ovinos de DF e entorno. In: *Anais do 11º Congresso Latinoamericano de Buiatria*, Salvador. 2003. p. 19.
- NASCIMENTO, I.A.; AFONSO, J.A.; TOKARNIA, C.H.; MENDONÇA, C.L.; COSTA, N.A.; SOUZA, M.I.; OLIVEIRA, L.G.L.; VIEIRA, A.C.S.; PEREIRA A.L.L. Polioencefalomalacia em ovinos. In: *Anais do 5º Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária*. Recife. 2003. p.316.
- NEVILLE, B.W.; SCHAUER, C.S.; KARGES, K.; GIBSON, M.L.; THOMPSON, M.M.; KIRSCHTEN, L.A.; DYER, N.W.; BERG P.T.; LARDY G.P. Effect of thiamine concentration on animal health, feedlot performance, carcass

- characteristics, and ruminal hydrogen sulfide concentrations in lambs fed diets based on 60% distillers dried grains plus solubles. *Journal of Animal Science*, v.88, p.2444-2455, 2010.
- NRC. 2005. National Research Council. *Mineral Tolerance of animals*, 2. ed. Washington, DC: National Academy of Sciences. 385p.
- OLKOWSKI, A.A.; GOONERATNE, S.R.; CRICHLLOW, E.C.; ROUSSEAUX, C.G.; CHRISTESEN, D.A. Effects of high dietary on brain functions using evoked potentials technique. *Canadian Journal Veterinary Research*, v.54, p.113-118, 1990.
- OLKOWSKI, A.A.; GOONERATNE, S.R.; ROUSSEAUX, C.G.; CHRISTESEN, D.A. Role of thiamine status in sulphur induced polioencephalomalacia in sheep. *Research of Veterinary Science*, v.52, p.78-85, 1992.
- OLKOWSKI, A.A. Neurotoxicity and secondary metabolic problems associated with low to moderate levels of exposure to excess dietary sulphur in ruminants: a review. *Veterinary and Human Toxicology*, n.39, p. 355-360, 1997.
- ORTOLANI, E.L. Sulphur deficiency in dayri calves reared on pasture of *Brachiaria decumbens*. *Ciência Rural*, v.31, n.2, p.257-261, 2001.
- PPM – Produção da Pecuária Municipal. IBGE. Rio de Janeiro, v.38, 2010. 62p.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. *Veterinary Medicine: A textbook of the disease of cattle, sheep, goats, pigs and horses*. 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh. 2007. 2065p.
- RAISBECK, M.F. Is polioencephalomalacia associated with high-sulfate diets? *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.180, n.11, p.1303-1305, 1982.
- ROUSSEAUX, C.G.; OLKOWSKI, A.A.; CHAUVET, S.R.; GOONERATNE, S.R.; CHRISTENSON, D.A. Ovine polioencephalomalacia associated with dietary sulphur intake. *Journal of the Veterinary Medical Association*, v.38, p.229-239, 1991.

- SAGER, R.L.; HAMAR, D.W.; GOULD, D.H. Clinical and biochemical alterations in calves with nutritionally induced polioencephalomalacia. *American Journal of Veterinary Research*, v.51, n.12, p.1969-1974, 1990.
- SANT'ANA, F.J.F.; LEMOS, R.A.A.; NOGUEIRA, A.P.A.; TOGNI, M.; TESSELE, B.; BARROS, C.S.L. Polioencefalomalacia em ruminantes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, n.29, n.9, p.681-694, 2009b.
- SANT'ANA, F.J.F.; NOGUEIRA, A.P.A.; SOUZA, R.I.; CARDINAL, S.G.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Polioencefalomalacia experimental induzida por amprólio em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.9, p.747-752, 2009a.
- SCARRATT, W.K.; COLLINS, T.J.; SPONENBERG, D.P. Water deprivation sodium chloride intoxication in a group of feeder lambs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.186, n.9, p.977-978, 1985.
- SCOTT P.R. Cerebrospinal fluid collection and analysis in suspected sheep neurological disease. *Small Ruminant Research*, n.92, p.96-103, 2010.
- SCOTT P.R. Cerebrospinal fluid collection and analysis in some common ovine neurological conditions. *British Veterinary Journal*, v.148, p.15-22, 1992.
- SILVA, A.M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; BOTTON, S.A.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; BRUM, M.C.S.; CANTO, M.C. Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.18, p.99-106, 1998.
- TSUKA, T.; TAURA, Y.; OKAMURA, S.; TAMURA, H.; OKAMOTO, Y.; OKAMURA, Y.; MINAMI, S. Imaging diagnosis – polioencephalomalacia in a calf. *Veterinary Radiology and Ultrassound*, v. 49, n.2, p.149-151, 2008.

Anexos

ANEXOS

Tabela 1. Valores individuais da frequência cardíaca em batimentos por minuto dos ovinos do grupo 1 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 1												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
01	72	80	76	92	96	120	128	100	80	100	96	120
02	88	100	120	136	158	100	100	120	104	88	104	120
03	100	80	100	120	128	120	128	152	104	140	128	128
04	72	72	64	96	120	112	104	104	124	*	*	*
05	80	64	84	160	136	160	116	112	108	132	120	100
06	120	96	76	100	120	100	136	100	96	92	96	100
Média	89	82	87	117	126	119	119	115	103	110	109	114
d.p	19	14	20	27	20	22	14	20	14	24	15	13

* O animal 04 veio a óbito no sexagésimo segundo dia da fase 3.

Tabela 2. Valores individuais da frequência cardíaca em batimentos por minuto dos ovinos do grupo 2 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 2												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
07	80	108	80	120	120	124	88	100	112	72	120	116
08	120	60	80	96	92	100	102	108	112	108	76	96
09	92	76	100	116	128	112	104	120	120	96	100	112
10	104	80	88	112	120	100	88	96	104	96	124	104
11	88	72	96	120	112	152	120	120	128	140	132	108
12	108	76	112	108	120	120	124	140	120	112	120	100
Média	99	79	93	112	115	118	104	114	116	104	112	106
d.p	15	16	13	9	13	19	15	16	8	22	21	7

Tabela 3. Valores individuais da frequência cardíaca em batimentos por minuto dos ovinos do grupo 3 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 3												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
13	92	100	88	120	128	120	124	128	120	124	128	120
14	64	72	116	104	112	124	96	104	104	126	84	80
15	104	72	44	68	68	100	68	100	80	84	96	88
16	76	80	108	120	68	92	108	120	84	88	96	120
17	100	80	100	112	120	80	108	116	96	92	108	96
18	56	64	80	108	72	100	84	120	92	72	96	88
Média	82	78	89	105	95	103	98	115	96	98	101	99
d.p	20	12	26	19	28	13	20	11	15	22	15	17

Tabela 4. Valores individuais da frequência respiratória em movimentos por minuto dos ovinos do grupo 1 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 1												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
01	24	28	32	28	32	28	36	40	28	32	24	32
02	28	28	80	80	80	40	32	96	60	24	16	28
03	24	24	32	28	32	32	20	40	32	32	40	24
04	16	16	32	24	32	24	24	24	28	*	*	*
05	28	20	36	40	80	100	120	52	80	64	48	40
06	40	24	32	24	32	20	24	24	24	20	24	40
Média	27	23	41	37	48	41	43	46	42	34	30	33
d.p	8	5	19	22	25	30	38	27	23	17	13	7

* O animal 04 veio a óbito no sexagésimo segundo dia da fase 3.

Tabela 5. Valores individuais da frequência respiratória em movimentos por minuto dos ovinos do grupo 2 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 2												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
07	20	20	56	60	80	38	44	36	28	28	20	20
08	28	20	28	40	36	32	38	28	28	28	28	24
09	24	24	52	32	48	24	60	44	40	40	36	40
10	16	20	20	32	24	20	24	28	20	12	32	28
11	24	32	64	36	80	36	96	56	52	92	64	120
12	60	24	44	32	40	36	112	120	60	140	44	40
Média	29	23	44	39	51	29	62	52	38	57	37	45
d.p	16	5	17	11	24	7	35	35	16	49	15	37

Tabela 6. Valores individuais da frequência respiratória em movimentos por minuto dos ovinos do grupo 3 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 3												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
13	32	32	48	32	96	40	40	100	100	76	120	80
14	20	20	44	28	88	36	52	28	36	44	24	32
15	28	20	32	20	16	32	20	20	32	28	32	24
16	24	20	24	20	24	40	20	28	20	28	28	32
17	28	28	24	36	48	32	48	40	44	36	28	44
18	24	28	80	20	24	32	28	68	48	24	32	28
Média	26	25	42	26	49	35	35	47	47	39	44	40
d.p	4	5	21	7	35	4	14	31	28	19	37	21

Tabela 7. Valores individuais da temperatura retal em graus Celsius dos ovinos do grupo 1 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 1												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
01	38,7	38,8	39,0	37,9	39,5	38,6	39,9	40,0	38,6	38,8	38,3	39,5
02	38,8	39,2	40,0	39,6	40,1	39,0	39,4	40,1	39,2	38,6	38,2	38,9
03	38,1	37,6	38,8	38,9	38,8	39,0	38,0	39,6	38,6	39,2	38,0	38,8
04	38,7	38,6	37,6	38,2	39,1	38,5	38,4	39,4	38,8	*	*	*
05	38,9	39,0	38,6	39,2	40,8	39,4	39,5	39,6	39,5	39,1	38,8	38,9
06	39,0	38,5	38,9	38,8	38,8	38,1	39,6	39,0	38,3	38,9	38,4	38,3
Média	38,7	38,6	38,8	38,8	39,5	38,8	39,1	39,6	38,8	38,9	38,3	38,9
d.p	0,3	0,6	0,8	0,6	0,8	0,5	0,8	0,4	0,4	0,2	0,3	0,4

* O animal 04 veio a óbito no sexagésimo segundo dia da fase 3.

Tabela 8. Valores individuais da temperatura retal em graus Celsius dos ovinos do grupo 2 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 2												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
07	39,3	39,9	39,7	40,3	39,8	39,2	39,8	39,7	39,0	39,2	39,3	39,4
08	40	38,5	39,3	39,7	39,2	40,3	39,5	39,0	39,1	39,2	38,4	38,8
09	38,8	38,4	39,1	38,9	39,1	38,8	39,2	39,3	39,3	39,0	38,7	39,1
10	39,2	39,1	39,2	39,2	39,9	39,8	38,6	38,6	38,7	39,1	38,5	39,2
11	39,5	39,0	39,0	39,3	39,0	39,3	39,3	38,9	39,1	39,5	38,8	39,4
12	40,0	39,6	39,8	39,9	39,6	39,5	39,7	39,6	39,2	41,0	41,1	39,4
Média	39,5	39,1	39,4	39,6	39,4	39,5	39,4	39,2	39,1	39,5	39,1	39,2
d.p	0,5	0,6	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,8	1,0	0,2

Tabela 9. Valores individuais da temperatura retal em graus Celsius dos ovinos do grupo 3 aferidas durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 3												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
13	39,5	39,0	38,9	38,8	39,8	39,7	39,4	39,8	39,7	39,4	39,7	39,7
14	38,7	38,9	41,3	39,3	39,6	39,5	39,1	39,5	39,5	40,1	40,6	39,3
15	38,3	38,5	38,1	38,5	38,0	38,9	38,8	39,0	38,9	38,4	38,8	38,3
16	38,0	38,6	38,4	36,8	37,9	38,2	38,6	38,7	38,2	38,3	38,8	38,8
17	40,1	38,8	38,8	40,4	39,9	38,9	39,5	39,2	38,9	39,4	39,2	38,8
18	38,3	40,4	39,8	39,1	38,8	39,5	38,9	39,6	39,5	39,0	38,9	39,0
Média	38,8	39,0	39,2	38,8	39,0	39,1	39,1	39,3	39,1	39,1	39,3	39,0
d.p	0,8	0,7	1,2	1,2	0,9	0,6	0,4	0,4	0,6	0,7	0,7	0,5

Tabela 10. Valores individuais dos movimentos ruminais em cinco minutos nos ovinos do grupo 1 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 1												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
01	8	11	6	10	9	4	10	8	10	7	14	6
02	5	7	13	12	9	4	11	6	4	8	8	7
03	8	9	14	12	12	16	14	10	12	16	12	12
04	10	8	9	14	12	6	10	6	5	*	*	*
05	6	8	7	12	10	8	12	6	8	8	7	7
06	9	7	8	10	8	8	6	8	6	10	9	7
Média	8	8	10	12	10	8	11	7	8	10	10	8
d.p	2	2	3	2	2	4	3	2	3	4	3	2

* O animal 04 veio a óbito no sexagésimo segundo dia da fase 3.

Tabela 11. Valores individuais dos movimentos ruminais em cinco minutos nos ovinos do grupo 2 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 2												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
07	6	10	14	16	6	7	8	7	8	10	10	6
08	7	8	3	7	6	4	1	6	6	12	9	12
09	5	10	6	6	6	6	5	8	8	4	10	6
10	10	10	9	6	6	6	4	4	5	3	5	6
11	8	5	6	4	1	8	4	8	8	4	6	7
12	5	5	7	6	5	5	2	7	10	4	5	4
Média	7	8	8	8	5	6	4	7	8	6	8	7
d.p	2	2	4	4	2	1	2	2	2	4	2	3

Tabela 12. Valores individuais dos movimentos ruminais em cinco minutos nos ovinos do grupo 3 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 3												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
13	8	6	10	8	12	6	8	8	7	8	4	4
14	8	8	10	14	6	12	4	4	4	8	10	6
15	6	1	3	8	14	7	8	5	8	10	12	16
16	12	10	7	10	6	5	5	9	8	9	4	6
17	5	6	6	7	8	7	6	5	10	8	8	3
18	10	5	8	6	5	7	4	6	7	4	5	7
Média	7	7	8	9	8	7	6	7	8	8	7	7
d.p	3	3	3	3	4	2	2	2	2	2	3	5

Tabela 13. Valores individuais do pH ruminal dos ovinos do grupo 1 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 1												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
01	7,05	6,62	6,67	6,05	6,44	5,70	6,67	6,49	6,57	6,44	6,99	6,71
02	7,07	6,90	6,72	6,05	6,37	6,40	6,44	6,14	6,50	6,54	6,64	6,29
03	7,34	7,11	6,60	6,40	6,61	6,57	6,45	6,33	6,65	5,82	6,11	6,50
04	7,70	7,01	6,60	6,18	6,33	5,97	6,47	6,14	6,35	*	*	*
05	7,62	7,17	6,75	6,17	6,71	6,08	6,22	6,25	6,52	6,88	6,89	6,51
06	7,48	7,27	6,35	6,23	6,55	6,64	6,66	6,59	6,74	6,83	6,90	6,67
Média	7,38	7,01	6,62	6,18	6,50	6,23	6,49	6,32	6,56	6,50	6,71	6,54
d.p	0,27	0,23	0,14	0,13	0,15	0,37	0,17	0,19	0,13	0,42	0,36	0,17

* O animal 04 veio a óbito no sexagésimo segundo dia da fase 3.

Tabela 14. Valores individuais do pH ruminal dos ovinos do grupo 2 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 2												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
07	7,15	7,80	6,91	6,14	5,68	6,40	6,19	5,94	6,23	6,50	6,10	6,52
08	7,36	6,64	6,33	5,93	5,71	6,24	6,58	6,35	6,53	6,16	6,54	6,78
09	7,43	7,13	6,81	6,05	5,62	5,82	5,99	5,92	6,51	6,03	6,29	6,51
10	6,69	6,98	6,62	6,23	6,26	6,50	6,07	6,05	6,49	6,17	6,38	6,58
11	6,91	6,51	6,64	6,41	5,96	5,81	5,98	6,35	6,20	5,95	5,98	6,44
12	7,43	6,80	6,47	6,24	5,81	5,92	6,04	6,68	6,64	6,20	6,23	6,37
Média	7,16	6,95	6,63	6,17	5,84	6,12	6,14	6,22	6,43	6,17	6,25	6,53
d.p	0,31	0,51	0,21	0,17	0,24	0,30	0,23	0,30	0,18	0,19	0,20	0,14

Tabela 15. Valores individuais do pH ruminal dos ovinos do grupo 3 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 3												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
13	7,18	7,13	7,09	6,40	5,75	6,24	6,35	5,88	6,05	6,02	5,89	5,64
14	6,97	7,32	6,93	6,10	5,84	5,89	6,55	6,22	6,46	6,31	6,63	6,40
15	7,24	7,08	7,30	6,64	6,20	6,03	6,42	6,20	6,40	6,25	6,40	6,14
16	7,05	7,13	6,10	5,75	6,20	5,79	5,80	5,66	6,23	6,22	6,08	5,88
17	7,27	7,10	6,47	6,01	6,53	6,08	6,00	6,05	6,24	6,51	6,22	6,26
18	7,03	6,80	6,98	6,02	6,52	6,16	5,97	6,03	6,55	6,35	6,67	5,26
Média	7,12	7,11	6,81	6,18	6,17	6,03	6,18	6,01	6,32	6,28	6,32	6,10
d.p	0,12	0,12	0,44	0,31	0,33	0,17	0,30	0,21	0,18	0,16	0,31	0,28

Tabela 16. Valores individuais do sulfeto de hidrogênio ruminal (H₂S) em ppm dos ovinos do grupo 1 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 1												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
01	300	1060	100	225	400	50	24	24	24	24	24	24
02	110	720	50	50	24	220	24	24	55	24	24	24
03	80	380	50	90	24	24	24	100	25	24	24	24
04	190	24	100	130	24	24	220	24	30	*	*	*
05	24	50	50	24	24	24	75	90	140	24	24	24
06	24	24	24	300	50	24	60	24	50	24	24	24
Média	121	376	62	137	91	61	71	48	54	24	24	24
d.p	107	434	31	107	152	79	76	37	44	0	0	0

* O animal 04 veio a óbito no sexagésimo segundo dia da fase 3.

Tabela 17. Valores individuais do sulfeto de hidrogênio ruminal (H₂S) em ppm dos ovinos do grupo 2 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 2												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
07	350	640	2350	2500	1800	4500	5200	4500	7500	5000	1200	3000
08	200	300	2100	3000	2100	3000	1100	5000	1500	2000	4800	4500
09	100	80	9000	3500	4900	5100	3500	5000	5500	4000	1100	1500
10	460	40	1800	1200	3500	2000	3000	4800	4500	4800	3000	2800
11	750	25	2400	1500	1500	5600	1000	5100	3000	5000	2500	1000
12	24	40	3000	2000	4000	6500	2000	5000	4800	2000	1000	3000
Média	314	188	3442	2283	2967	4450	2633	4900	4467	3800	2267	2633
d.p	267	244	2752	884	1368	1677	1606	219	2066	1442	1491	1244

Tabela 18. Valores individuais do sulfeto de hidrogênio ruminal (H₂S) em ppm dos ovinos do grupo 3 aferidos durante o experimento e média e desvio padrão de cada momento.

Grupo 3												
Momentos												
Animal	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
13	1000	240	1000	6000	6000	5500	6000	4000	7000	6000	5000	7000
14	24	50	1000	1100	3000	2000	4500	2500	4900	4500	600	1300
15	24	250	500	3500	4000	1000	3000	6000	3000	5000	5000	3800
16	100	550	4900	4500	5000	7500	3200	4900	4900	7000	5100	5000
17	50	260	3000	2800	1500	1000	6500	4500	4500	2500	4000	2500
18	100	50	5500	7000	2300	5500	3000	5000	5000	5000	1500	3500
Média	216	233	2650	4150	3633	3750	4367	4400	4883	5000	3533	3850
d.p	385	184	2162	2155	1693	2770	1571	1490	1280	1517	1986	1985

Nas tabelas e gráficos a seguir estão as médias de cada momento nos diferentes grupos das variáveis pH, PCO₂, PO₂, BE, HCO₃⁻, tCO₂, Na⁺, K⁺, Hct e Hb obtidas no exame de hemogasometria venosa realizadas no aparelho i-Stat 1 utilizando o cartucho EG7⁺.

Tabela 19. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de pH sanguíneo, nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

		pH											
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
G1	Média	7,40	7,41	7,47	7,45	7,43	7,45	7,46	7,45	7,45	7,46	7,45	7,46
	DP	0,05	0,03	0,02	0,05	0,04	0,01	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04
G2	Média	7,38	7,39	7,48	7,44	7,46	7,44	7,45	7,46	7,46	7,45	7,43	7,45
	DP	0,02	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04	0,01	0,02	0,03	0,02	0,04
G3	Média	7,38	7,39	7,49	7,44	7,43	7,45	7,45	7,45	7,44	7,40	7,45	7,43
	DP	0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,06	0,03	0,04	0,04

Gráfico 1. Médias dos valores de pH sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.

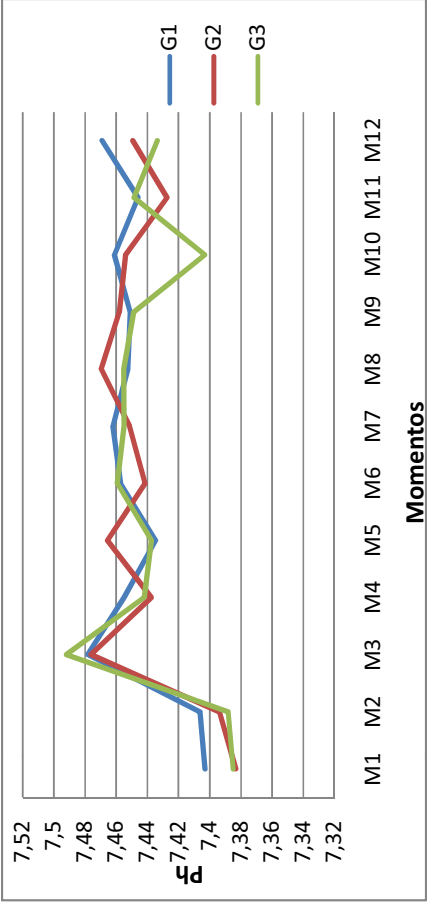


Tabela 20. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores da pressão de CO₂ nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

PCO ₂ (mmHg)												
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
G1	Média	42,13	40,81	41,38	38,05	40,45	38,06	34,98	39,18	35,62	39,60	36,46
	DP	4,67	2,82	2,42	6,91	3,69	2,38	2,87	2,96	4,19	2,48	2,52
G2	Média	38,50	37,23	38,16	34,41	38,46	38,8	37,28	36,93	36,23	37,58	38,01
	DP	2,33	3,07	3,08	3,68	2,66	1,88	3,87	3,88	1,95	5,27	3,97
G3	Média	39,75	38,93	35,06	36,88	37,01	35,8	36,58	36,13	34,7	36,5	36,81
	DP	1,69	2,71	1,93	1,71	2,92	2,23	2,5	3,5	0,76	3,89	1,32

Gráfico 2. Médias dos valores de PCO₂ sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.

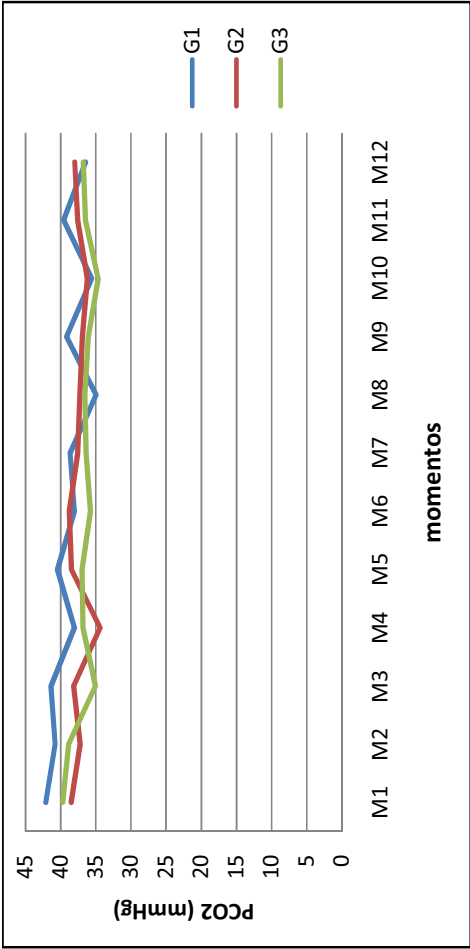


Tabela 21. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores da pressão de O₂ nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

		PO ₂ (mmHg)											
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
G1	Média	37,50	38,00	37,67	46,17	48,00	42,33	43,00	47,50	42,50	42,00	39,40	38,21
	DP	8,34	6,60	7,37	17,49	17,31	6,02	7,80	16,63	5,47	5,15	2,51	5,26
G2	Média	41,67	41,00	40,50	40,17	42,17	41,67	45,00	42,33	46,16	48,16	44,17	46,55
	DP	4,55	2,37	3,73	3,37	4,07	4,37	5,22	4,08	3,49	3,82	6,68	6,72
G3	Média	34,00	38,67	41,17	37,33	41,50	39,67	38,50	46,17	42,50	39,83	45,17	39,00
	DP	5,29	7,34	6,21	5,05	3,45	6,09	4,09	9,11	5,54	7,91	9,26	1,79

Gráfico 3. Médias dos valores de PO₂ sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.

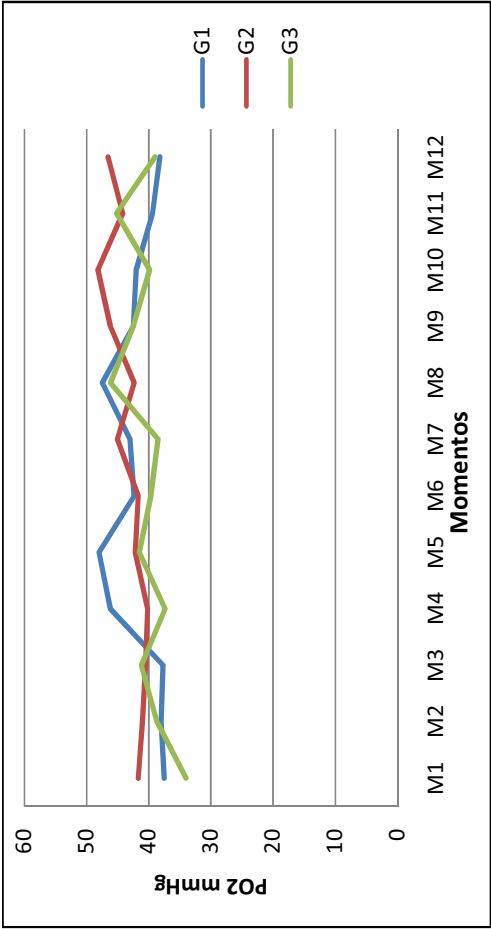


Tabela 22. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores do excesso de base (BE), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

		BE (mmol/L)											
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
G1	Média	1,66	1,00	7,16	2,83	3,17	3,17	3,83	0,50	3,17	1,88	3,20	2,80
	DP	3,67	2,76	1,17	5,42	3,54	1,33	2,79	1,64	3,76	3,63	2,59	4,21
G2	Média	-2,16	-2,16	4,55	1,00	4,00	2,33	2,33	3,17	2,66	1,66	0,67	2,33
	DP	1,47	4,02	2,17	2,00	1,55	1,75	3,56	2,32	3,27	2,25	3,20	2,07
G3	Média	-1,33	-1,33	3,53	1,00	0,83	1,67	1,67	2,00	1,33	-3,00	1,33	0,33
	DP	1,75	2,42	1,76	1,41	2,04	2,07	1,51	1,10	2,80	1,90	3,61	2,25

Gráfico 4. Médias dos valores de BE sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.

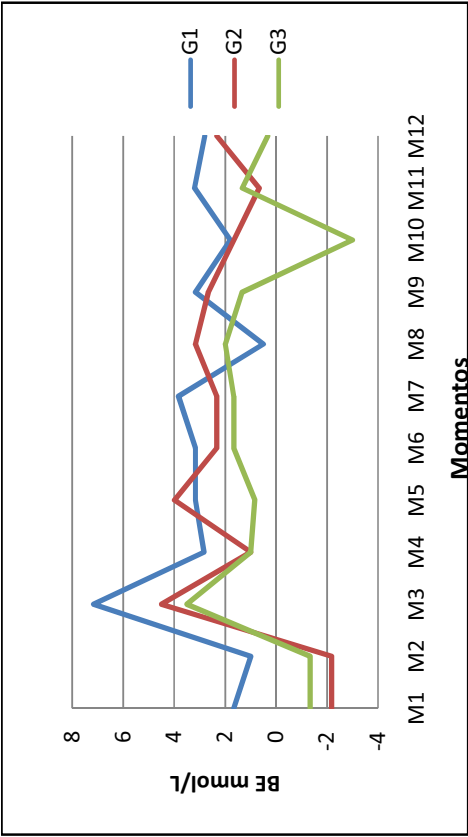


Tabela 23. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de bicarbonato (HCO₃), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

HCO ₃ (mmol/L)													
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	
G1	Média	25,93	25,28	30,35	26,40	26,63	26,50	27,18	23,87	26,97	25,08	27,02	26,22
	DP	3,17	2,32	1,18	5,08	3,03	1,40	2,58	1,56	3,45	3,50	2,60	3,54
G2	Média	22,4	22,40	27,65	24,67	27,15	25,86	25,75	26,68	25,73	24,91	24,40	25,82
	DP	1,33	3,34	2,00	2,05	1,71	1,49	3,10	2,56	3,05	1,78	3,35	1,83
G3	Média	23,40	23,08	26,38	24,77	24,53	24,93	25,18	25,25	24,55	21,28	24,82	24,25
	DP	1,49	2,22	1,44	1,25	1,72	1,56	1,45	1,17	1,97	1,64	3,02	1,91

Gráfico 5. Médias dos valores de HCO₃ sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.

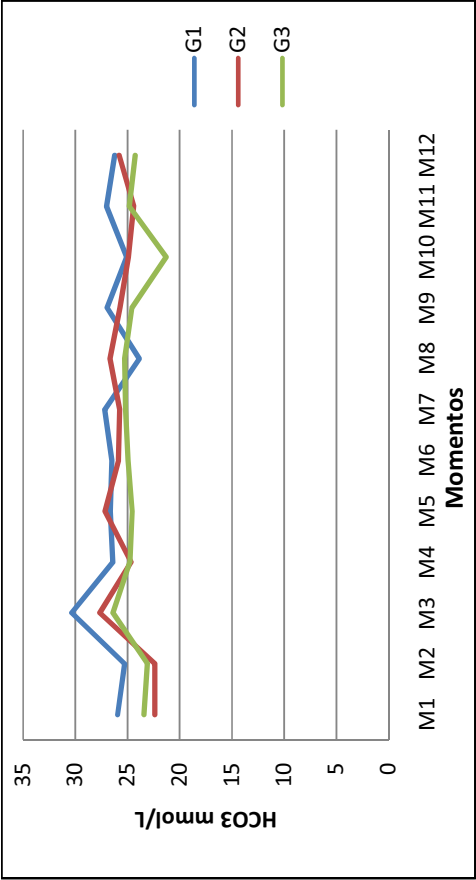


Tabela 24. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de total de CO₂ (TCO₂), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

TCO ₂ (mmol/L)												
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
G1	Média	27,16	26,33	31,66	27,33	28,00	27,50	28,33	24,83	26,20	28,20	27,20
	DP	3,25	2,50	1,37	5,39	2,97	1,38	2,80	1,47	3,56	2,59	3,70
G2	Média	23,50	23,33	28,83	25,67	28,33	26,83	26,66	28,00	25,83	25,50	26,83
	DP	1,38	3,56	1,94	1,97	1,97	1,47	3,27	2,61	1,72	3,62	1,94
G3	Média	24,50	24,17	27,16	25,83	25,50	26,00	26,17	26,17	22,16	25,67	25,17
	DP	1,38	1,94	1,47	1,33	1,87	1,67	1,33	1,33	1,72	3,14	1,94

Gráfico 6. Médias obtidas para os valores de TCO₂, nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

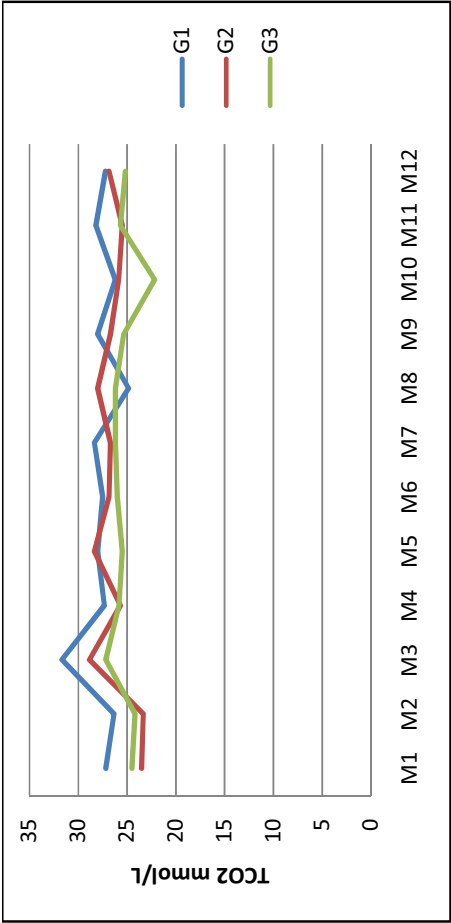


Tabela 25. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores da saturação de O₂ (sO₂), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

sO ₂ (%)													
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	
G1	Média	61,00	66,00	70,33	74,00	74,66	74,67	74,00	74,83	75,33	74,80	72,40	70,00
	DP	15,06	9,88	8,59	13,81	11,50	7,92	11,10	15,89	4,89	7,56	3,21	8,19
G2	Média	68,50	69,67	72,50	69,67	73,67	71,50	76,50	76,67	79,00	80,16	75,33	78,00
	DP	7,01	2,16	6,38	6,59	6,09	6,69	6,32	3,20	3,63	4,45	5,61	6,39
G3	Média	57,50	64,67	74,33	67,67	72,83	70,83	70,50	77,00	73,83	67,17	75,17	69,83
	DP	10,99	11,50	6,31	6,50	5,19	9,11	7,12	8,98	13,27	11,57	11,57	4,26

Gráfico 7. Médias dos valores de sO₂ sanguíneo dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.

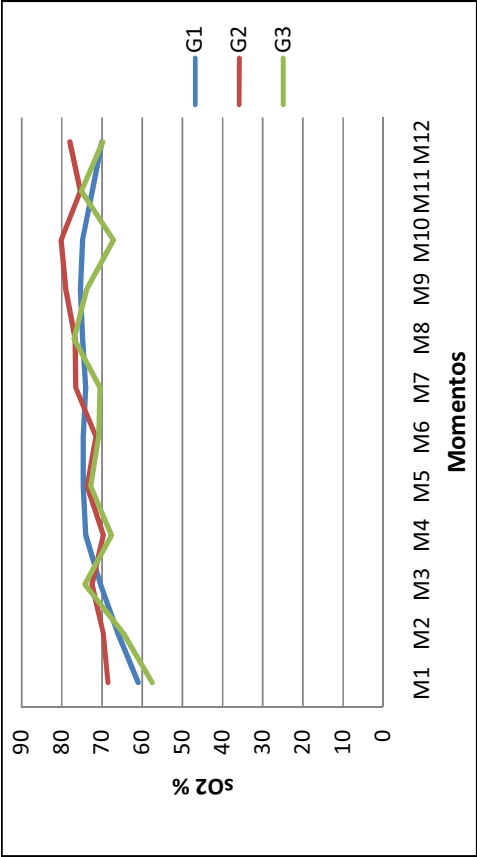


Tabela 26. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de sódio (Na), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

		Na (mmol/L)											
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
G1	Média	145,33	145,33	147,33	145,83	147,17	147,33	147,50	146,00	148,55	147,00	148,20	147,20
	DP	1,51	1,86	0,82	0,75	0,75	0,52	2,43	1,41	1,22	1,58	1,79	1,10
G2	Média	146,50	145,00	147,16	145,66	148,16	147,17	145,00	147,00	146,00	145,33	146,00	146,33
	DP	1,52	1,79	1,17	1,51	1,72	1,47	1,41	1,67	1,10	1,51	3,46	1,63
G3	Média	147,17	145,17	146,67	148,66	147,17	147,83	146,00	147,83	146,16	145,17	147,83	147,33
	DP	0,75	1,83	1,63	3,14	2,04	2,32	1,26	1,60	0,75	2,04	2,14	1,75

Gráfico 8. Médias dos valores de Na dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.

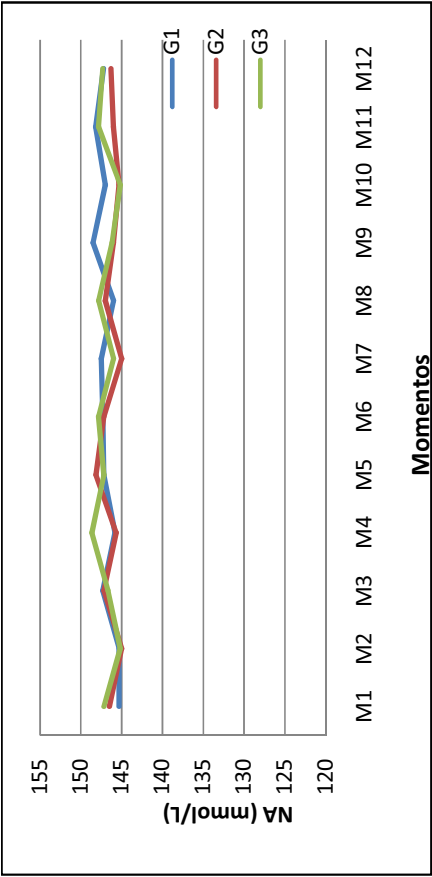


Tabela 27. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de potássio (K), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

K (mmol/L)													
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	
G1	Média	3,85	3,55	3,52	3,55	3,77	3,48	3,52	3,32	3,82	3,90	3,68	
	DP	0,32	0,41	0,26	0,37	0,57	0,50	0,34	0,26	0,23	0,22	0,31	
G2	Média	3,75	3,52	3,83	3,52	3,53	3,88	3,73	3,68	3,48	3,68	3,78	
	DP	0,23	0,50	0,23	0,26	0,33	0,22	0,27	0,29	0,46	0,54	0,27	
G3	Média	3,95	3,55	3,45	3,45	3,53	3,70	3,97	3,68	3,75	3,77	3,77	
	DP	0,26	0,29	0,44	0,26	0,43	0,30	0,25	0,33	0,35	0,43	0,29	

Gráfico 9. Médias dos valores de K dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.

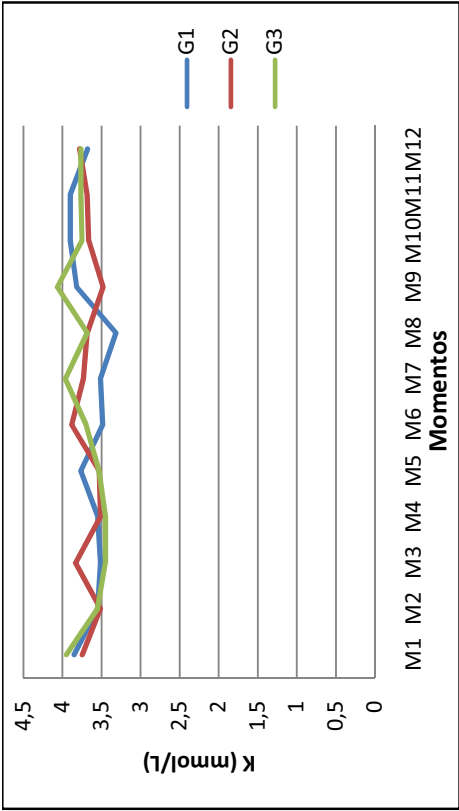


Tabela 28. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de cálcio ionizado (i Ca), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

i Ca (mmol/L)												
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
G1	Média	0,94	1,07	0,91	0,70	0,85	0,81	0,81	0,75	0,72	0,76	0,74
	DP	0,22	0,17	0,14	0,13	0,19	0,20	0,14	0,21	0,17	0,27	0,11
G2	Média	0,85	0,98	0,83	0,71	0,80	0,81	0,81	0,82	0,73	0,80	0,82
	DP	0,16	0,17	0,07	0,14	0,06	0,13	0,19	0,09	0,14	0,24	0,17
G3	Média	1,13	0,85	0,61	0,62	0,72	0,72	0,75	0,80	0,57	0,67	0,73
	DP	0,16	0,09	0,18	0,09	0,10	0,11	0,10	0,08	0,14	0,22	0,12

Gráfico 10. Médias dos valores de i Ca dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.

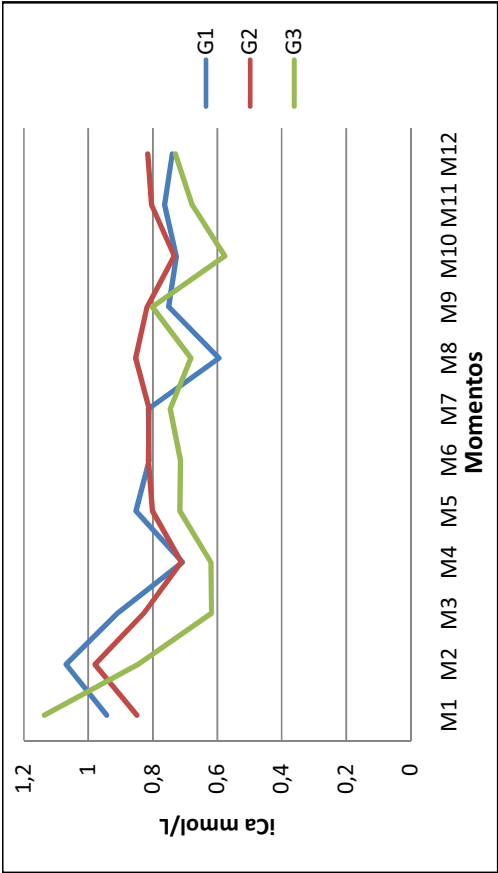


Tabela 29. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores do hematócrito (Htc), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

		Hct (%)											
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
G1	Média	25,67	27,33	24,67	22,50	23,67	23,66	24,50	21,83	26,33	24,20	26,00	23,80
	DP	3,61	4,72	2,94	3,08	2,73	3,08	1,52	2,32	2,94	0,45	2,00	1,79
G2	Média	21,33	21,50	21,83	22,33	24,67	24,33	22,83	24,67	23,00	23,17	22,67	24,50
	DP	6,35	7,87	6,85	5,50	4,27	3,33	4,26	3,72	2,68	4,54	5,32	3,02
G3	Média	27,00	26,00	23,67	24,50	21,17	23,67	25,00	24,50	26,00	23,67	24,50	25,00
	DP	4,86	7,51	5,85	3,67	5,19	3,33	2,37	3,08	2,53	4,27	4,42	4,34

Gráfico 11. Médias dos valores de Htc dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.

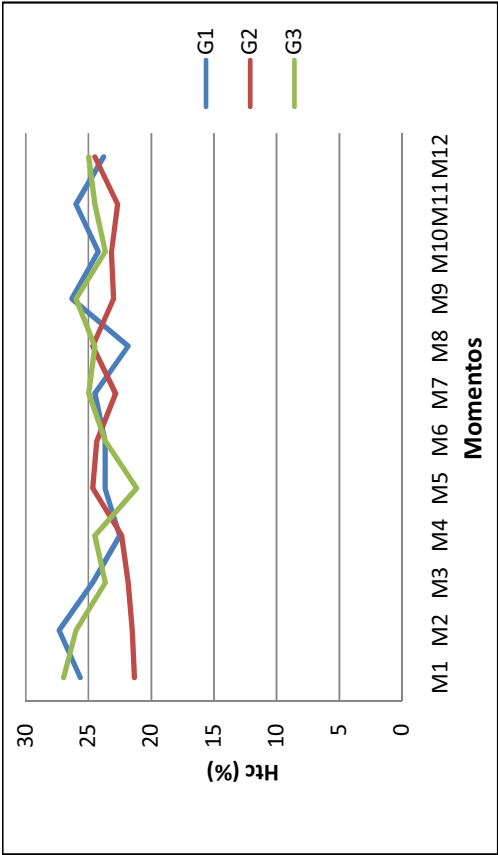
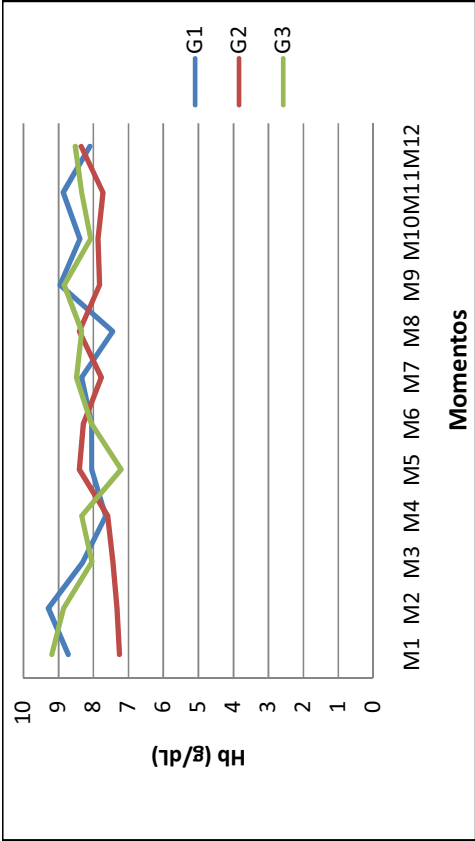


Tabela 30. Médias e desvios padrão (DP) obtidos para os valores de hemoglobina (Hb), nos diferentes momentos do experimento, para os três grupos avaliados.

		Hb (g/dL)											
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
G1	Média	8,72	9,28	8,30	7,65	8,05	8,05	8,33	7,45	8,95	8,38	8,86	8,10
	DP	1,23	1,60	1,07	1,05	0,92	1,07	0,49	0,78	1,00	0,27	0,69	0,62
G2	Média	7,25	7,32	7,43	7,58	8,40	8,28	7,77	8,40	7,82	7,87	7,72	8,35
	DP	2,18	2,67	2,32	1,88	1,47	1,13	1,45	1,26	0,90	1,56	1,81	1,01
G3	Média	9,18	8,85	8,03	8,33	7,20	8,05	8,48	8,33	8,83	8,07	8,33	8,52
	DP	1,66	2,55	1,98	1,25	1,74	1,12	0,80	1,07	0,88	1,44	1,49	1,47

Gráfico 12. Médias dos valores de Hb dos animais do grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3), em todas as fases do experimento.



Normas para envio de trabalhos a revista Pesquisa Veterinária Brasileira

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 120,00 por página editorada e

impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), **Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet- Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o

texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “ (Apud**

Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitarse- á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope. Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As **legendas explicativas das Figuras** conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os **Quadros deverão ser** explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.