

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ACIDOSE LÁCTICA RUMINAL AGUDA INDUZIDA  
EXPERIMENTALMENTE EM OVINOS: ESTUDO CLÍNICO E  
LABORATORIAL**

**Amanda Festa Sabes**

Médica Veterinária

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ACIDOSE LÁCTICA RUMINAL AGUDA INDUZIDA  
EXPERIMENTALMENTE EM OVINOS: ESTUDO CLÍNICO E  
LABORATORIAL**

**Amanda Festa Sabes**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Marques**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Clínica Médica Veterinária.

**2015**

S115a Sabes, Amanda Festa  
Acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente em  
ovinos : estudo clínico e laboratorial / Amanda Festa Sabes. --  
Jaboticabal, 2015  
xi, 87 p. : il. ; 28.cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Luiz Carlos Marques

Banca examinadora: Annelise Carla Camplesi dos Santos, Paulo  
Ricardo Dell'Armelina Rocha

Bibliografia

1. Acidemia. 2. Ovelhas. 3. Hemogasometria. 4. Metaloproteinases.  
5. Laminite. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 619:616.33-008.8:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** ACIDOSE LÁCTICA RUMINAL AGUDA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM OVINOS: ESTUDO CLÍNICO E LABORATORIAL


**AUTORA:** AMANDA FESTA SABES

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. LUIZ CARLOS MARQUES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. LUIZ CARLOS MARQUES  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. PAULO RICARDO DELL'ARMELINA ROCHA  
Universidade Paulista / São Paulo/SP

Data da realização: 06 de novembro de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Amanda Festa Sabes** – nascida em Marília, São Paulo, em 15 de Agosto de 1989, filha de Adalberto Carlos Sabes e Silvana Festa Sabes. Realizou sua graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, concluindo-a em Fevereiro de 2013. Fez duas Iniciações Científicas na área de Clínica e Cirurgia de Equinos, nos anos de 2010, 2011 e 2012; sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Realizou parte de seu estágio curricular no Hospital Veterinário Central localizado em Portugal. No ano de 2013, foi Bolsista de Treinamento Técnico Nível III da FAPESP, durante 11 meses. Em março de 2014, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica Veterinária, sendo aprovada em primeiro lugar no processo seletivo e novamente bolsista FAPESP.

*Blackbird singing in the dead of night  
Take these broken wings and learn to fly  
All your life  
You were only waiting for this moment to arise*

*Blackbird singing in the dead of night  
Take these sunken eyes and learn to see  
All your life  
You were only waiting for the moment to be free*

*Blackbird, fly, blackbird, fly*

*Paul McCartney*

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio incondicional em todos os momentos, pela proteção, amor e paciência (principalmente essa) que sempre tiveram comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Adalberto Carlos Sabes e Silvana Festa Sabes, além da minha tia Simone Festa por todas as oportunidades durante esses anos e por não desistirem de mim no momento em que eu mais precisei;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Marques, pela orientação desde a bolsa de Treinamento Técnico, por todos os conselhos, apoio e pela confiança depositada;

À FAPESP, pela ajuda financeira para o desenvolvimento desta dissertação por meio de Bolsa de Mestrado;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisele Fabrino Machado pela autorização em utilizar o LAPAP (Laboratório de Patologia Aplicada) para a realização das análises zimográficas;

Ao Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha que me ensinou e ajudou na realização da zimografia;

À Annita Moraes Girardi, que sem ela esse experimento seria impossível de ser realizado. Muito obrigada por todos os conselhos, puxões de orelha, incontáveis conversas, além de ser minha companheira de todas as horas;

À Kamila Gravena, minha eterna co-orientadora, amiga; só tenho que agradecer por todos os conselhos durante todos esses anos. Serei sua eterna IC.

À Nathália Pereira de Souza, amiga desde sempre e para sempre, e que foi essencial em todos os momentos da minha vida, e nesse em especial não seria diferente;

À Mayara Correa Peixoto por todos os momentos alegres nesses anos e por toda a amizade;

À Nara Saraiva Bernardi, por todos os conselhos e pela convivência nos períodos críticos da qualificação e da defesa;

À minha querida amiga Maisa Casteleti Beraldo Vizontim por todos esses anos de amizade em Jaboticabal;

A todos que ajudaram durante o experimento e em especial à Gabriela Marchiori Bueno e ao Darcio Zangirolami Filho;

Aos membros das Comissões Examinadoras, Daniela Gomes da Silva, José Jurandir Fagliari, Annelise Carla Camplesi dos Santos e Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha pelas correções e sugestões pertinentes que melhoraram muito a qualidade deste trabalho;

Aos técnicos e amigos do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV - UNESP, Renata Lemos Nagib Jorge, Cláudia Aparecida da Silva Nogueira e Paulo César da Silva, pela imensa ajuda, infinita paciência, incontáveis momentos de conversas e conselhos no café, e apoio desde a Iniciação Científica;

Aos funcionários do Setor de Grandes Animais do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" por toda a ajuda durante a fase experimental;

Ao Prof. Dr. João Ademir de Oliveira por toda ajuda com a análise estatística deste experimento;

Aos meus amigos de Jaboticabal e em especial aos amigos da graduação que perto (ou mesmo longe) me apoiaram durante essa fase em especial ao Bruno Christian Rodrigues, Pâmela Bongiovanni Catandi, Ricardo Della Matta Júnior e Bruna Maria Arssuffi;

E por último, porém não menos importante, às ovelhas, que sem elas esse estudo não seria possível.

A todos, muito obrigada.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
Capítulo 1 – Considerações gerais.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Revisão de literatura.....	3
1.2.1 Aspectos gerais sobre fisiologia ruminal e ALRA.....	3
1.2.2 Etiopatogenia da ALRA.....	5
1.2.3 Diagnóstico.....	11
1.3 Referências.....	13
 Capítulo 2 - Avaliação clínico laboratorial de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente	
Resumo.....	20
2.1 Introdução.....	21
2.2 Material e Métodos.....	22
2.3 Resultados.....	24
2.4 Discussão.....	33
2.5 Conclusão.....	37
2.6 Referências.....	38
 Capítulo 3 – Hemogasometria arterial de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente	
Resumo.....	42
3.1 Introdução.....	43
3.2 Material e Métodos.....	44
3.3 Resultados.....	46
3.4 Discussão.....	49

3.5 Conclusão.....	51
3.6 Referências.....	52

#### Capítulo 4 – Proteinogramas séricos de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente

Resumo.....	54
4.1 Introdução.....	55
4.2 Material e Métodos.....	56
4.3 Resultados.....	58
4.4 Discussão.....	64
4.5 Conclusão.....	67
4.6 Referências.....	69

#### Capítulo 5 – Expressão das metaloproteinases 2 e 9 em ovinos com acidose láctica ruminal aguda e laminite aguda

Resumo.....	74
5.1 Introdução.....	75
5.2 Material e Métodos.....	76
5.3 Resultados.....	79
5.4 Discussão.....	82
5.5 Conclusão.....	84
5.6 Referências.....	85



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal

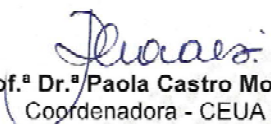


## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 03888/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Avaliação hemogasimétricas e da expressão das metaloproteinases 2 e 9 em ovinos com acidose láctica rumenal aguda induzida experimentalmente"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Carlos Marques está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paola Castro Moraes  
Coordenadora - CEUA

**LISTA DE ABREVIATÖES**

Ab - albumina  
ALRA – acidose láctica ruminal aguda  
AGVs – ácidos graxos voláteis  
ARSA – acidose ruminal subaguda  
Ca – ceruloamilóide A  
Cp – ceruloplasmina  
ctCO<sub>2</sub> – dióxido de carbono total  
CV – coeficiente de variação  
EB – excesso de base  
FC – frequência cardíaca  
Fib – fibrinogênio  
FR – frequência respiratória  
H<sup>+</sup> - íon hidrogênio  
HCO<sub>3</sub> – bicarbonato  
HPO<sub>4</sub> – fosfato  
Hp – haptoglobina  
IgA – imunoglobulina A  
IgG – imunoglobulina G  
K<sub>2</sub>EDTA – ácido etilenodiaminotetracético dipotássico  
LPS – lipopolissacarídeos  
MMP 2 – metaloproteinase 2  
MMP 9 – metaloproteinase 9  
MMPs – metaloproteinases  
MR – movimentos ruminais  
NaF – fluoreto de sódio  
Na<sub>2</sub>EDTA – ácido etilenodiaminotetracético dissódico  
NB – neutrófilos bastonetes  
NS – neutrófilos segmentados  
pCO<sub>2</sub> – pressão parcial de dióxido de carbono  
PFA – proteína de fase aguda  
pO<sub>2</sub> – pressão parcial de oxigênio

PT – proteína total

PPM 95 – proteína de peso molecular 95

PPM 46 – proteína de peso molecular 46

PPM 36 – proteína de peso molecular 36

PPM 31 – proteína de peso molecular 31

RFA – resposta de fase aguda

SDS – dodecil sulfato de sódio

SO<sub>2</sub> – saturação de oxigênio

T<sup>o</sup> - temperatura corporal

Tf – transferrina

α1AT – α 1 anti-tripsina

α1 GA – α 1 glicoproteína ácida

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2 - Avaliação clínico laboratorial de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente

**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) dos valores referentes ao peso (kg) de ovinos submetidos à indução da ALRA. Momentos de colheita: controle\*, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana administração da sacarose via oral.....25

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das variáveis clínicas de ovinos com ALRA: frequência cardíaca – FC (batimentos por minuto), frequência respiratória – FR (movimentos por minuto), temperatura corporal - T ( $^{\circ}$ C) e movimentos ruminais – MR (ciclos/2 minutos). Momentos de colheita: controle, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração de sacarose via oral.....26

**Tabela 3.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das contagens de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), concentração de hemoglobina (g/dL), volume globular (%) e plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: controle, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração de sacarose via oral.....28

**Tabela 4.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das contagens de leucócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos bastonetes - NB, neutrófilos segmentados - NS, linfócitos e monócitos ( $\mu\text{L}$ ) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: controle, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração da sacarose via oral.....30

**Tabela 5.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) níveis plasmáticos de glicose (mg/dL) e lactato (mg/dL) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: controle\*, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração da sacarose via oral.....32

### Capítulo 3 - Hemogasometria arterial de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente

**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) da hemogasometria arterial de ovinos com ALRA: logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio (pH); pressões parciais de oxigênio -  $p\text{O}_2$  e dióxido de carbono -  $p\text{CO}_2$  (mmHg); concentrações de bicarbonato -  $\text{HCO}_3^-$  e de dióxido de carbono total -  $\text{ctCO}_2$  (mMol/L); saturação de oxigênio -  $\text{SO}_2$  (%) e excesso de base - EB (mMol/L). Momentos de colheita: controle\*, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração de sacarose via oral.....47

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) dos valores referentes ao logaritmo negativo da atividade de íons hidrogênio (pH) da urina. Momentos de colheita: controle, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 h, 2<sup>a</sup> semana, 3<sup>a</sup> semana e 4<sup>a</sup> semana administração da sacarose via oral.....49

#### **Capítulo 4 - Proteinogramas séricos de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente**

**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das concentrações séricas da proteína total (g/mL) e das proteínas de fase aguda (mg/dL) de ovinos com acidose láctica ruminal aguda, obtidas pela técnica de SDS-PAGE: IgA - imunoglobulina A; ceruloplasmina; transferrina; albumina;  $\alpha$ 1AT; P46; haptoglobina;  $\alpha$ 1GA; P36; P31; IgG; Fib. IgA – imunoglobulina A;  $\alpha$ 1AT -  $\alpha$ 1-antitripsina;  $\alpha$ 1AG -  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida; IgG - imunoglobulina G; Fib – fibrinogênio Momentos de colheita: controle, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 2<sup>a</sup> semana, 3<sup>a</sup> semana e 4<sup>a</sup> semana após administração de sacarose via oral .....60

#### **Capítulo 5 - Expressão das metaloproteinases 2 e 9 em ovinos com acidose láctica ruminal aguda**

**Tabela 1:** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das variáveis zimográficas de ovinos com ALRA: Pró MMP- 9 (pró-metaloproteinase 9) e Pro MMP-2 (pro metaloproteinase 2), expressos em unidades arbitrárias. Momentos de colheita: controle, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 2<sup>a</sup> semana, 3<sup>a</sup> semana e 4<sup>a</sup> semana após administração de sacarose via oral.....81

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1 – Considerações Gerais

**Figura 1.** Sequência de alterações químicas e microbianas características da acidose ruminal aguda.....8

### Capítulo 2 - Avaliação clínico laboratorial de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente

**Figura 1.** Análise de regressão dos valores do peso (kg) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (24h), 2 (48h), 3 (72h), 4 (96h), 5 (120h), 6 (144h), 7 (2ª semana), 8 (3ª semana) e 9 (4ª semana). \*:momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.....25

**Figura 2.** Análise de regressão da avaliação clínica de ovinos com ALRA (frequência cardíaca – batimentos por minuto, frequência respiratória – movimentos por minuto, frequência de movimentos ruminais – movimentos a cada dois minutos, temperatura corporal - °C) e o tempo. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (4h), 2 (8h), 3 (12h), 4 (16h), 5 (20h), 6 (24h), 7 (28h), 8 (32h), 9 (36h), 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2ª semana), 16 (3ª semana) e 17 (4ª semana) \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.....27

**Figura 3.** Análise das variáveis hematológicas de ovinos com ALRA [contagens de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e plaquetas (unidades/ $\mu\text{L}$ ); concentração de hemoglobina (g/dL) e volume globular (%) e o tempo. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (24h), 2 (48h), 3 (72h), 4 (96h), 5 (120h), 6 (144h), 7 (2ª semana), 8 (3ª semana) e 9 (4ª semana) \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.....29

**Figura 4.** Análise de regressão das contagens de basófilos, eosinófilos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (24h), 2 (48h), 3 (72h), 4 (96h), 5 (120h), 6 (144h), 7 (2ª semana), 8 (3ª semana) e 9 (4ª semana) \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.....31

**Figura 5.** Análise de regressão dos níveis plasmáticos de glicose (mg/dL) e lactato (mg/dL) de ovinos com ALRA. 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2ª semana), 16 (3ª semana) e 17 (4ª semana) após administração da sacarose via oral. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (4h), 2 (8h), 3 (12h), 4 (16h), 5 (20h), 6 (24h), 7 (28h), 8 (32h), 9 (36h), 9 (36h), 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2ª semana), 16 (3ª semana) e 17 (4ª semana) \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.....33

### Capítulo 3 - Hemogasometria arterial de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente

**Figura 1.** Análise de regressão da hemogasometria arterial de ovinos com ALRA [logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio (pH), pressões parciais de oxigênio -  $pO_2$  e dióxido de carbono -  $pCO_2$  (mmHg); concentrações de bicarbonato -  $HCO_3^-$  e de dióxido de carbono total -  $ctCO_2$  (mMol/L); saturação de oxigênio -  $SO_2$  (%) e excesso de base - EB (mMol/L)] e o tempo. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (2h), 2 (4h), 3 (6h), 4 (8h), 5 (10h), 6 (12h), 7 (16h), 8 (20h), 9 (24h), 10 (28h), 11 (32h), 12 (36h), 13 (48h), 14 (72h), 15 (96h), 16 (120h), 17 (144h), 18 (2ª semana), 19 (3ª semana) e 20 (4ª semana) \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.....48

**Figura 2.** Análise de regressão dos valores do pH urinário ( $-\log [H^+]$ ) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (24h), 2 (48h), 3 (72h), 4 (96h), 5 (120h), 6 (144h), 7 (2ª semana), 8 (3ª semana) e 9 (4ª semana) \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.....49

### Capítulo 4 - Proteinogramas séricos de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente

**Figura 1.** Gráficos resultantes da análise de regressão realizada entre as concentrações séricas da proteína total (PT - g/mL) e das proteínas de fase aguda (mg/dL) de ovinos com ALRA: IgA - imunoglobulina A; ceruloplasmina; transferrina; albumina;  $\alpha 1AT$ ; P46; haptoglobina;  $\alpha 1GA$ ; P36; P31; IgG e Fibrinogênio. IgA – imunoglobulina A;  $\alpha 1AT$  -  $\alpha 1$ -antitripsina;  $\alpha 1AG$  -  $\alpha 1$ -glicoproteína ácida; IgG – imunoglobulina. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (4h), 2 (8h), 3 (12h), 4 (16h), 5 (20h), 6 (24h), 7 (28h), 8 (32h), 9 (36h), 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2ª semana), 16 (3ª semana) e 17 (4ª semana) \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.....64

### Capítulo 5 - Expressão das metaloproteinasas 2 e 9 em ovinos com acidose láctica ruminal aguda

**Figura 1:** Zimograma do soro sanguíneo evidenciando a disposição das bandas da pro-MMP-9, MMP-9, pro-MMP-2 e MMP-2. Coluna A: controle positivo (líquor de cão infectado com o vírus da cinomose), colunas B, C e D (colheitas 15 dias, 7 dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose), coluna E (4 hs), coluna F (8hs), coluna G (12 hs), coluna H (16hs), coluna I (20hs) e coluna J (24hs) após fornecimento da sacarose a um dos animais utilizados no estudo.....80

**Figura 2.** Análise de regressão da expressão (em unidades arbitrárias) da forma pró ativa da MMP 9 de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: 0

(controle), 1 (4h), 2 (8h), 3 (12h), 4 (16h), 5 (20h), 6 (24h), 7 (28h), 8 (32h), 9 (36h), 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2<sup>a</sup> semana), 16 (3<sup>a</sup> semana) e 17 (4<sup>a</sup> semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.....81

**Figura 3.** Análise de regressão da expressão (em unidades arbitrárias) da forma pró ativa da MMP 2 de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (4h), 2 (8h), 3 (12h), 4 (16h), 5 (20h), 6 (24h), 7 (28h), 8 (32h), 9 (36h), 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2<sup>a</sup> semana), 16 (3<sup>a</sup> semana) e 17 (4<sup>a</sup> semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.....82

## ACIDOSE LÁCTICA RUMINAL AGUDA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM OVINOS: ESTUDO CLÍNICO E LABORATORIAL

**RESUMO:** A ovinocultura de corte está em constante ascensão no Brasil e tal fato leva ao aumento do número de animais confinados, visando maior ganho de peso em curto período de tempo. Tal situação predispõe os ovinos a desordens como acidose láctica ruminal aguda (ALRA) e, conseqüentemente, laminite aguda, as quais geram problemas econômicos pelos custos do tratamento, menor produtividade do rebanho e descarte de animais. Dez ovelhas adultas foram induzidas à ALRA através da administração oral de sacarose; posteriormente foram avaliadas quando ao exame físico além das análises hemogasométricas arteriais, hematológicas, avaliação da glicose e lactato plasmáticos, proteinograma sérico e zimografia para detecção das metaloproteinases 2 e 9. Todos os animais tiveram sinais clínicos de ALRA, a frequência respiratória permaneceu elevada até às 36 horas, retornando à normalidade com 48 horas. Cinco animais apresentam sinais clínicos característicos de laminite aguda, porém não foi necessária a realização de tratamento clínico. Os valores da contagem de hemácias, volume globular, hemoglobina, leucócitos totais e neutrófilos bastonetes e segmentados elevaram-se nas 24 horas. Os teores de glicose aumentaram até as 8 horas pelo aumento da síntese dos ácidos graxos voláteis e posterior absorção sanguínea; o lactato apresentou aumento até as 24 horas, com posterior diminuição dos valores. A partir de 4 horas ocorreu elevação do pH, bicarbonato e excesso de base. Após 12 horas, os animais apresentaram acidose metabólica. Com 28 horas houve normalização dos parâmetros hemogasimétricos, sem necessidade de tratamento. No proteinograma sérico foram identificadas 13 proteínas: imunoglobulinas A (IgA) e G (IgG), ceruloplasmina (Cp), transferrina (Tf), albumina (Ab),  $\alpha_1$ -antitripsina ( $\alpha_1$ AT), haptoglobina (Hp),  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida ( $\alpha_1$ GA), 95 (PPM<sub>95</sub>), 46 (PPM<sub>46</sub>), 36 (PPM<sub>36</sub>) e 31 (PMM<sub>31</sub>) kDa proteínas de peso molecular. Em todos os animais com ALRA a proteína total apresentou alterações a partir de 08 horas, coincidindo com os sinais clínicos de desidratação, que ocorreram até 36 horas após a indução. Apesar de cinco animais apresentarem sinais clínicos de laminite aguda somente as formas pró-ativas das MMPs foram expressas nos géis de zimografia, com aumento dos valores ocorrendo principalmente entre 32 e 144 horas.

**Palavras chave:** acidemia, ovelhas, hemogasometria, metaloproteinases, laminite.

## **ACUTE LACTIC RUMINAL ACIDOSIS ACUTE EXPERIMENTALLY INDUCED IN SHEEP: CLINICAL AND LABORATORY STUDY**

**SUMMARY:** the sheep meat industry is constantly rising in Brazil and this fact leads to an increase on the number of confined animals, looking for greater weight gain in short period of time. This situation predisposes to disorders such as acute lactic ruminal acidosis (ARLA) and, consequently, acute laminitis, which causes economic problems by the treatment costs, reduced productivity and disposal of animals. Ten adult sheep were induced to ALRA by oral administration of sucrose; were further evaluated to physical examination, arterial blood gas analysis, hematological parameters, glucose and lactate plasma, serum protein profile and zymography for detection of metalloproteinases 2 and 9. All animals had clinical signs of ARLA, the respiratory rate remained high up to 36 hours, returning to normal in 48 hours. Five animals showed typical clinical signs of acute laminitis, however clinical treatment was not necessary. The values of the red blood cell count, packed cell volume, hemoglobin, total leukocytes and neutrophils and segmented rod rases in 24 hours. Glucose content increased up to eight hours by increasing the synthesis of volatile fatty acids and subsequent blood absorption; lactate has increased to 24 hours, with a subsequent decrease. From four hours there was an increase of pH, bicarbonate and base excess. After 12 hours, the animals had metabolic acidosis. At 28 hours there was normalization of the hemogasometry parameters without need of treatment. In serum protein were identified 13 proteins: immunoglobulins A (IgA) and G (IgG), ceruloplasmin (Cp), transferrin (Tf), albumin (Ab),  $\alpha$ 1-antitrypsin ( $\alpha$ 1AT), haptoglobin (Hp),  $\alpha$ 1-acid glycoprotein ( $\alpha$ 1GA), 95 (MWP95), 46 (MWP46), 36 (MWP36) and 31 (MWP31) kDa molecular weight protein In all animals with ARLA the total protein showed changes from 08 hours, coinciding with clinical signs of dehydration, which occurred up to 36 hours after induction. Although five animals shown clinical signs of acute laminitis only the pro-active forms of MMPs were expressed in the zymography gels, with increased values occurring mainly between 32 and 144 hours.

**Keywords:** acidemia, sheep, blood gases, metalloproteinases, laminitis.

## Capítulo 1 – Considerações gerais

### 1.1 Introdução

Os ovinos foram a segunda espécie animal a ser domesticada pelo homem e a primeira a ser utilizada para fins comerciais (FAO, 2007). Sua criação possibilita alimento, principalmente pelo consumo da carne e do leite, e proteção, pelo uso da lã. A criação ovina está destinada tanto à exploração econômica como à subsistência das famílias de zonas rurais (VIANA, 2008).

A ovinocultura tem maior representatividade nos estados da Bahia, Ceará, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul. A produção anual alcança 11 milhões de toneladas de lã, principalmente no Rio Grande do Sul, com cadeia produtiva formada por 35 mil estabelecimentos agropecuários (FAO, 2007).

Sabe-se que a alimentação é de fundamental importância em qualquer sistema de produção, exercendo influência direta sob a produção animal, mas também em outros fatores como sanidade e capacidade reprodutiva dos animais. Os custos com a mesma podem chegar a 80% do custo total da produção, sendo a média brasileira oscilando entre 50 e 60% (RIBEIRO, 2008). O principal objetivo dos sistemas intensivos de produção animal é de aumentar a qualidade do seu produto final, sendo desenvolvidos diversos programas de incremento à produção como melhoramento genético, manejo dietético além de técnicas reprodutivas que asseguram melhor desempenho (CALDEIRA, 2005).

Diante dessas características são necessários modelos de produção intensivos, com o intuito de se obter em curto prazo metas excessivas de ganho de peso, sendo que os mesmos têm gerado erros na forma de alimentar os ruminantes, acarretando distúrbios digestivos e metabólicos relacionados às diferentes dietas empregadas. Na ovinocultura, a acidose láctica ruminal aguda (ALRA), que ocorre principalmente nos sistemas de criação intensivo e semi-intensivo, tem causado perdas econômicas consideráveis (SIQUEIRA et al., 1993; BARROS; SIMPLÍCIO; FERNANDES, 2007).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo estudar as alterações clínicas, o hemograma, os teores plasmáticos de glicose e lactato, o pH urinário, a hemogasometria arterial, o proteinograma sérico e a expressão das

metaloproteinases 2 e 9 de ovinos submetidos à ALRA induzida por meio da administração oral de sacarose para melhor compreensão dessa enfermidade e suas possíveis consequências.

## 1.2 Revisão de literatura

### 1.2.1 Aspectos gerais sobre fisiologia ruminal e ALRA

O rúmen pode ser definido como uma câmara de fermentação que aproveita substratos, quase sempre de origem vegetal, para produção de diversas substâncias entre elas ácidos orgânicos, metano, dióxido de carbono, amônia e proteína microbiana. Além disso, é um ambiente anaeróbico e constituído por variada microbiota incluindo bactérias, protozoários e fungos. A microbiota presente e os animais apresentam relação simbiótica na qual os microrganismos utilizam os substratos provenientes da alimentação, nesse caso os carboidratos, e culminam com a produção de ácidos graxos orgânicos como os ácidos graxos voláteis (AGVs) e ácido láctico, os quais são utilizados pelo animal e pela microbiota, respectivamente (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

Os principais AGVs produzidos no rúmen são o ácido acético (45-70%), ácido propiônico (15-40%) e ácido butírico (5-20%) (BERGMAN, 1990). Os AGVs não se acumulam facilmente no rúmen devido seu alto pK de 4,9, sendo classificados como ácidos fracos, com menor capacidade de dissociação e absorvidos rapidamente pelo rúmen, diferente do ácido láctico que possui pK menor (3,9), e sendo mais forte, se acumula no órgão (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). Ocorre produção de dois isômeros do ácido láctico o L (+) e o D (-), no entanto, quando ocorre redução do pH ruminal o D lactato é produzido em maior escala (GIESECKE; STANGASSINGER, 1980). Sabe-se que os AGVs possuem dupla ação, pois eles contribuem para a redução do pH, mas também atuam como agentes tamponantes. Isso se deve à capacidade desses ácidos em liberarem prótons, quando se dissociam no ambiente ruminal (GABEL; ASCHENBACH, 2007).

Para que ocorram os processos de celulólise, proteólise e desaminação o pH ruminal considerado ótimo deve se encontrar entre seis e sete (LEWIS; EMERY, 1962; MOULD; ORSKOV; MANNS, 1983). O pH ruminal apresenta flutuações ao longo do dia, dependendo da dieta utilizada, tempo de alimentação com concentrados e suplementação com fontes de fibra. A celulólise é totalmente inibida quando o pH atinge valores abaixo de 6,0 (MOULD, ORSKOV, MANNS; 1983) e a digestibilidade da matéria seca sofre

diminuição quando os valores do pH são baixos. A alimentação dos animais realizada duas vezes ao dia também pode produzir depressão relativamente curta do pH ruminal. Outros fatores como a forma física da dieta, redução no tamanho da partícula de forragem ou processamento de grãos levam à diminuição do pH (KRAUSE et al., 2002).

Em 2002, Kolver e De Veth revisaram 23 estudos em bovinos leiteiros, os quais examinaram o pH do rúmen de vacas em dietas à base de pastagens. O menor pH ruminal foi correlacionado com o maior fluxo de nitrogênio microbiano do rúmen, maiores concentrações de AGVs, aumento do consumo de matéria seca e produção de leite, porém concentrações mais baixas de proteína e gordura no leite. A quantidade de carboidratos fermentescíveis presentes no rúmen ou a digestibilidade do amido podem ser negativamente correlacionados com o pH (YANG et al., 2001; KRAUSE et al., 2002). Alimentos ricos em ácidos pré-formados, como algumas silagens, também levam à redução do pH ruminal (LEAN, 1987).

Os tamponantes ruminais primários são o bicarbonato proveniente da saliva e os AGVs presentes no rúmen. Tampões secundários incluem os tampões de fósforo, por vezes classificados como agentes neutralizantes (COUNOTTE et al., 1979) e tamponantes de carbonato (LEAN, 1987).

No intervalo de pH normal do rúmen, os tampões mais importantes são os originários da saliva, sendo a saliva nos ruminantes produzida através das glândulas parótida, mandibular, sublingual, labial, ventral, bucal, faríngea medial e dorsal (KAY, 1960). A glândula parótida contribui de 40% a 50% do total de saliva produzida por dia (70 e 180 litros em bovinos). A capacidade de um tampão é normalmente influenciada por fatores que alteram a quantidade ou a qualidade da produção de saliva, a concentração de ácidos ruminais e de dióxido de carbono, e a taxa de absorção ou passagem da digesta através do rúmen (LEAN, 1987).

Desequilíbrios no processo de fermentação ruminal prejudicam não só a produtividade como também podem levar a diversas alterações clínicas (RUSSEL; RICHLYK, 2001; NAGARAJA, 2011; JAMI et al., 2013). A ingestão de carboidratos pode levar a alterações no pH ruminal. Nota-se que as reduções prolongadas do pH para valores menores do que 6,0 propiciam o crescimento de bactérias aminolíticas, enquanto que as bactérias celulolíticas e

a digestibilidade são inibidas (KRAJCARSKI-HUNT et al., 2002). Quando o pH ruminal atinge o valor de 5,8 ocorre diminuição da concentração de bicarbonato e os mecanismos de tamponamento constituem ameaças para o animal e microbiota ruminal, levando à proliferação de bactérias utilizadoras de lactato e aumento da produção dos AGVs (BANNINK et al., 2008). Sendo assim, o pH ruminal com valor de 5,8 é o primeiro limiar de vulnerabilidade do epitélio, levando à mudanças na composição microbiana e possibilidade de ocorrência de resposta inflamatória (GOZHO et al., 2005). Se o pH diminuir para valores em torno de 5,0, ocorre morte dos protozoários e crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, principalmente *Streptococcus bovis*, sendo esse considerado o segundo limiar de vulnerabilidade do epitélio ruminal, já que ocorre comprometimento da função de transporte do epitélio (ASCHENBACH; GABEL, 2000).

A acidose ruminal pode ser definida como um distúrbio fermentativo no rúmen associado à ingestão de grande quantidade de carboidratos não estruturados rapidamente fermentáveis. As principais formas clínicas são a acidose láctica ruminal aguda (ALRA), com redução acentuada do pH ( $\text{pH} < 5,0$ ) e a acidose ruminal subaguda (ARSA) caracterizada por episódios transitórios de redução do pH a níveis não tão baixos quanto na forma aguda ( $5,0 < \text{pH} < 5,5$ ) (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007). A ALRA pode ocorrer tanto em ruminantes domésticos como selvagens. Em rebanhos criados em regime intensivo ou semi-intensivo a morbidade pode variar de 2% a 50%, ao passo que a letalidade varia entre 30% e 40% em animais tratados e 90% em animais não tratados (UNDERWOOD, 1992a; RADOSTITIS et al., 2007).

### **1.2.2 Etiopatogenia da ALRA**

A mudança abrupta na alimentação é o principal fator que determina o grau de alteração da fermentação ruminal e potenciais distúrbios digestivos (VAN SOEST, 1994). A ALRA é uma doença típica de manejo alimentar incorreto, sendo notada principalmente quando os animais criados extensivamente passam a receber, em curto período de tempo, dietas ricas em carboidratos sem previa adaptação; além de outros fatores como nos casos em

que animais estão em preparo para exposições e são submetidos a dietas hiperglicídicas; erros no oferecimento de ração proveniente de máquinas distribuidoras mal reguladas. Também pode ocorrer quando os animais possuem livre acesso a depósitos de ração ou baixo oferecimento temporário de fibra dietética (DUNLOP, 1972; HOWARD, 1981; UNDERWOOD, 1992a; RADOSTITS et al, 2007). Outro fator importante é a forma como os grãos são oferecidos. Quando os grãos são finamente moídos, prensados ou quebrados, existe maior exposição dos carboidratos à microbiota ruminal, comparados aos grãos inteiros (RADOSTITS et al, 2007).

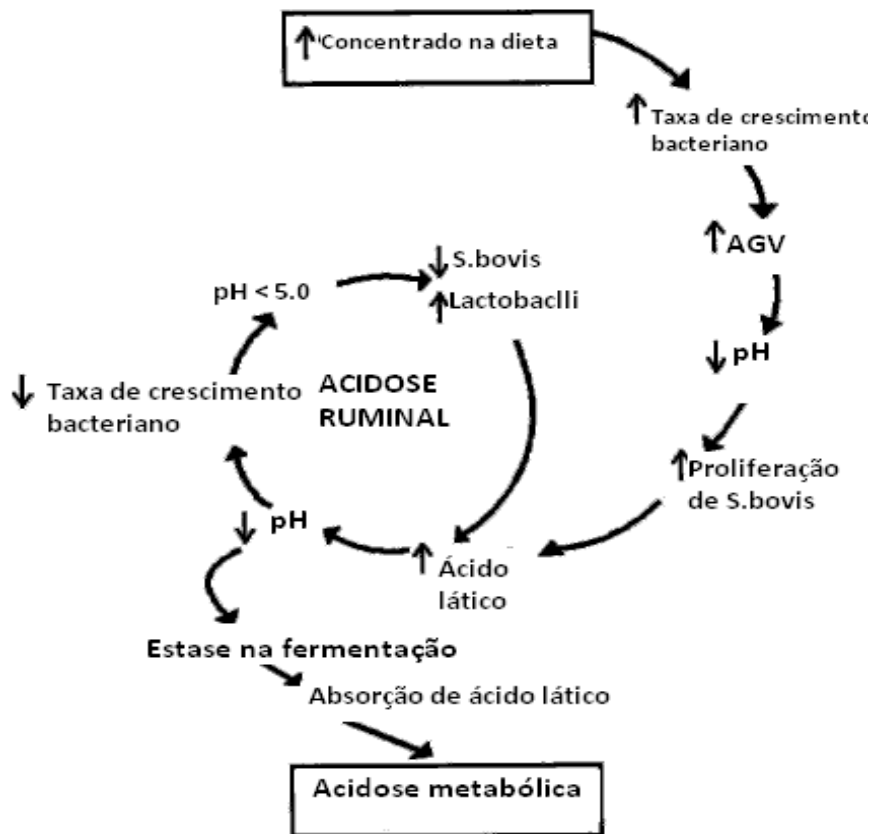
De acordo com Dunlop (1972), fatores ambientais e etológicos podem favorecer a ocorrência de ALRA, como nos casos em que ocorre competição pelo alimento, tal fato notado nos animais mantidos em grupos, como nos confinamentos, do que em animais isolados. Animais hierarquicamente mais fortes ingerem mais concentrado do que os demais e também existem animais que produzem menor quantidade de saliva ou que apresentam maior motilidade gastrointestinal, sendo mais propensos a desenvolver ALRA.

A ALRA é causada por excesso de carboidratos não estruturados e falta de carboidratos estruturados. Ambos, amido e celulose, são polímeros de glicose, sendo que a diferença entre os dois está na conformação da ligação entre os monômeros deste monossacarídeo. No rúmen a fermentação de ambos gera basicamente os mesmos produtos, porém, em proporções e taxas distintas. A maior parte dos monossacarídeos, resultantes da hidrólise dos polissacarídeos, é convertida em piruvato após série de reações. Este pode seguir várias rotas metabólicas para formação de produtos mais oxidados, como acetato e butirato ou mais reduzidos, como propionato e lactato. A proporção em que cada AGV é produzido depende do perfil da microbiota ruminal, que por sua vez, depende principalmente da dieta ingerida (KOZLOSKI, 2011; VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Quando ocorre a ingestão de grande quantidade de carboidratos de forma abrupta, é notável o aumento na produção de AGVs, principalmente o propiônico. O aumento dos AGVs leva à diminuição brusca do pH ruminal para valores abaixo de 5,1, com consequente consumo dos agentes tamponantes ruminais. Nessa faixa de pH, a bactéria *Streptococcus bovis* se desenvolve rapidamente utilizando os carboidratos ingeridos e produzindo grande

quantidade de ácido láctico; além da morte progressiva de bactérias fermentadoras de ácido láctico como *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007a). Paralelamente, há produção e acúmulo de glicose no rúmen, que aumenta a osmolaridade de seu conteúdo prejudicando ainda mais a absorção de AGVs pelo epitélio ruminal (OWENS, 2011). As bactérias que utilizam o ácido láctico estão presentes em pequena quantidade, fato associado ao baixo pKa do ácido láctico, favorecendo o acúmulo do mesmo e acentuando a redução do pH ruminal para valores menores que 5,0. Nesse ambiente ácido os *Lactobacillus sp.* crescem rapidamente e aumentam a produção do ácido láctico (DUNLOP, 1972; NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007).

O excesso de ácido láctico no rúmen, somado ao acúmulo de glicose, aumentam a osmolaridade do conteúdo ruminal, tornando-se maior que a do plasma. Huber (1971) identificou em ovinos com ALRA aumento de 255 mOsm/L, em condições normais, para 402 mOsm/L durante o pico de ALRA. Essa diferença de osmolaridade faz com que quantidades significativas de líquido corporal se desloquem para o rúmen, causando desidratação e consequente hipovolemia (ORTOLANI et al., 2008; ORTOLANI et al., 2010). A osmolaridade ruminal acima de 300 mOsm/L é detectada pela parede do rúmen e retículo e é responsável pela inibição da ingestão alimentar, enquanto valores acima de 350 mOsm/L promovem a inibição da digestão bacteriana da fibra e amido (CARTER; GROVUM, 1990).



**Figura 1** – Sequência de alterações químicas e microbianas características da acidose ruminal aguda. Fonte: Adaptado de Nocek, 2007.

O ácido láctico absorvido será dissociado em lactato e íons  $H^+$ . Este último combina com o bicarbonato existente no organismo a fim de manter a homeostase. Quanto maior for a absorção de íons  $H^+$  do rúmen, maior será o consumo de bicarbonato e, conseqüentemente, menor será o pH sanguíneo resultante, podendo assim se instalar a acidose metabólica (DUNLOP, 1972).

O lactato absorvido no rúmen é metabolizado no fígado, através da oxidação ou da gliconeogênese, utilizando para tal íons  $H^+$  e produzindo indiretamente efeito tampão. Porém, somente o lactato na forma L pode ser reutilizado pelo organismo, enquanto que em condições normais, pequenas quantidades de lactato na forma D conseguem ser desdobradas (HUBER, 1969a; DUNLOP, 1972; NAYLOR; FORSYTH, 1986). Tanto o ácido láctico D quanto o L podem ser absorvidos para a corrente circulatória de acordo com a concentração destes no conteúdo ruminal. O acúmulo da forma D do lactato pode provocar hipotensão arterial (DUNLOP, 1972).

A desidratação pode agravar o quadro de acidose metabólica através da redução da volemia, causada pela perda de fluidos orgânicos para o rúmen. Como resultado da hipovolemia, o organismo passa a diminuir a irrigação renal, levando a queda da taxa de filtração glomerular (HUBER, 1969b). A desidratação severa provoca menor irriga o de tecidos não vitais, como musculatura e tecidos cutâneos. A consequência imediata será a hipóxia desses órgãos induzindo a obten o de energia pela via anaeróbica, o que leva   gera o de mais ácido láctico e aumento da acidose sistêmica. Quanto menor for o pH sanguíneo, maior será a depressão do centro respiratório; sendo que a morte dos animais pode ocorrer por colapso no sistema respiratório (HUBER, 1976; UNDERWOOD, 1992a; RADOSTITIS et al., 2007).

Tanto na forma aguda quanto na forma subaguda da acidose são liberadas no rúmen e absorvidas pelo organismo quantidades variadas de lipopolissacarídeos (LPS), componentes da parede celular de bactérias Gram negativas. Os LPS também são conhecidos como endotoxinas e acredita-se que desempenham papel importante na etiopatogenia da acidose ruminal (NAGARAJA et al., 1978; GOZHO et al., 2005; PLAIZIER et al., 2012). Observa-se nos animais com ALRA desidrata o e acidose metabólica podendo também ocorrer distensão abdominal com presença de líquidos, desidrata o, taquicardia, taquipneia, depressão de estado mental, podendo o animal evoluir para estado comatoso e  bito (DIRKSEN, 2005; RADOSTITS et al., 2007; ORTOLANI et al., 2010). A atonia ruminal ocorre em boa parte dos casos, sendo esta considerada um mecanismo de defesa, pois a ausência de moviment o do órgão diminui a absor o de ácido láctico (HUBER, 1976).

A diarreia   frequente nos animais, porém a frequência de defeca o   episódica e o volume total de fezes eliminado não   grande. A constipa o pode ser observada em animais com intenso quadro de desidrata o (ORTOLANI, 1979). Podem ser observados também rumenite, úlceras gastrointestinais, forma o de abscessos hepáticos, laminite aguda e polioencefalomal cia pela deficiência da vitamina B1, já que ocorre diminui o das bactérias sintetizadores da tiamina e aumento das produtoras de tiaminases (UNDERWOOD, 1992b; VASCONCELOS; GALYEAN, 2008; DANSCHER et al., 2009, ORTOLANI et al., 2010). Os principais sinais nervosos incluem depressão, opistótono, pressão da cabeça contra obstáculos,

rigidez extensora, tremores e fasciculações musculares (UNDERWOOD, 1992b).

A acidose tem sido apontada como causa comum de laminite em ruminantes. As lesões associadas com laminite incluem hemorragia, abscedação solar, úlceras de sola e pinça, lesões da linha branca entre outras (TRANTER; MORRIS, 1991; BERGSTEN, 2000).

A etiologia da laminite foi extensamente pesquisada e revisada no passado (VERMUNT, 1992; OSSENT; LISCHER, 1998; NOCEK, 2007). A laminite aguda ocorre após alteração metabólica, tal como alimentação excessiva através de fonte de carboidrato altamente fermentescíveis, resultando em diminuição do pH ruminal e, posteriormente diminuição do pH sistêmico. No entanto, o pH ruminal pode ter retornado à normalidade quando as lesões da laminite são diagnosticadas pela primeira vez, atraso esse de quatro a oito semanas entre a alteração nutricional e o aparecimento de laminite (NOCEK, 2007).

A redução do pH sistêmico ativa mecanismos vasoativos, levando ao aumento do pulso digital e do fluxo de sangue total (NOCEK, 2007), ocasionando ingurgitamento das veias digitais e dilatação das anastomoses artério venosas do membro inferior, além do desvio de sangue de outros tecidos periféricos (OSSENT; LISCHER, 1998).

As substâncias vasoativas que podem levar a constrição vascular e dilatação incluem histamina, ácido láctico, serotoninas ou endotoxinas (WESTWOOD; LEAN, 2001). Acredita-se que o papel das endotoxinas na laminite se deva aos seus efeitos hemodinâmicos no cório, como lesão endotelial ou à formação desordenada de coágulos, ou ao seu papel como ativador de enzimas degradadoras de colágeno no cório (GREENOUGH, 2007). O aumento da pressão local resulta em danos aos vasos sanguíneos e edema. A isquemia e hiperemia do cório levam à anóxia do tecido, o que pode tornar-se clinicamente evidente de quatro a oito semanas após a lesão inicial (WESTWOOD; LEAN, 2001). O animal pode apresentar claudicação discreta ou severa, ou preferir permanecer em decúbito para evitar o apoio nos dígitos (GREENOUGH, 2007). Durante exame do casco com pinça específica o animal pode apresentar dor evidente durante o pinçamento (DANSCHER et al., 2009).

A acidose ruminal em sua forma subaguda apresenta sinais inespecíficos, tais como episódios esporádicos de diarreia e inapetência, não sugerindo uma causa evidente. Em longo prazo, observa-se que os animais mais sujeitos à ARSA demonstram menor desempenho zootécnico. Além disso, podem ser observadas também lesões na parede ruminal, rumenite e paraqueratose, formação de abscessos hepáticos e maior incidência de lesões digitais relacionadas à laminite (PENNER et al., 2010; BICALHO; OIKONOMOU, 2013; LEAN et al., 2013).

### **1.2.3 Diagnóstico**

Para um correto diagnóstico da ALRA o mesmo deve-se fundamentar na identificação do animal, anamnese, exame físico e exames laboratoriais (DIRKSEN, 2005). Exames complementares e avaliação do ambiente e manejo alimentar, também, podem facilitar o diagnóstico, especialmente quando muitos animais estão acometidos. Na identificação do animal, deve-se lembrar que em algumas fases da produção os animais estão mais propensos a desenvolver acidose ruminal. Sabe-se que em bovinos de aptidão leiteira, o período pós-parto é considerado de maior risco, pois os animais passam de uma dieta de período seco, com nenhum ou menores teores de concentrado, para uma dieta de lactação com maiores teores de concentrado (LEAN, VAN SAUN, DE GARIS; 2013). Para animais de engorda confinados, são considerados períodos de especial risco a entrada dos animais no confinamento, quando muitas vezes a adaptação para nova dieta não é feita de maneira adequada (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007).

Na anamnese deve-se questionar principalmente sobre a fase de produção do animal, a dieta fornecida regularmente e a rotina de manejo alimentar. Deve-se questionar também sobre circunstâncias acidentais como fornecimento de quantidades excessivas de concentrado ou acesso dos animais a depósitos de ração. Os sinais clínicos e achados laboratoriais variam de acordo com a gravidade bem como do tempo transcorrido entre o início do desequilíbrio até o exame. No exame físico do animal com ALRA frequentemente observam-se distensão abdominal do lado esquerdo com predomínio de líquido no rúmen, hipomotilidade ou mesmo atonia ruminal,

desidratação, diarreia, taquicardia e taquipneia. Pode ser observado, também, depressão do estado mental, decúbito e estado comatoso (DIRKSEN, 2005; RADOSTITS et al., 2007).

No hemograma pode ser encontrado aumento no valor do hematócrito, indicando desidratação. O exame de hemogasometria pode indicar acidose metabólica com redução dos valores de pH sanguíneo, bicarbonato e excesso de base (ORTOLANI, MARUTA, MINERVINO; 2008; DANSCHER et al., 2009; ORTOLANI, MARUTA, MINERVINO, 2010).

Nos casos de ARSA o diagnóstico deve envolver avaliação da dieta e manejo alimentar, avaliação de amostra do conteúdo ruminal de número representativo de animais e observação de alta incidência de complicações associadas à acidose como doenças digitais ou abscessos hepáticos observados nos abatedouros (OETZEL, 2004; NORDLUND et al., 2004; VECHIATO, 2009).

### 1.3 Referências

ASCHENBACH, J.R.; GABEL, G. Effect and absorption of histamine in sheep rumen: Significance of acidotic epithelial damage. **Journal of Animal Science**, v.78, p. 464-470, 2000.

BARROS, N. N.; SIMPLÍCIO A. A.; FERNANDES, F. D. Terminação de borregos em confinamento no Nordeste do Brasil. Sobral: **EMBRAPA-CNPC**, 24p. (Circular Técnica, 12), 2007.

BANNINK, A.; FRANCE, J.; LOPEZ, S.; GERRITS, W. J. J.; KEBREAB, E.; TAMMINGA, S.; DIJKSTRA, J. Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. **Animal Feed Science Technology**, v. 143, p. 3-26, 2008.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, v. 10, n. 2, p. 567-589, 1990.

BERGSTEN, C. Laminitis in Practice: Causes, Risk Factors, Treatment and Prevention. **Hoof Health Conference**, Minnesota, 2000.

BICALHO, R. C.; OIKONOMOU, G. Control and prevention of lameness associated with claw lesions in dairy cattle. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 156, n.1-3, p. 96-105, 2013.

CALDEIRA, R. M. Monitorização da adequação do plano alimentar e do estado nutricional em ovelhas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, n. 555-556, p. 125-139, 2005.

CARTER, R. R.; GROVUM, W. L. A review of the physiological significance of hypertonic body fluids on feed intake and ruminal function: salivation, motility and microbes. **Journal Animal Science**, v. 68, p. 11-28, 1990.

COUNOTTE, G. H. M., PRINS, R. A. Role of *Megasphaera elsdenii* in the Fermentation of DL-(2-13C) lactate in the Rumen of Dairy Cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n.4, p. 649-655, 1979.

DANSCHER, A. M.; ENEMARK, J. M. D.; TELEZHENKO, E.; CAPION, N.; EKSTROM, C. T.; THOEFNER, M. B. Oligofrutose overloads induces lameness in cattle. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 92, n. 2, p. 607- 616, 2009.

DIRKSEN, G. Enfermedades de los órganos digestivos y lapared abdominal. In: Dirksen, G.; Gründer, H. D.; Stöber, M. **Medicina Interna y Cirugía del Bovino**. 4. ed. Buenos Aires: Editorial Inter-Médica, cap. 6, p.325-631, 2005.

DUNLOP, R. H. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.16, p. 259-302, 1972.

FAO, 2007. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Estatísticas FAO 2007. **Journal of Animal Science**, v.3, p.67-75. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org). Acesso em: 17/09/2015.

GÄBEL, G.; ASCHENBACH, J. R. SCFA, protons and ruminal epithelium: the good, the bad, the barrier. In: **Furll, M. Production diseases in farm animals**. Leipzig, Germany. Universität Leipzig, p.291-297, 2007.

GIESECKE, D.; STANGASSINGER, M. Lactic acid metabolism. IN: Ruckebusch, Y.; Thivend, P. (Ed.). Digestive physiology and metabolism in ruminants. **AV1 Publising**, p.523-524, 1980.

GOZHO, G. N.; PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; KENNEDY, A. D.; WITTENBERG, K. M. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 4, p. 1399-1403, 2005.

GREENOUGH, P. R. **Bovine Laminitis and Lameness: a Hands on Approach**. St. Louis : Saunders Elsevier, 311p, 2007.

HOWARD, J. L. Ruminal metabolic acidosis. **The Bovine Practitioner**, v. 1, p. 44-53, 1981.

HUBER, T. L. Effect of ration on liver oxidation of racemic lactate and of thiamine on blood lactate clearance. **Journal of Animal Science**, v. 28, p. 82-102, 1969a.

HUBER, T. L. Effect of acute indigestion on comportamental water volumes and osmolality in sheep. **American Journal Veterinary Research**, v.32, n.6, p. 887-890, 1969b.

HUBER, T. L. Physiological effects of acidosis on feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v.43, n.4, p. 902-909, 1971.

HUBER, T. L. Physiological effects of acidosis on feed lot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 902-909, 1976.

JAMI, E.; ISRAEL, A.; KOTSER, A.; MIZRAHI, I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **The ISME Journal**, London, v. 7, n. 6, p. 1069-1079, 2013.

KAY, R. N. B. The rate of flow and composition of various salivary secretions in sheep and calves. **Journal of Physiology**, v.150, p. 515-537, 1960.

KOLVER, E. S.; DE VETH, M. J. Prediction of Ruminant pH from Pasture Based Diets. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 255-1266, 2002.

KOZLOSKI, G. M. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 216p, 2011.

KRAJCARSKI-HUNT, H., PLAIZIER, J.C., WALTON, J.P., SPRATT, R., MCBRIDE, B.W. Effect of subacute ruminal acidosis on in situ fiber digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 85, p. 570–573, 2002.

KRAUSE, K. M.; COMBS, D. K.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows on ruminal pH and chewing activity. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1947 – 1957, 2002.

LEAN, I. **Nutrition of Dairy Cattle**. Sydney, The University of Sydney Post-Graduate Foundation in Veterinary Science, 1987.

LEAN, I. J.; VAN SAUN, R.; DE GARIS, P. Energy and protein nutrition management of transition dairy cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 29, n. 2, p. 337-366, 2013.

LEWIS, T. R.; EMERY, R. S. Relative deamination rates of amino acids by rumen microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p.765-768, 1962.

MOULD, F. L.; ORSKOV, E. R.; MANNING, O. Associative effects of mixed feeds. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, p.15-30, 1983.

NAGARAJA, T. G.; BARTLEY, E. E.; FINA, L. R.; ANTHONY, H. D. Relationship of Gram-negative bacteria and free endotoxin to lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 47, n. 6, p. 1329-1337, 1978.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. E17-E38, 2007.

NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Acidosis in feedlot cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p.333-350, 2007a.

NAGARAJA, T. G. Rumen health. In: Simpósio de Nutrição de Ruminantes – Saúde do Rúmen, 3., 2011, Botucatu. **Anais eletrônicos ...**[CD-ROM], Botucatu: UNESP, 2011.

NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Acidosis in feedlot cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p.333-350, 2007.

NAYLOR, J. M.; FORSYTH, G. W. The alkalinizing effects of metabolizable bases in the healthy calf. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 50, p. 509- 516, 1986.

NOCEK, J. E. Bovine acidosis: implications in laminitis. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v.80, n.5, p.1005-1028, 2007.

NORDLUND, K. V.; COOK, N. B.; OETZEL, G. R. Investigation strategies for laminitis problem hers. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 84, p. 27-35, 2004.

OETZEL, G. R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v.20, n.3, p.651-674, 2004.

ORTOLANI, E. L. **Considerações sobre a acidose láctica ruminal dos bovinos**. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, 18p, 1979.

ORTOLANI, E. L.; MARUTA, C. A.; MINERVINO, A. H. H. Influência da raça sobre volemia e função renal de bovinos com acidose láctica ruminal aguda, induzida experimentalmente. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.45, n.6, p. 451-457, 2008.

ORTOLANI, E. L.; MARUTA, C. A.; MINERVINO, A. H. M. Aspectos clínicos da indução experimental de acidose láctica ruminal em zebuínos e taurinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.47, n.4, p.253-261, 2010.

OSSENT, P.; LISCHER, C. Bovine laminitis: the lesions and their pathogenesis. **In Practice**, London, v.20, p.414-427, 1998.

OWENS, F. N. Clinical and subclinical acidosis. **In: Simpósio de Nutrição de Ruminantes – Saúde do Rúmen**, 3., 2011, Botucatu. Anais eletrônicos...[CD-ROM], Botucatu: UNESP, 2001.

PENNER, G. B.; STEELE, M. A.; ASCHENBACH, J. R.; MCBRIBE, B. W. Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.89, n.4, p.1108-1119, 2010.

PLAIZIER, J. C.; KHAFIPOUR, E.; Li, S.; GOZHO, G. N., KRAUSE, D. O. Subacute ruminal acidosis (ARSA), endotoxins and health consequences. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.172, n.1-2, p.9-21, 2012.

RADOSTITS, O. M; GAY, C. C; HINCHCLIFF, K. W; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine**. 3.ed. St. Louis: Elsevier, 2156p, 2007.

RIBEIRO, M. O. Thyroid Economy – Regulation, Cell Biology, Thyroid Hormone Metabolism and Action: The Special Edition: Metabolic effects of Thyroid Hormones. **Thyroid**, v.18, n.2, p.197-203, 2008.

RUSSEL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, p.1119-1122, 2001.

SIQUEIRA, E. R.; AMARANTE, A. F. T.; FERNANDES, S. Estudo comparativo da recria de cordeiros em confinamento e pastagens. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.5, p.17- 28, 1993.

TRANTER, W. P.; MORRIS, R. S. A case study of lameness in three dairy herds. **New Zealand Veterinary Journal**, v.39, n.2, p.88-96, 1991.

UNDERWOOD, W. J. Rumen lactic acidosis. Part I. Epidemiology and Pathophysiology. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.14, n.8, p.1127-1134, 1992a.

UNDERWOOD, W. J. Rumen lactic acidosis. Part II. Clinical signs, diagnosis, treatment and prevention. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24, n.9, p.1265-1270, 1992b.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, cap.6, p.161-192, 2011.

VAN SOEST, P. J. Nutritional Ecology of the Ruminant. New York, **Cornell University Press**, 1994.

VASCONCELOS, J. T.; GALYEAN, M. L. Contributions in the Journal of Animal Science to understanding metabolic and digestive disorders. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86, n.7, p.1711-1721, 2008.

VECHIATO, T. A. F. Estudo retrospectivo e prospectivo da presença de abscessos hepáticos em bovinos abatidos em um frigorífico paulista. 103 p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

VERMUNT, J. J.; GREENOUGH P. R. Predisposing factors of laminitis in cattle. **British Veterinary Journal**, London, v.150, n.2, p.151-164, 1992.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Porto Alegre, v.4, n.12, 2008. Disponível em: <<http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/panorama%20geral%20o%20vinocultura%20brasil.pdf>>. Acesso em 17/09/2015.

WESTWOOD, C. T.; LEAN. J. Nutrition and lameness in pasture-fed dairy cattle. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.61, p.1-7, 2001.

YANG, W.Z.; BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.391-403, 2001.

## **Capítulo 2 – Avaliação clínico laboratorial de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente**

**Resumo:** este trabalho teve por objetivo verificar as alterações clínicas, do pH urinário, peso, hemograma e níveis plasmáticos de glicose e lactato de ovinos com acidose láctica ruminal aguda (ALRA), induzida experimentalmente. Dez animais adultos receberam 15 gramas/kg de peso corporal de sacarose por via oral, sendo o hemograma, peso e as amostras de urina obtidas nos intervalos: 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas; já as avaliações clínicas e colheita de sangue para mensuração dos teores de glicose e lactato foram realizadas nos intervalos: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120, 144 horas e na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas seguintes. Todos os animais tiveram sinais clínicos de ALRA, sendo o peso apresentando uma diminuição de 6,09% comparando o controle com as 72 horas após indução. Já o pH urinário apresentou-se ácido desde as 24 horas, permanecendo até às 120 horas. Após 04 horas da indução os animais apresentavam timpanismo bilateral, atonia ruminal, porém alertas; as fezes tornaram-se aquosas a partir de 8 horas; retornando a normalidade com 96 horas. A frequência respiratória permaneceu elevada até às 36 horas, como um dos mecanismos de compensação dos valores do pH sanguíneo, retornando à normalidade com 48 horas após indução. Cinco animais apresentam sinais clínicos característicos de laminite aguda, porém não foi necessária a realização de tratamento clínico e a evolução dos mesmos ocorreu sem intercorrências desfavoráveis. Os valores da contagem de hemácias, volume globular, hemoglobina, leucócitos totais e neutrófilos bastonetes e segmentados elevaram-se nas 24 horas após indução. Os teores de glicose aumentaram até as 8 horas pelo provável aumento da síntese dos ácidos graxos voláteis e posterior absorção sanguínea. O lactato apresentou aumento progressivo até as 24 horas, com posterior diminuição dos valores, esse aumento ocorre devido à absorção sanguínea. Nota-se o retorno aos valores normais dos exames laboratoriais para a espécie a partir das 24 horas após indução com melhora da acidemia e recuperação clínica dos animais, sem necessidade de realização de tratamento.

**Palavras chave:** hemograma, exame físico, glicemia, lactato.

## 2.1 Introdução

A ALRA é uma doença metabólica, caracterizada por distúrbio fermentativo que ocorre após ingestão súbita e/ou não adaptada de carboidratos facilmente digeríveis, desencadeando modificações na flora microbiana que comprometem a dinâmica ruminal, frequentemente com reflexo sistêmico de acidose e vários processos secundários que são potencialmente prejudiciais à produção animal (HUNGATE et al., 1952; DUNLOP, 1972; BRAUN et al., 1992; ORTOLANI, 1995; OWENS et al., 1998; DIRKSEN, 2005). Em ovinos os sinais clínicos de acidose resultam em manifestações clínicas que dependendo da sua gravidade podem ser observadas, em intensidade variável, entre elas a diminuição da motilidade ruminal ou atonia, anorexia, apatia, ranger dos dentes, ausência da ruminação, diminuição da produção de leite, elevação das frequências cardíaca e respiratória e diarreia. Timpanismo e febre podem estar presentes em alguns casos (LAL et al., 1991; ANGELOV, 1995; ASLAN et al., 1995; MIRANDA NETO et al., 2011). Laminite, também, pode ser observada, e nos casos superagudos, os animais permanecem em decúbito, podendo ir a óbito devido à severa insuficiência circulatória (HUBER, 1971; CAKALA et al., 1974; DOUGHERTY et al., 1975; MARUTA; ORTOLANI, 2002; MIRANDA NETO et al., 2011).

A ALRA constitui uma forma relativamente comum de acidose metabólica, caracterizada por nível de lactato sanguíneo superior a 5 mmol/L. Esta patologia tem sido ao longo dos anos, objeto de estudo com relação à sua ocorrência, inclusive na forma experimental, quanto à evolução clínica, os achados laboratoriais, aos meios de diagnóstico, ao tratamento, às medidas preventivas e de controle, em relação aos prejuízos que pode acarretar na redução da produção, com gastos em tratamentos e óbito dos animais (PATRA et al. 1995; NOUR et al., 1998; NIKOLOV, 2003; AFONSO et al., 2003).

A observação dos sinais clínicos, análise do fluído ruminal e urina, quando associados ao conhecimento das alterações sanguíneas permitem melhor avaliação do quadro clínico e direcionamento apropriado da terapêutica (PATRA et al., 1993; NIKOLOV, 2003). No entanto, devido aos prejuízos que acarreta, o mais racional é evitar que a enfermidade aconteça (VIEIRA et al., 2006). Com o objetivo de melhor conhecer a dinâmica desta doença na espécie

ovina e suas consequências sobre a saúde animal, foi proposto estudar alguns exames laboratoriais, entre eles o hemograma sanguíneo e os teores plasmáticos de glicose e lactato, além de apresentar as alterações nos valores do peso e sinais clínicos de ovinos submetidos à ALRA induzida experimentalmente.

## 2.2 Material e Métodos

Foram utilizadas dez ovelhas adultas, da raça Santa Inês, híbridas, não prenhes, criadas a campo e alimentadas exclusivamente com gramíneas. Os animais foram alocados em duas baias sob devidas condições de higiene, junto ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Todas as ovelhas foram vermifugadas e mantidas sob dieta basal com feno de capim coast cross (*Cynodon dactylon*) à vontade, o qual atendia às necessidades nutricionais de ovinos em manutenção (SOBRINHO et al., 1996). Também tiveram livre acesso à água potável e mistura mineral apropriada para a manutenção. O período de adaptação teve duração de 30 dias.

No início do período experimental (D {dia} -15, -7 e 0) todos os animais passaram por exame físico, pesagem e obtenção das amostras de urina e sangue para estabelecimento dos valores iniciais (média das três colheitas) dos parâmetros a serem analisados para comparações e análises estatísticas. A sacarose foi administrada na dose de 15 gramas/kg de peso corporal por via oral em dose única, com o auxílio de sonda esofágica, após diluição em água morna, e posterior à sua administração foram realizadas as avaliações das frequências cardíaca, respiratória e de movimentos ruminais, da temperatura corporal (por via retal, com auxílio de termômetro clínico) nos seguintes momentos: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Após a administração da sacarose a pesagem dos animais e a colheita do sangue venoso para realização das análises hematológicas foram feitas nos tempos: 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Já as colheitas de sangue venoso para mensuração da glicose e lactato plasmáticos foram realizadas nos momentos:

4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Posteriormente, as avaliações clínicas, colheita de urina e de sangue venoso foram efetuadas a cada sete dias completando-se o período de 30 dias.

Os animais foram contidos em tronco tombador (Tronco tombador para ovinos e caprinos ITC do Brasil)<sup>1</sup>, em decúbito dorsal, e a obtenção das amostras sanguíneas foi realizada através de punção da veia jugular externa após antissepsia da região, por sistema a vácuo (BD Vacutainer®)<sup>2</sup> com agulhas de colheita múltipla 25 x 8 mm e tubos de plástico estéreis, sendo: um tubo para obtenção de plasma para mensuração de glicose e lactato, contendo o anticoagulante fluoreto de sódio (NaF 6 mg) e ácido etilenodiaminotetracético dissódico (Na<sub>2</sub>EDTA 12 mg), com capacidade de 4 mL; e um tubo para realização do hemograma, com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (K<sub>2</sub>EDTA 7,2 mg) e capacidade de 4 mL. Imediatamente após a colheita, a amostra foi cuidadosamente misturada ao anticoagulante, virando-se o tubo entre as mãos e acondicionada sob refrigeração por no máximo 30 minutos antes da análise. As amostras colhidas nos tubos com fluoreto de sódio tiveram suas frações de plasma separadas por meio de centrifugação a 2.500g por 05 minutos.

As análises laboratoriais foram executadas junto ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV – UNESP Câmpus de Jaboticabal. As contagens de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), plaquetas (unidades/ $\mu\text{L}$ ), volume globular (%) e teores de hemoglobina (g/dL) foram realizadas em analisador hematológico veterinário automático poch-100 iV Diff<sup>3</sup>. A contagem diferencial dos leucócitos (porcentagens de basófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, neutrófilos bastonetes e segmentados) foi feita através dos esfregaços sanguíneos corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa, utilizando-se para tal microscopia de luz em aumento de 100 vezes. Os níveis plasmáticos de glicose e lactato foram mensurados por meio de espectrofotômetro semi-automático modelo LabQuest<sup>4</sup>, com o uso de kits comerciais específicos (Glicose PAP Liquiform e Lactato Liquiform), da mesma marca, ambos pelo método

---

<sup>1</sup> Patina Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, Castro, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> BD Diagnostics – Preanalytical Systems, São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Sysmex Corporation, Kobe, Japan.

<sup>4</sup> Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.

enzimático Trinder. Os animais eram pesados antes do fornecimento do volumoso no período da manhã<sup>5</sup>.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas no tempo, em que o fator testado foi colheita (17 níveis para os parâmetros da avaliação clínica e da glicose e lactato plasmáticos, e 09 níveis para os parâmetros do peso e hematológicos), com os animais constituindo os blocos (10). Também se realizaram análises por regressão (linear, quadrática e cúbica) das variáveis sobre as colheitas. Para tanto, foi utilizado o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS, 2005)<sup>6</sup>. As médias também foram submetidas à análise pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp Câmpus Jaboticabal, sob o Protocolo nº 03888/14.

### **2.3 Resultados**

Com relação ao peso das ovelhas, não foi detectada diferença significativa pela análise de regressão. Porém, pelo Teste de Tukey os seguintes momentos apresentaram diferença significativa em relação ao controle: 48, 72 e 96 horas após indução da ALRA. A representação gráfica da equação se encontra na Figura 1 e os valores das médias, desvios padrão e coeficiente de variação encontram-se na Tabela 1.

---

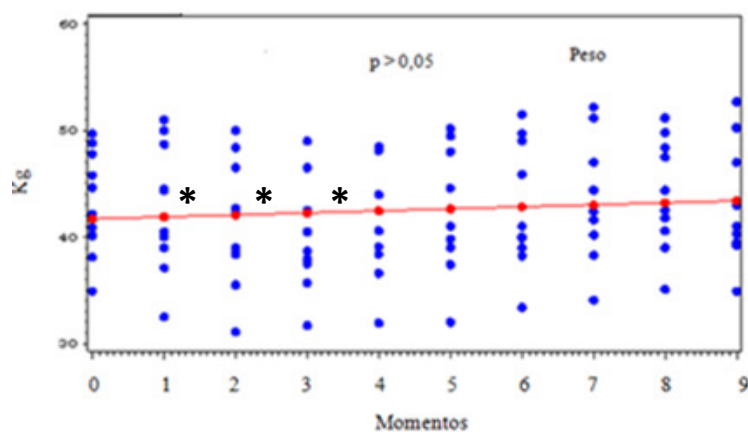
<sup>5</sup> Balança Açores. Modelo 602 SMI.

<sup>6</sup> SAS Institute, Statistics Analysis System: user's guide. Version 9.1.3. Cary (NC). SAS Institute Inc; 2005.

**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) dos valores referentes ao peso (kg) de ovinos submetidos à indução da ALRA. Momentos de colheita: controle\*, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração da sacarose via oral.

	Peso
Controle*	43,30 $\pm$ 1,54
24 h	42,77 $\pm$ 1,90
48 h	41,26 $\pm$ 1,87
72 h	40,66 $\pm$ 1,72
96 h	41,37 $\pm$ 1,77
120 h	42,05 $\pm$ 1,85
144 h	42,76 $\pm$ 1,87
2ª semana	43,48 $\pm$ 1,96
3ª semana	44,03 $\pm$ 1,63
4ª semana	43,81 $\pm$ 1,86
CV	12,97

\*Controle: média das colheitas -15 dias, -7 sete dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose.



**Figura 1.** Análise de regressão dos valores do peso (kg) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (24h), 2 (48h), 3 (72h), 4 (96h), 5 (120h), 6 (144h), 7 (2ª semana), 8 (3ª semana) e 9 (4ª semana). \*:momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

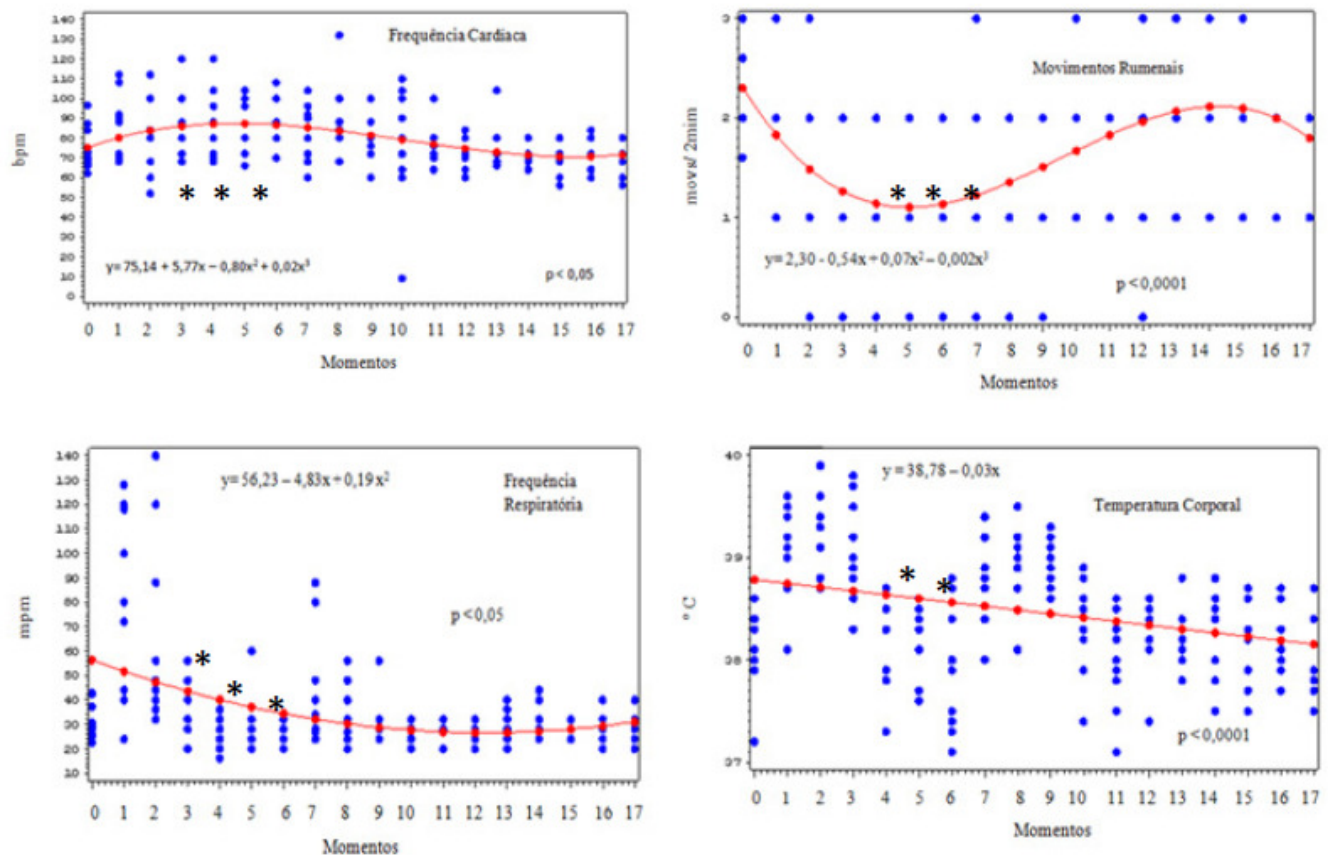
Todas as variáveis clínicas tiveram associação com o tempo. O tempo teve regressão linear significativa ( $p < 0,0001$ ) com a temperatura (valor mais alto da média com 08 horas e mais baixo com 24 horas; no Teste de Tukey as médias obtidas com 16 e 20 horas apresentaram diferença significativa em relação ao controle); quadrática com a frequência respiratória ( $p < 0,05$ ; maior média com 04 horas e menor com 96 horas; diferença observada no Teste de Tukey com 12, 16 e 20 horas) e cúbica ( $p < 0,05$ ) com a frequência cardíaca (maior valor com 16 horas e menor na segunda semana; no Teste de Tukey as

médias obtidas com 12, 16 e 20 horas apresentaram diferença significativa) e os movimentos ruminais (maior média na segunda semana e menor com 20 horas após indução; diferença observada com 16, 20 e 24 horas em relação ao momento controle sob análise do Teste de Tukey). Os parâmetros obtidos com a média, desvio padrão e coeficiente de variação das variáveis clínicas se encontram na Tabela 2. As representações gráficas das equações encontram-se na Figura 2.

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das variáveis clínicas de ovinos submetidos à indução da ALRA: frequência cardíaca – FC (batimentos por minuto), frequência respiratória – FR (movimentos por minuto), temperatura corporal - T ( $^{\circ}$ C) e movimentos ruminais – MR (ciclos/2 minutos). Momentos de colheita: controle (antes da indução da ALRA), 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 2<sup>a</sup> semana, 3<sup>a</sup> semana e 4<sup>a</sup> semana após administração da sacarose via oral.

	FC (bpm)	FR (mpm)	MR (ciclos/2min)	T ( $^{\circ}$ C)
Controle*	73,98 $\pm$ 3,58	30,16 $\pm$ 1,85	2,17 $\pm$ 0,13	37,97 $\pm$ 0,14
04 h	87,60 $\pm$ 4,68	84,60 $\pm$ 12,12	2,10 $\pm$ 0,23	39,13 $\pm$ 0,14
08 h	75,60 $\pm$ 6,12	63,60 $\pm$ 12,29	1,40 $\pm$ 0,30	39,34 $\pm$ 0,12
12 h	83,60 $\pm$ 5,04	36,00 $\pm$ 3,26	1,20 $\pm$ 0,24	39,13 $\pm$ 0,15
16 h	89,00 $\pm$ 5,40	26,40 $\pm$ 2,16	1,30 $\pm$ 0,21	38,19 $\pm$ 0,18
20 h	89,00 $\pm$ 4,68	29,20 $\pm$ 3,67	0,90 $\pm$ 0,27	38,26 $\pm$ 0,11
24 h	88,20 $\pm$ 4,11	26,40 $\pm$ 1,60	1,00 $\pm$ 0,21	37,95 $\pm$ 0,19
28 h	82,20 $\pm$ 4,26	42,50 $\pm$ 7,32	1,30 $\pm$ 0,26	38,82 $\pm$ 0,12
32 h	88,00 $\pm$ 5,99	31,90 $\pm$ 3,96	1,40 $\pm$ 0,26	38,99 $\pm$ 0,11
36 h	84,40 $\pm$ 4,23	32,00 $\pm$ 2,79	1,50 $\pm$ 0,22	38,98 $\pm$ 0,57
48 h	76,10 $\pm$ 9,21	27,20 $\pm$ 1,55	2,00 $\pm$ 0,14	38,40 $\pm$ 0,14
72 h	73,80 $\pm$ 3,28	24,80 $\pm$ 1,66	1,60 $\pm$ 0,16	37,98 $\pm$ 0,14
96 h	70,60 $\pm$ 2,29	24,40 $\pm$ 1,51	1,90 $\pm$ 0,27	38,24 $\pm$ 0,11
120 h	75,00 $\pm$ 3,56	26,80 $\pm$ 2,23	2,10 $\pm$ 0,17	38,29 $\pm$ 0,08
144 h	76,60 $\pm$ 5,07	30,40 $\pm$ 2,08	2,10 $\pm$ 0,23	38,30 $\pm$ 0,12
2 <sup>a</sup> semana	67,20 $\pm$ 2,19	28,00 $\pm$ 1,19	2,20 $\pm$ 0,20	38,11 $\pm$ 0,12
3 <sup>a</sup> semana	72,00 $\pm$ 2,45	32,40 $\pm$ 2,76	1,80 $\pm$ 0,13	38,25 $\pm$ 0,10
4 <sup>a</sup> semana	70,80 $\pm$ 2,98	27,20 $\pm$ 2,51	1,90 $\pm$ 0,10	38,12 $\pm$ 0,16
CV	18,65	55,49	41,12	1,49

\*Controle: média das colheitas 15 dias, 7 dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose.



**Figura 2.** Análise de regressão da avaliação clínica de ovinos com ALRA (frequência cardíaca – batimentos por minuto, frequência respiratória – movimentos por minuto, frequência de movimentos ruminais – movimentos a cada dois minutos, temperatura corporal - °C) e o tempo. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (4h), 2 (8h), 3 (12h), 4 (16h), 5 (20h), 6 (24h), 7 (28h), 8 (32h), 9 (36h), 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2ª semana), 16 (3ª semana) e 17 (4ª semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

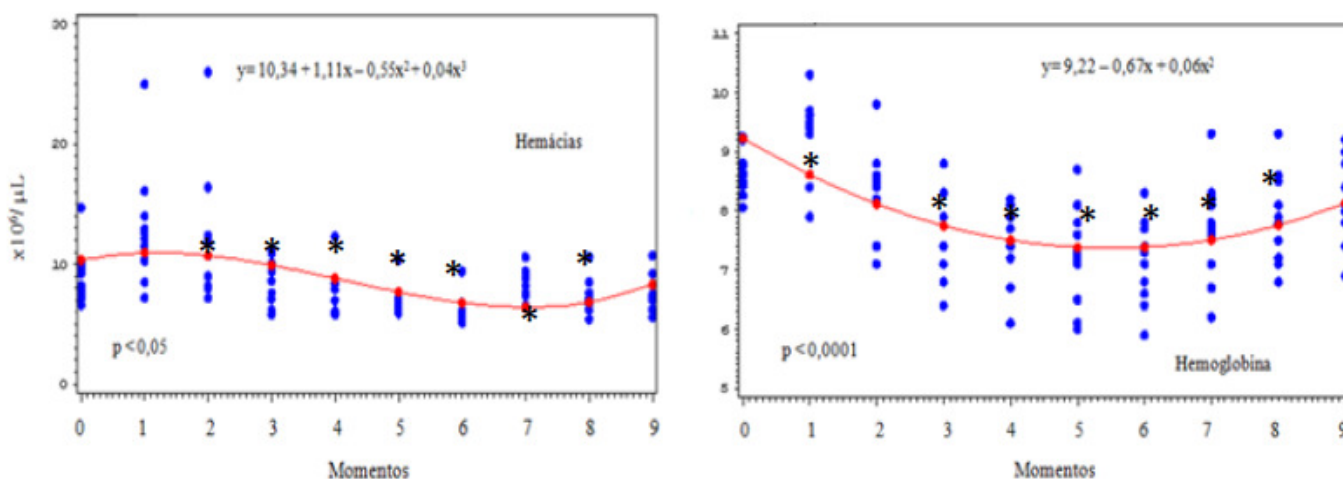
Todas as variáveis do eritrograma apresentaram associação com o tempo. O tempo teve regressão quadrática ( $p < 0,005$ ) com os valores dos leucócitos (apresentando seu valor mais alto com 24 horas e seu valor mais baixo com 144 horas após indução; diferença significativa pelo Teste de Tukey após 24, 72, 96, 120, 144 horas, 2ª, 3ª e 4ª semanas após a indução em comparação ao controle); com a hemoglobina ( $p < 0,0001$ ; pelo Teste de Tukey foi observada diferença significativa com 24, 72, 96, 120, 144 horas, na 2ª e 3ª semana após indução em comparação ao controle) e com o volume globular ( $p < 0,0001$ ; diferença pelo Teste de Tukey nos mesmos momentos observados com os leucócitos). Já com os valores de hemácias ( $p < 0,005$ ; diferença significativa foi observada com 48, 72, 96, 120, 144 horas, 2ª e 3ª semanas

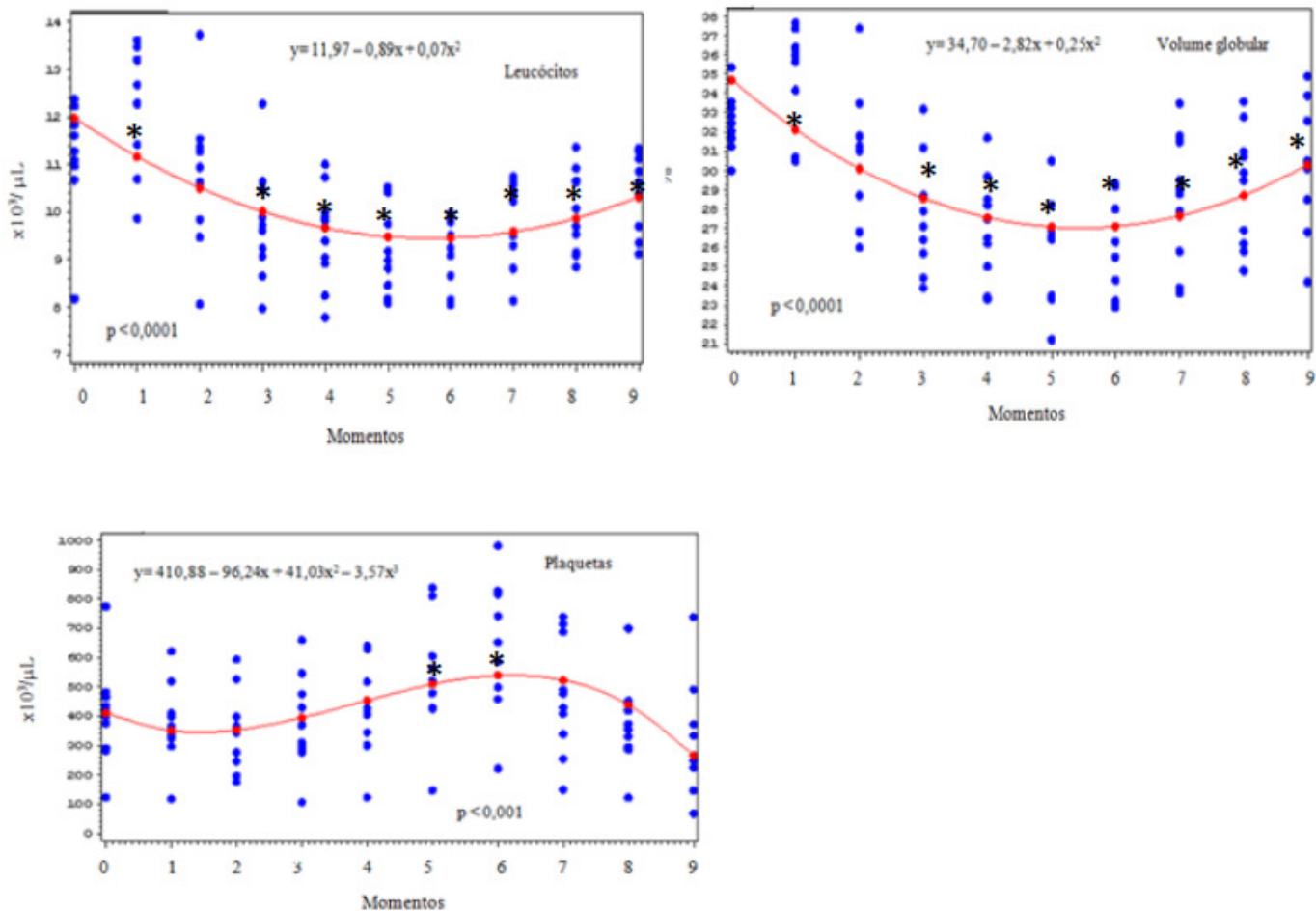
peelo Teste de Tukey em comparação ao controle) e plaquetas ( $p < 0,001$ ; maior valor encontrado com 144 horas e menor na quarta semana após indução; diferença significativa observada com 120 e 144 horas pelo Teste de Tukey) a regressão foi cúbica. Os dados encontrados para as hemácias, volume globular e hemoglobina apresentaram o mesmo comportamento que o obtido com os leucócitos (maior média com 24 horas e menor com 144 horas após indução). Os valores obtidos com a média, desvio padrão e coeficiente de variação das variáveis hematológicas encontram-se na Tabela 3. As representações gráficas das equações dos parâmetros obtidos encontram-se na Figura 3.

**Tabela 3.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das contagens de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), concentração de hemoglobina (g/dL), volume globular (%) e plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: controle\*, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração de sacarose via oral.

	Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Hemoglobina (g/dL)	Volume globular (%)	Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )
Controle*	8,83 $\pm$ 0,73	11,20 $\pm$ 0,37	8,65 $\pm$ 0,11	32,61 $\pm$ 0,46	406,22 $\pm$ 53,39
24 h	13,02 $\pm$ 1,55	12,17 $\pm$ 0,38	9,34 $\pm$ 0,21	35,12 $\pm$ 0,81	373,40 $\pm$ 42,30
48 h	12,17 $\pm$ 1,76	10,81 $\pm$ 0,47	8,38 $\pm$ 0,23	30,77 $\pm$ 1,03	348,60 $\pm$ 42,56
72 h	8,65 $\pm$ 0,60	9,75 $\pm$ 0,37	7,60 $\pm$ 0,24	27,71 $\pm$ 0,91	376,50 $\pm$ 49,84
96 h	7,66 $\pm$ 0,60	9,47 $\pm$ 0,32	7,35 $\pm$ 0,21	27,00 $\pm$ 0,84	409,60 $\pm$ 49,80
120 h	6,93 $\pm$ 0,41	9,28 $\pm$ 0,29	7,24 $\pm$ 0,27	26,53 $\pm$ 0,97	533,70 $\pm$ 62,46
144 h	6,37 $\pm$ 0,38	9,21 $\pm$ 0,22	7,13 $\pm$ 0,22	26,42 $\pm$ 0,77	644,60 $\pm$ 68,66
2ª semana	8,32 $\pm$ 0,42	9,79 $\pm$ 0,27	7,70 $\pm$ 0,27	28,53 $\pm$ 1,04	469,20 $\pm$ 62,60
3ª semana	7,39 $\pm$ 0,44	9,99 $\pm$ 0,27	7,88 $\pm$ 0,24	29,12 $\pm$ 3,04	378,00 $\pm$ 46,93
4ª semana	7,41 $\pm$ 0,47	10,28 $\pm$ 0,28	8,10 $\pm$ 0,23	30,02 $\pm$ 1,02	304,00 $\pm$ 62,01
CV	34,63	10,98	9,89	10,35	41,13

\*Controle: média das colheitas -15 dias, -7 dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose.





**Figura 3.** Análise das variáveis hematológicas de ovinos com ALRA [contagens de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e plaquetas (unidades/ $\mu\text{L}$ ); concentração de hemoglobina (g/dL) e volume globular (%) e o tempo. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (24h), 2 (48h), 3 (72h), 4 (96h), 5 (120h), 6 (144h), 7 (2ª semana), 8 (3ª semana) e 9 (4ª semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

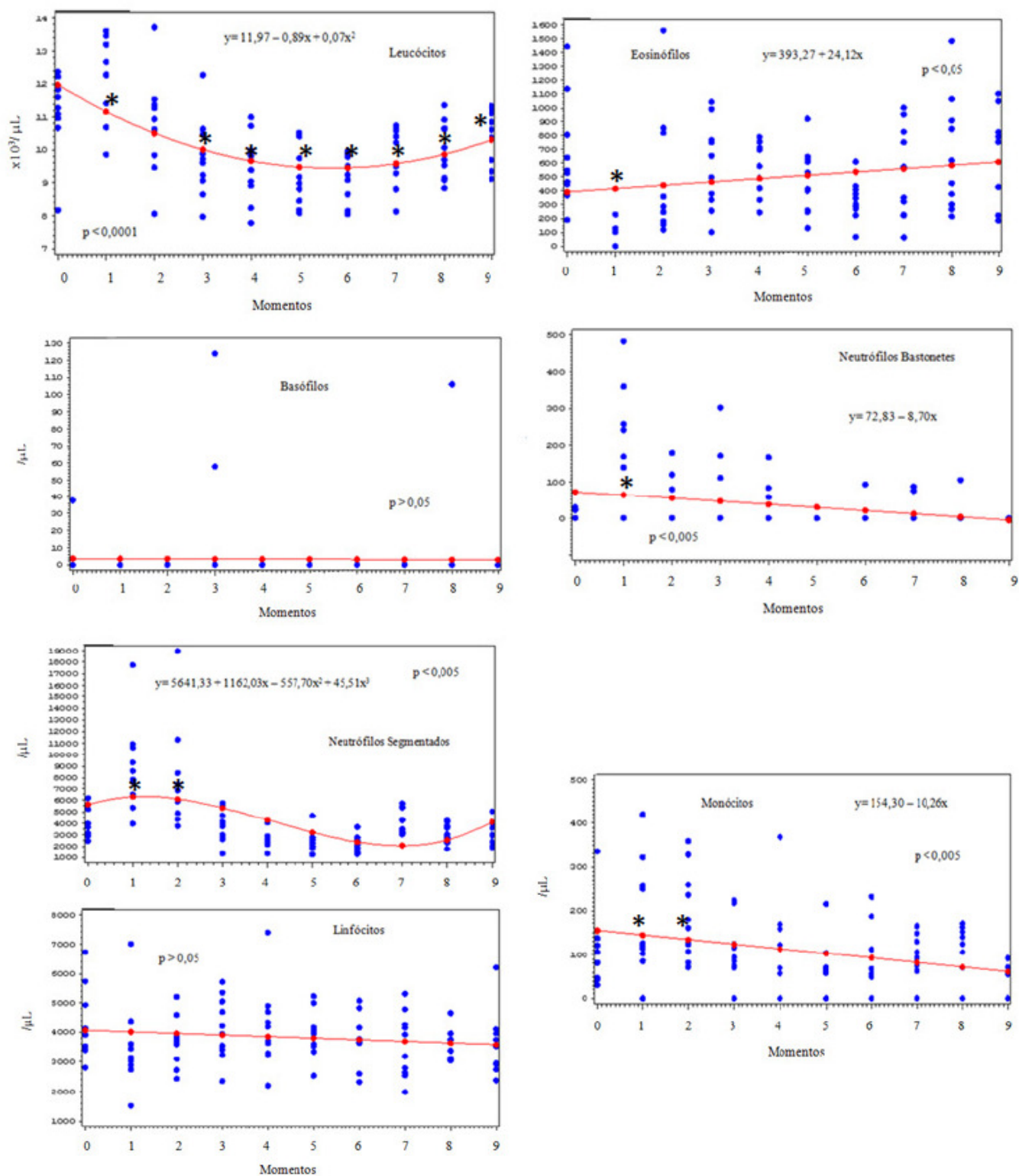
Entre as variáveis do leucograma, os valores de basófilos e linfócitos não apresentaram associação com o tempo ( $p > 0,05$ ). O tempo teve regressão linear ( $p < 0,05$ ) com os valores dos eosinófilos (maior média obtida na quarta semana e menor com 144 horas; diferença significativa com 24 horas pelo Teste de Tukey em comparação ao controle), neutrófilos bastonetes ( $p < 0,005$ ; valor mais alto com 24 horas e mais baixo com 120 horas e na 4ª semana; observada diferença significativa com 24 horas pelo Teste de Tukey) e monócitos ( $p < 0,05$ ; maior média com 48 horas e menor na quarta semana; diferença com 24 e 48 horas em comparação ao controle pelo Teste de Tukey); e regressão cúbica com os neutrófilos segmentados ( $p < 0,005$ ; valor mais alto

com 24 horas e mais baixo com 144 horas; diferença significativa em comparação ao controle obtida em 24 e 48 horas pelo Teste de Tukey). As médias, desvios padrões e coeficientes de variação se encontram na Tabela 4 e as equações obtidas estão representadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das contagens de leucócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos bastonetes - NB, neutrófilos segmentados - NS, linfócitos e monócitos ( $\mu\text{L}$ ) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: controle\*, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração da sacarose via oral.

	Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Basófilos ( $\mu\text{L}$ )	Eosinófilos ( $\mu\text{L}$ )	NB ( $\mu\text{L}$ )	NS ( $\mu\text{L}$ )	Linfócitos ( $\mu\text{L}$ )	Monócitos ( $\mu\text{L}$ )
Controle*	11,20 $\pm$ 0,37	3,76 $\pm$ 3,76	657,99 $\pm$ 111,98	7,33 $\pm$ 3,77	3816,13 $\pm$ 359,51	4251,43 $\pm$ 381,79	103,26 $\pm$ 28,20
24 h	12,17 $\pm$ 0,38	0	588,80 $\pm$ 26,13	165,30 $\pm$ 54,08	8863,10 $\pm$ 1206,84	3610,40 $\pm$ 457,91	180,00 $\pm$ 40,37
48 h	10,81 $\pm$ 0,47	0	475,40 $\pm$ 147,25	38,00 $\pm$ 20,75	7789,70 $\pm$ 1424,02	3676,00 $\pm$ 260,22	190,90 $\pm$ 32,10
72 h	9,75 $\pm$ 0,37	18,20 $\pm$ 13,09	578,20 $\pm$ 99,71	58,70 $\pm$ 33,24	3739,40 $\pm$ 430,61	4154,60 $\pm$ 333,33	100,90 $\pm$ 23,98
96 h	9,47 $\pm$ 0,32	0	544,90 $\pm$ 60,15	31,00 $\pm$ 17,96	2815,80 $\pm$ 264,93	4159,80 $\pm$ 436,40	107,30 $\pm$ 34,25
120 h	9,28 $\pm$ 0,29	0	479,30 $\pm$ 74,47	0	2424,60 $\pm$ 285,43	3949,00 $\pm$ 245,27	77,10 $\pm$ 17,38
144 h	9,21 $\pm$ 0,22	0	333,60 $\pm$ 45,26	9,40 $\pm$ 9,40	2158,40 $\pm$ 220,80	3799,00 $\pm$ 302,67	89,90 $\pm$ 22,02
2ª semana	9,79 $\pm$ 0,27	0	530,00 $\pm$ 106,38	16,40 $\pm$ 10,96	4116,80 $\pm$ 335,82	3558,10 $\pm$ 342,70	96,50 $\pm$ 14,63
3ª semana	9,99 $\pm$ 0,27	10,60 $\pm$ 10,60	655,10 $\pm$ 130,87	10,60 $\pm$ 10,60	3080,00 $\pm$ 261,08	3541,20 $\pm$ 164,68	92,50 $\pm$ 22,09
4ª semana	10,28 $\pm$ 0,28	0	694,90 $\pm$ 99,68	0	3128,10 $\pm$ 325,07	3544,40 $\pm$ 345,50	42,50 $\pm$ 11,92
CV	10,98	540,18	68,00	236,56	60,69	27,62	78,69

\*Controle: média das colheitas -15 dias, -7 sete dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose



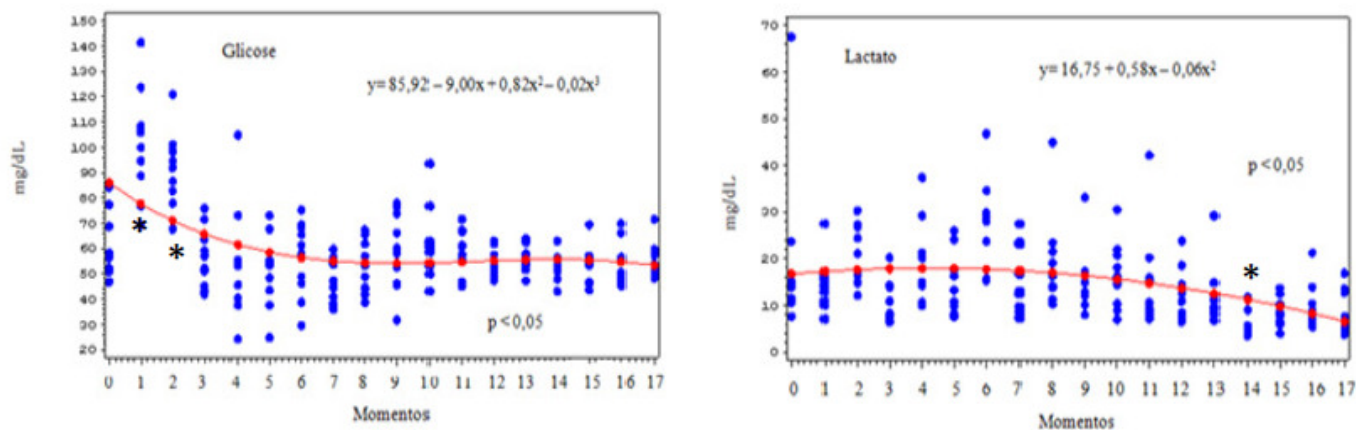
**Figura 4.** Análise de regressão das contagens de basófilos, eosinófilos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (24h), 2 (48h), 3 (72h), 4 (96h), 5 (120h), 6 (144h), 7 (2ª semana), 8 (3ª semana) e 9 (4ª semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O tempo teve regressão quadrática com o lactato ( $p < 0,05$ ; valor mais alto obtido com 24 horas e mais baixo com 144 horas pós indução; diferença significativa obtida com 144 horas em relação ao controle pelo Teste de Tukey) e cúbica com a glicose ( $p < 0,05$ ; maior média com 04 horas e menor com 28 horas após indução; pelo Teste de Tukey foi observada diferença significativa em relação ao controle com 4 e 8 horas após a indução). Os valores obtidos com a média, desvio padrão e coeficiente de variação da glicose e lactato plasmáticos encontram-se na Tabela 5. As representações gráficas das equações dos parâmetros obtidos encontram-se na Figura 5.

**Tabela 5.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) níveis plasmáticos de glicose (mg/dL) e lactato (mg/dL) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: controle\*, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração da sacarose via oral.

	Glicose (mg/dL)	Lactato (mg/dL)
Controle*	63,67 $\pm$ 4,53	18,63 $\pm$ 5,59
04 h	101,54 $\pm$ 6,69	14,08 $\pm$ 1,75
08 h	92,07 $\pm$ 4,61	20,49 $\pm$ 2,00
12 h	56,06 $\pm$ 3,66	10,22 $\pm$ 1,45
16 h	54,34 $\pm$ 6,96	21,62 $\pm$ 3,18
20 h	51,16 $\pm$ 4,40	14,98 $\pm$ 1,99
24 h	56,12 $\pm$ 4,66	26,70 $\pm$ 3,12
28 h	46,81 $\pm$ 2,76	14,93 $\pm$ 2,33
32 h	52,29 $\pm$ 3,23	19,15 $\pm$ 3,15
36 h	58,83 $\pm$ 4,77	15,89 $\pm$ 2,16
48 h	61,43 $\pm$ 4,57	16,35 $\pm$ 2,20
72 h	59,39 $\pm$ 2,68	14,81 $\pm$ 3,30
96 h	54,66 $\pm$ 1,65	11,88 $\pm$ 1,78
120 h	56,11 $\pm$ 1,54	11,70 $\pm$ 2,10
144 h	53,21 $\pm$ 1,68	7,08 $\pm$ 1,07
2ª semana	53,53 $\pm$ 2,29	9,01 $\pm$ 1,00
3ª semana	56,62 $\pm$ 2,77	9,68 $\pm$ 1,48
4ª semana	55,36 $\pm$ 2,15	9,05 $\pm$ 1,44
CV	26,51	56,88

\*Controle: média das colheitas -15 dias, -7 dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose.



**Figura 5.** Análise de regressão dos níveis plasmáticos de glicose (mg/dL) e lactato (mg/dL) de ovinos com ALRA. 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2ª semana), 16 (3ª semana) e 17 (4ª semana) após administração da sacarose via oral. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (4h), 2 (8h), 3 (12h), 4 (16h), 5 (20h), 6 (24h), 7 (28h), 8 (32h), 9 (36h), 9 (36h), 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2ª semana), 16 (3ª semana) e 17 (4ª semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## 2.4 Discussão

Os sinais clínicos observados foram semelhantes aos relatados por autores que provocaram e/ou descreveram o transtorno digestivo com o uso de diversos substratos, tanto em pequenos como em grandes ruminantes. Entretanto, os animais no presente estudo não apresentaram alterações neurológicas e nem óbitos como foi relatado por Nagaraja; Lechtenberg (2007); Commun et al. (2009) e Miranda Neto et al (2011). No início das observações clínicas, os animais apresentavam-se alertos e normoréxicos, porém a partir de 08 horas da indução os mesmos tornaram-se apáticos e hiporéxicos. A ingestão de alimento e o comportamento dos animais se normalizaram transcorridas 12 horas.

Decorridas 04 horas da indução da ALRA, os ovinos apresentavam-se alertas, com distensão abdominal bilateral, timpanismo e atonia ruminal. Inicialmente as fezes apresentavam aspecto de cacho de uva (mal formadas), evoluindo para aquosas a partir de 8 horas. As fezes retornaram o aspecto característico da espécie com 96 horas. Durante a ALRA ocorre aumento do gradiente osmótico ruminal como consequência dos elevados níveis de ácido

lático e AGVs durante o processo de acidose (CAO et al., 1987; UNDERWOOD, 1992a), isso faz com que ocorra migração de líquido intra e extracelular para o trato gastrintestinal causando a distensão abdominal e desidratação, evidenciada neste estudo. Quando o pH do fluido ruminal atinge níveis próximos a 5,0 ocorre progressiva diminuição da frequência e contrações ruminais; relatos também descritos por Juhasz; Szegedi (1968) e Miranda Neto et al., (2011). Nour et al. (1998), comentaram que a motilidade ruminal é inibida por reflexos acarretados pela ativação de receptores epiteliais ácido sensíveis da parede ruminal causada pelos AGVs não dissociados.

Apesar dos valores médios da temperatura corporal apresentarem diferença significativa os mesmos permaneceram na faixa de normalidade da espécie durante o experimento, mesmos resultados obtidos por Tanwar e Maathur (1983) ao induzirem ALRA em caprinos.

Nota-se aumento da frequência respiratória principalmente com 04 e 08 horas pós indução; tal fato se dá como um dos mecanismos que o organismo lança mão para que ocorra aumento do pH sanguíneo devido à queda do mesmo em decorrência do acúmulo de ácido lático na corrente circulatória (REECE, 2006). A frequência cardíaca apresentou valores acima do encontrado no controle até 36 horas após indução, retornando a normalidade com 48 horas. Estes achados corroboram com os relatos de Kezar e Church (1979), Underwood (1992b) e Jani et al. (2001), que descreveram aumento das frequências respiratória e cardíaca na ALRA. De acordo com Radostits et al. (2007), a acidose ativa o sistema nervoso simpático, causando aumento da contratilidade e frequência cardíaca, assim como processos dolorosos e de excitação também são incriminados por este autor como responsáveis pela elevação.

O peso dos animais teve diminuição de 6,09% após 72 horas da indução em comparação ao controle; diminuição essa que se deve provavelmente a perda de fluidos pelas fezes que se tornaram diarreicas, além da apatia e diminuição do apetite. Após 96 horas, notou-se recuperação do peso dos animais voltando aos patamares iniciais partir das 144 horas. Durante as manifestações clínicas de ALRA cinco animais apresentaram alternância dos membros anteriores, relutância em se locomover, permanência em decúbito lateral por tempo prolongado, úngulas sensíveis à palpação e temperatura

aumentada, caracterizando o processo de laminite aguda que se iniciou entre 24 e 28 horas e estendeu-se até 72h. É importante salientar que nenhum animal recebeu tratamento para a laminite, sendo a evolução clínica sem intercorrências desfavoráveis.

A hidratação corporal manteve-se inalterada e/ou não detectável pelo exame físico na maioria dos animais até 12 horas após a indução, porém notou-se que a partir desse intervalo de tempo os animais passaram a apresentar leve desidratação (valores entre 3-5%). A partir de 24 horas, três animais apresentaram-se com desidratação grave (10%), sendo necessária a reposição da volemia com 500 ml de solução fisiológica intravenosa rápida, sendo a mesma realizada após as colheitas de sangue para avaliação dos diversos parâmetros. Após a reposição da volemia os animais apresentaram melhora clínica aparente. As mucosas mantiveram-se normocoradas durante todo o experimento.

A contagem de hemácias, volume globular e hemoglobina elevaram-se nas primeiras 24 horas. Posteriormente esses parâmetros diminuíram, até alcançar os valores considerados normais para a espécie ovina. Sabe-se que na ALRA ocorrem alterações do equilíbrio osmótico ruminal, levando ao influxo de líquidos dos compartimentos intra e extracelular para o interior do órgão acarretando desidratação e conseqüentemente alterações do volume globular (TELLE; PRISTON, 1971). Segundo Jain (1993), o estresse gerado pela acidose metabólica provoca contração esplênica devido à ação da epinefrina, podendo ocorrer hemoconcentração decorrente da quantidade de hemácias lançadas na corrente sanguínea, embora em ruminantes esta ocorrência seja pouco comum. Comportamentos semelhantes foram descritos por Patra et al. (1995) e Braun et al. (1992) em ovinos e, por Angelov et al. (1995) em caprinos com ALRA. O aumento dos valores de hemoglobina também reflete a desidratação sofrida pelos animais. Existem relatos do incremento nos índices da hemoglobina em ruminantes com indigestão aguda, atribuído à diminuição do volume plasmático bem como à contração esplênica. No entanto, Huber (1971), ao induzir acidose ruminal em ovelhas, observou que a diminuição no volume plasmático foi mais expressiva que a elevação do volume globular indicando que o último subestima o grau de desidratação plasmática.

A contagem de leucócitos totais elevou-se significativamente com 24 horas e a partir deste momento ocorreu diminuição gradativa nos valores médios destas células até atingiram valores considerados normais para a espécie. Os valores absolutos dos neutrófilos bastonetes e segmentados também apresentaram a mesma dinâmica que os leucócitos totais, evidenciando mobilização dos mesmos em decorrência da intensidade da inflamação desencadeada na parede ruminal, como consequência do processo de acidose (UNDERWOOD, 1992b). O processo inflamatório e os danos ocorridos à parede ruminal foram descritos por Cao et al. (1987) e corroborados por Gary (2002) e Radostitis et al. (2007), justificando a elevação do número de neutrófilos segmentados, pois o ácido láctico atua como agente irritante no rúmen, lesando o epitélio, e originando a ruminite química e/ou bacteriana. Para Smith (2000), a neutrofilia resultante da inflamação é comumente acompanhada por linfopenia e eosinopenia, refletindo a situação de estresse decorrente deste processo; porém no presente estudo a neutrofilia não foi acompanhada por linfopenia.

Notou-se aumento considerável do valor da glicose até 8 horas após indução, retornando aos valores normais para a espécie após 24 horas. Resultados semelhantes foram observados por Sen et al. (1993) e Angelov et al. (1995), que relataram aumento na concentração de glicose iniciado às 12 horas com posterior redução, tendendo à normalidade. Vihan et al. (1982), associaram esta elevação ao período em que ocorre diminuição do pH do fluido ruminal. De acordo com Patra et al. (1995), a hiperglicemia provavelmente ocorre pelo aumento da taxa de síntese de glicose a partir dos AGVs produzidos no rúmen e posteriormente absorvidos para a circulação sistêmica. Aumentos nos valores da glicose também foram relatados por Nour et al. (1998) e Almeida et al. (2008).

O valor encontrado para o lactato plasmático apresentou sua maior média após 24 horas, retornando aos valores normais com 96 horas. Notou-se a ocorrência de laticemia branda, em virtude da absorção do ácido láctico para a corrente sanguínea devido à sua elevação no rúmen. Essa alteração é característica no processo de ALRA e surge em consequência do desequilíbrio entre produção e consumo por parte das bactérias, pois o ácido láctico no rúmen é apenas um dos produtos intermediários da fermentação bacteriana

Gram positiva (ANGELOV et al., 1995; NOCEK, 1997; NOUR et al., 1998). Posteriormente notou-se diminuição nos valores do lactato, devido à recuperação da flora bacteriana ruminal e consumo do ácido láctico produzido.

## **2.5 Conclusão**

A ALRA induzida nos animais desse estudo causou desidratação, timpanismo, atonia ruminal, diarreia profusa, laminite aguda e aumento dos teores de glicose e lactato sanguíneos.

## 2.6 Referências

AFONSO, J. A. B.; KUCHEMUCK, M. R. G.; FELTRIN, L. P. Z.; LAPOSY, C. B.; KOHAYAGAWA, A.; MENDONÇA, C. L.; TAKAHIRA, R. K. Efeito da monensina sódica sobre as características do suco rumenal na acidose láctica experimental em ovinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, n.5, p.203-210, 2003.

ALMEIDA, M. Z. P. R. B.; MENDONÇA, C. L.; AFONSO, J. A. B.; MIRANDA NETO, E. G. Estudo clínico, hematológico e bioquímico em caprinos submetidos à acidose láctica ruminal induzida experimentalmente. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.1, p.100-113, 2008.

ANGELOV, G.; NIKOLOV, Y; ANGELOV, A. Changes in acidbase variables and some biochemical parameters in caprine acute rumen acidosis. **Veterinarski Arhiv**, v.65, n.2, p.43-48, 1995.

ASLAN, V.; THAMSBORG, S. M.; JORGENSEN, R. J.; BASSE, A. Induced acute ruminal acidosis in goats treated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and bicarbonate. **Acta Veto Scand.**, v.36, p.65-77, 1995.

BRAUN, U.; RIHS, T.; SCHEFER, U. Ruminal lactic acidosis in sheep and goats. **Veterinary Record**, v.130, p.343-349, 1992.

CAKALA, S.; BORKOWSKI, T.; ALBRYCHT, A. Rumen acidosis in sheep induced with different doses of saccharose. **Pol. Arch. Weter**, v.17, p.117-130, 1974.

CAO, G. R.; ENGLISH, P. B.; FILIPPICH, L. J.; ONGLIS, S. Experimentally induced lactic acidosis in the goat. **Australian Veterinary Journal**, v.64, n.12, p.367-370, 1987.

COMMUN, L.; MIALON, M. M.; MARTIN, C.; BAUMONT, R.; VEISSIER, I. Risk of subacute ruminal acidosis in sheep with separate access to forage and concentrate. **Journal of Animal Science**, v.87, p.3372-3379, 2009.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.; STÖBER, M. Medicina interna y cirugía del bovino. 4.ed. Buenos Aires: **Inter-médica**, v.1, 632p, 2005.

DOUGHERTY, R. W.; RILEY, J. L.; COOK, H. M. Changes in motility and pH in the digestive tract of experimentally overfed sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.6, p.827-829, 1975.

DUNLOP, R. H. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.16, p.259-302, 1972.

GARRY, F. B. Diseases of the alimentary tract. In: SMITH, B. P. (Ed.). **Large Animal Internal Medicine**. 3rd ed. Mosby: St. Louis, 722-747, 2002.

HUBER, T. L. Effect of acute indigestion on compartmental water volumes and osmolality in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v.32, n.6, p.887-890, 1971.

HUNGATE, R.E.; DOUGHERTY, R.W.; BRYANT, M.P.; CELLO, R.M. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. **Cornell Veterinary**, v.42, p.423-449, 1952.

JACKSON, P. G. G.; COCKCROFT, P. D. Clinical examination of farm animals. **Malden: Blackwell Science**, 313p, 2002.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. 5. ed., **Philadelphia: Lea & Febiger**, 417p, 1993.

JANI, R.G.; JANI, B.M.; PATEL, P.R. Clinicopathological studies in ruminal acidosis in goats. **Indian J. Veto Med.**, v.21, 105p, 2001.

JUHASZ, B.; SZEGEDI, B. Pathogenesis of rumen overload in sheep. **Acta Veterinary Hungaricae**, v.18, n.1, p.63-80, 1968.

KEZAR, W.W.; CHURCH, D.E. Ruminal changes during the onset and recovery of induced lactic acidosis in sheep. **Journal of Animal Science**, v.49, p.161-167, 1979.

LAL, S.B.; SWARUP, D.; DWIVEDI, S. K.; SHARMA, M. C. Biochemical alterations in serum and cerebro spinal fluid in experimental acidosis in goats. **Research in Veterinary Science.**, v.50, p.208-210, 1991.

MARUTA C. A.; ORTOLANI, E. L. Susceptibilidade de bovinos da raça Jersey e Gir a acidose láctica ruminal: I – Variáveis ruminais e fecais. **Ciência Rural**, v.32, p.55-59, 2002.

MIRANDA NETO, E. G.; AFONSO, J. A. B.; SILVA, S. T. G.; MENDONÇA, C. L. Aspectos clínicos e a bioquímica ruminal de caprinos submetidos à acidose experimental e suplementados ou não com monensina sódica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.5, p.416-424, 2011.

NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Acidosis in feedlot cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.2, n.23, p.333-335, 2007.

NIKOLOV, Y. Biochemical alterations in rumen liquor, blood, cerebrospinal fluid and urine in experimental acute ruminal lactic acidosis in sheep. **Indian Veterinary Journal**., v.80, p.36-39, 2003.

NOCEK, J. E. Bovine Acidosis: Implications on Laminitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, p.1005-1028, 1997.

NOUR, M. S. M.; ABUSAMRA, M. T.; HAGO, B. E. D. Experimental induced acidosis in Nubian goats: Clinical, biochemical and pathological investigations. **Small Ruminant Research**, v.31, 717p, 1998.

ORTOLANI, E. L. Induction of lactic acidosis in cattle with sucrose: relationship between dose, rumen fluid pH and animal size. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 37, n. 5, p.462-464, 1995.

ORTOLANI, E. L. Diagnóstico de doenças nutricionais e metabólicas por meio de exame de urina em ruminantes. p. 91-102. In: González, F. H. D.; Campos, R. (eds.) Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, 1., 2003b, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 102p, 2003a.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. Acidosis in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, p.275-286, 1998.

PATRA, R.C., LAL, S.B., SWARUP, D. Physicochemical alterations in blood, cerebrospinal fluid and urine in experimental lactic acidosis in sheep. **Research in Veterinary Science**. v.54, p.217-220, 1993.

PATRA R.C., LAL S.B., SWARUP D. Biochemical profile of rumen liquor, blood and urine in experimental acidosis in sheep. **Small Ruminant Research**, v.19, p.177-180, 1995.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINDCHCLIFF, K. W. **Veterinary medicine**. 10. ed. London: Saunders, 2065p, 2007.

SAS Institute. **Statistics Analysis System: user's guide**. Version 9.1.3. Cary (NC). SAS Institute Inc., 2005.

SEN, M.M.; MIRSA, S.K.; CHOUDHURI, P.C. Blood biochemical changes in acute experimental ruminal acidosis in barbari goat. **Indian Veterinary Journal**., v.70, p.515-518, 1993.

SMITH, G.S. Neutrophils. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia, Linppiincott Willians & Wilkins, p.281- 296, 2000.

SOBRINHO, A. G. S.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L.; SUSIN, I.; SILVA, J. F. C.; TEIXEIRA, J. C.; BORBA, M. F. S. **Nutrição de ovinos**. 1ª ed. Funep, Jaboticabal, 1996.

TANWAR, R.K.; MATHUR, P.D. Studies on experimental rumen acidosis in goats. **Indian Veterinary Journal.**, v.60, p.499 – 500, 1983.

TELLE, P.P.; PRESTON, R.L Ovine lactic acidosis: Intraruminal and systemic. **Journal of Animal Science**, v.33, p.698-701, 1971.

UNDERWOOD, W.J. Rumen lactic acidosis. Part 1. Epidemiology and pathophysiology. Comp. Cont. Educ.: **Practitioners in Veterinary**, v.14, p.1127-1133, 1992a.

UNDERWOOD, W. J. Rumen lactic acidosis. Part II. Clinical signs, diagnosis, treatment and prevention. **The Compendium – Food Animal**, v.14, n.9, p.1265-1269, 1992b.

VIHAN, V.S.; WANI, G.M.; SAHNI, K.L. Observation on changes in blood serum in experimental rumen acidosis in goats. **Indian Veterinary Journal.**, v.59, p.995-1000, 1982.

### **Capítulo 3 - Hemogasometria arterial de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente**

**Resumo:** estudaram-se as alterações hemogasométricas arterial de ovinos com acidose láctica ruminal aguda (ALRA) induzida experimentalmente. Para tal, dez ovelhas adultas receberam 15 gramas de sacarose por quilograma de peso corporal por via oral. Amostras de sangue arterial foram colhidas por punção da artéria carótida nos seguintes intervalos: controle antes da indução da ALRA e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120, 144 horas após a administração do açúcar via oral e na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas seguintes. A partir de 4 horas da indução ocorreu elevação do pH, bicarbonato e excesso de base. Após 12 horas, os animais apresentaram diminuição dos parâmetros acima citados, caracterizando acidose metabólica. Com 28 horas houve normalização dos parâmetros, exceto do EB que somente retornou a normalidade após 72 horas, porém não houve a necessidade de nenhum tratamento medicamentoso.

**Palavras-chave:** gases sanguíneos, Santa Inês, acidemia

### 3.1 Introdução

O incremento da criação de ovinos nos últimos anos deve-se à grande capacidade de adaptação desses animais às condições ambientais adversas e ao aumento da demanda interna de carne ovina (GONZAGA NETO et al., 2005). Acompanhando a intensificação do sistema de criação de ovinos, que segue os moldes da espécie bovina, surgem problemas semelhantes, sendo que os distúrbios de origem nutricional e metabólica aumentaram nos últimos anos (VIEIRA et al., 2006). Na ovinocultura, a ALRA tem causado perdas econômicas consideráveis (SIQUEIRA et al., 1993; BARROS et al., 1997). Esta enfermidade, resultante da ingestão rápida e excessiva de carboidratos facilmente fermentescíveis, pode provocar nos animais inapetência temporária até alterações gastrointestinais graves com comprometimento do estado geral (DIRKSEN et al., 2005). A avaliação do equilíbrio ácido-base pode fornecer informações fundamentais para o diagnóstico e prognóstico de várias enfermidades. Dentre as disfunções do equilíbrio ácido-base, a mais comumente constatada é a acidose metabólica (KANEKO et al., 1997; MARUTA e ORTOLANI, 2002). A hemogasometria pode ser realizada tanto em sangue venoso quanto em arterial; entretanto, o sangue arterial é preferido devido à maior oxigenação, e, pelo fato de que os resultados hemogasométricos não são alterados em casos de estase do fluxo sanguíneo, em distúrbios respiratórios primários ou em pacientes mantidos sob anestesia geral (DIBARTOLA, 1992; KANEKO et al., 1997). Apesar do grande número de trabalhos realizados com bovinos, são poucos os estudos com a espécie ovina, além de que a comparação entre bovinos e ovinos pode ser falha já que, mesmo entre as raças bovinas, existem diferenças nos efeitos da ALRA e da acidose metabólica (MARUTA e ORTOLANI, 2002b; ORTOLANI et al., 2010). Considerando-se o crescente impacto econômico da ovinocultura de corte no Brasil, com conseqüente aumento do número de animais confinados e, desta forma, susceptíveis a diversas desordens, este estudo teve como objetivo principal avaliar o equilíbrio ácido base de ovinos com ALRA induzida experimentalmente por meio de análise hemogasométrica.

### 3.2 Material e Métodos

Dez ovelhas adultas, da raça Santa Inês, híginas, não prenhes, criadas a campo e alimentadas exclusivamente com gramíneas foram alocadas em duas baias sob devidas condições de higiene, junto ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Todas as ovelhas foram vermifugadas e mantidas sob dieta basal com feno de capim coast cross (*Cynodon dactylon*) à vontade, a qual atendia às necessidades nutricionais de ovinos em manutenção (SOBRINHO et al., 1996). Também tiveram livre acesso à água potável e mistura mineral apropriada para a manutenção. O período de adaptação teve duração de 30 dias.

No início do período experimental (D {dia} -15, -7 e 0) amostras de sangue e urina foram colhidas de todos os animais para estabelecimento dos valores iniciais das variáveis hemogasométricas e do pH urinário (média das três colheitas) para estabelecimento dos valores iniciais dos parâmetros a serem analisados para comparações e análises estatísticas. A sacarose foi administrada na dose de 15 gramas/kg de peso corporal por via oral em dose única, com o auxílio de sonda esofágica, após diluição em água morna.

Após administração da sacarose, as colheitas de sangue arterial para realização dos exames hemogasométricos foram realizadas nos seguintes momentos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Já a colheita de urina feita nos tempos: 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Posteriormente, as colheitas de sangue arterial e de urina foram realizadas semanalmente até completar 30 dias.

As colheitas das amostras de sangue foram feitas com os animais contidos em tronco tombador (Tronco tombador para ovinos e caprinos ITC do Brasil)<sup>7</sup>, em decúbito dorsal, mediante punção da artéria carótida e/ou artéria auricular. Para tal, utilizaram-se agulhas hipodérmicas descartáveis 25 x 7 mm ou 25 x 8 mm acopladas em seringas de 3 mL, específicas para hemogasometria, contendo o anticoagulante heparina de lítio com cálcio balanceado (BD Preset®)<sup>8</sup>. As colheitas foram realizadas com o devido cuidado

---

<sup>7</sup> Patina Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, Castro, Paraná, Brasil.

<sup>8</sup> BD Diagnostics – Preanalytical Systems, São Paulo, São Paulo, Brasil.

para evitar a formação de bolhas de ar e a vedação da seringa foi feita imediatamente com tampa específica (BD Hemogard)<sup>9</sup> evitando-se a entrada ou saída de gases, conforme recomendaram Sucupira e Ortolani, 2003 e Leal et al., 2006. Imediatamente após a colheita, cada amostra foi cuidadosamente homogeneizada com o anticoagulante, virando-se a seringa entre as mãos, e, acondicionada sob refrigeração por no máximo 30 minutos antes das análises. A análise hemogasimétrica foi realizada em aparelho Roche Omni C<sup>9</sup>, obtendo-se assim o valor do pH, das pressões parciais de oxigênio (pO<sub>2</sub>) (mmHg) e dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>) (mmHg), saturação de oxigênio (SO<sub>2</sub>) (%), concentração de bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (mMol/L), excesso de base (EB) (mMol/L) e a concentração de dióxido de carbono total (ctCO<sub>2</sub>) (mMol/L).

As amostras de urina foram colhidas em copos estéreis com tampa, com capacidade de 80 mL, após micção espontânea ou através de massagem suave na região perineal e vulvar do animal sendo os primeiros jatos desprezados, diminuindo-se a contaminação por bactérias do trato urinário inferior (ORTOLANI, 2003a). Quando a massagem não era suficiente, os animais tiveram sua respiração restrita brevemente, por no máximo 30 segundos (JACKSON; COCKCROFT, 2002; ORTOLANI, 2003a). A primeira colheita diária foi realizada antes do fornecimento do feno. O pH urinário foi mensurado por meio de pHmetro digital Digimed DM20<sup>10</sup>, imediatamente após as colheitas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas no tempo, em que o fator testado foi colheita (20 níveis para as variáveis hemogasométricas e 09 níveis para o pH urinário), com os animais constituindo os blocos (10). Também se realizaram análises por regressão (linear, quadrática e cúbica) das variáveis sobre as colheitas. Para tanto, foi utilizado o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS, 2005)<sup>11</sup>. As médias também foram submetidas à análise pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

---

<sup>9</sup> Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany.

<sup>10</sup> Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>11</sup> SAS Institute, Statistics Analysis System: user's guide. Version 9.1.3. Cary (NC). SAS Institute Inc; 2005.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp Câmpus Jaboticabal, sob o Protocolo nº 03888/14.

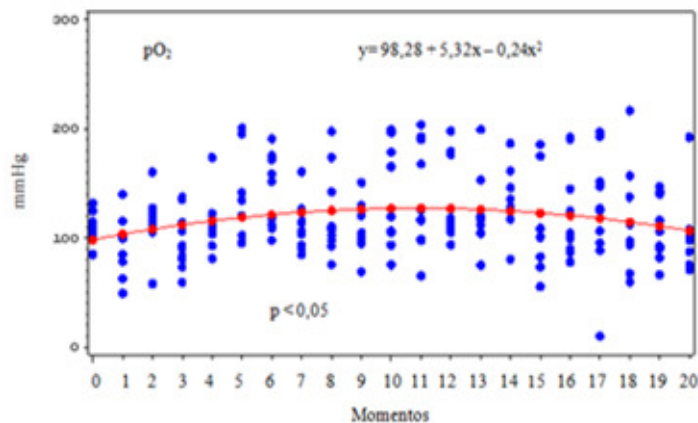
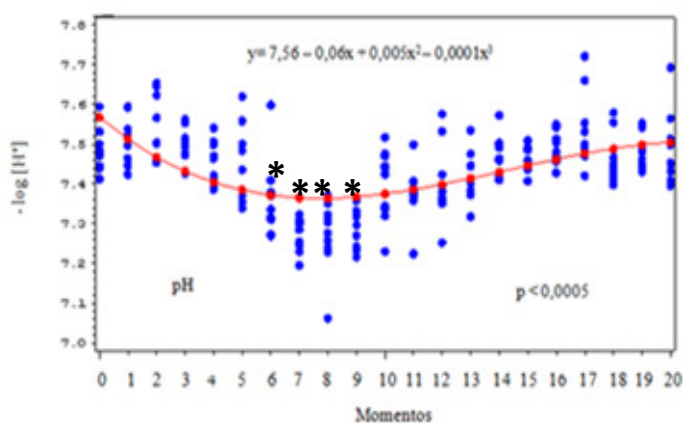
### 3.3 Resultados

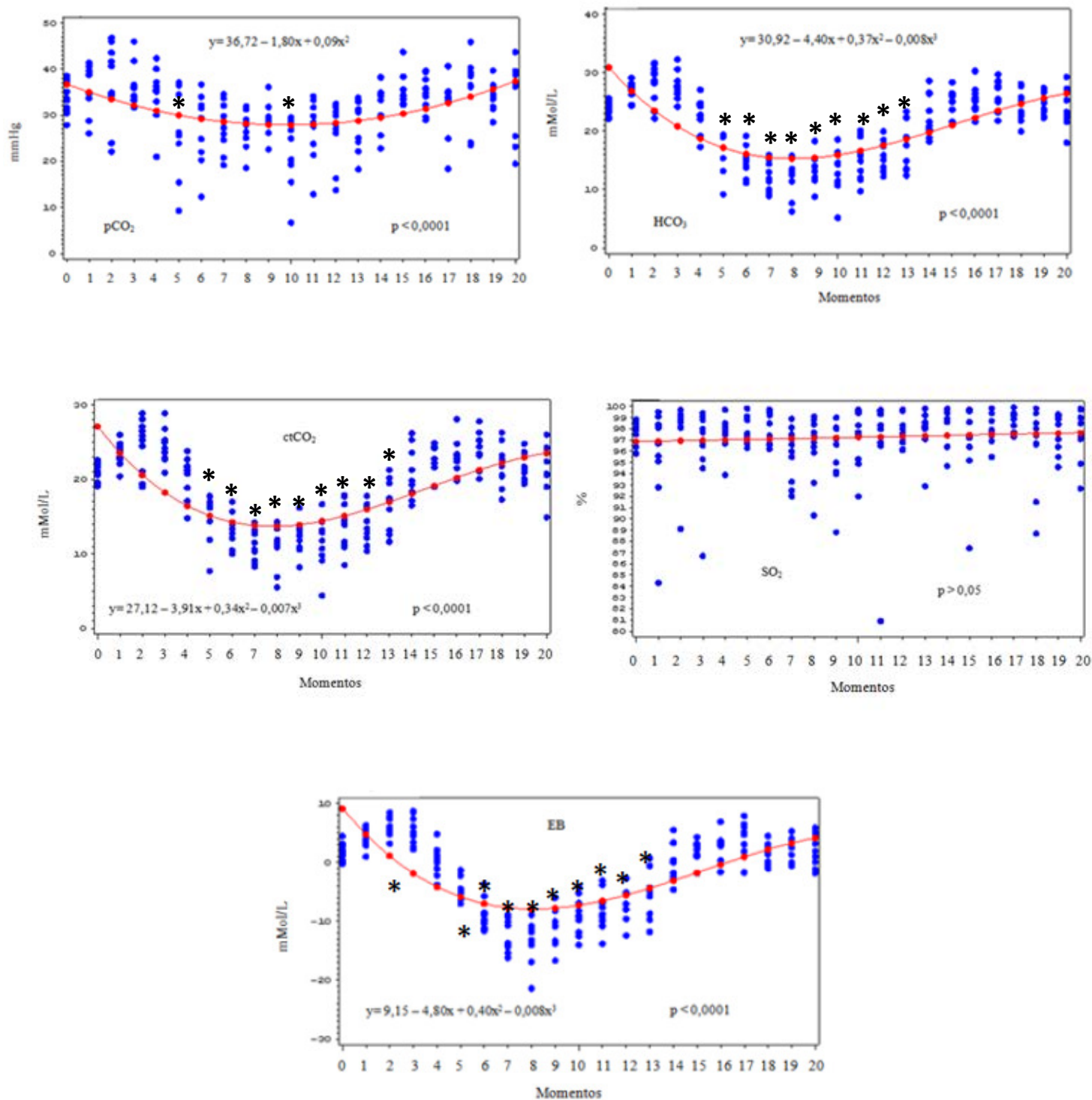
Dentre as variáveis hemogasométricas, somente a  $SO_2$  não apresentou associação com o tempo ( $p > 0,05$ ). O tempo teve regressão quadrática com os valores da  $pO_2$  ( $p < 0,0001$ ; apresentando o menor e o maior valor com 2 e 12 horas após indução, respectivamente) e da  $pCO_2$  ( $p < 0,0001$ ; valor mais baixo às 28 horas após indução e maior valor com 6 horas após indução; diferença significativa observada pelo Teste de Tukey com 10 e 18 horas após indução em relação ao controle); regressão cúbica com os valores do pH ( $p < 0,0005$ ; notou-se aumento significativo às 4 horas após indução, seguido por diminuição contínua, até alcançar seu menor valor com 16 horas após indução; observou-se diferença significativa com 12, 16, 20 e 24 horas após indução pelo Teste de Tukey em relação ao controle), da concentração de  $HCO_3$  ( $p < 0,0001$ ), da concentração de  $ctCO_2$  ( $p < 0,0001$ ; tanto do  $HCO_3$  quanto do  $ctCO_2$  diferença significativa foi observada com 10 e 48 horas em relação ao controle com o Teste de Tukey) e do EB ( $p < 0,0001$ ; diferença significativa foi observada com 4, 10 e 48 horas em relação ao controle com o Teste de Tukey). Os dados encontrados para as concentrações de  $HCO_3$ ,  $ctCO_2$  e EB apresentaram comportamento semelhante (maior valor com 4 horas, e, menor valor com 20 horas após indução). O tempo apresentou regressão cúbica com o pH urinário ( $p < 0,0001$ ; maior média obtida na terceira semana e menor média com 24 horas; pelo Teste de Tukey foi observada diferença significativa com 48, 72, 96 e 120 horas após a indução em relação ao controle). A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) dos valores hemogasométricos e as representações gráficas das análises de regressão estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 1, respectivamente. Os valores obtidos das médias, do desvio padrão e do coeficiente de variação do pH urinário encontram-se na Tabela 2 e o gráfico referente à análise de regressão encontra-se na Figura 2.

**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) da hemogasometria arterial de ovinos com ALRA: logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio (pH); pressões parciais de oxigênio - pO<sub>2</sub> e dióxido de carbono - pCO<sub>2</sub> (mmHg); concentrações de bicarbonato - HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e de dióxido de carbono total - ctCO<sub>2</sub> (mmol/L); saturação de oxigênio - SO<sub>2</sub> (%) e excesso de base - EB (mmol/L). Momentos de colheita: controle\*, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração de sacarose via oral.

	pH	pO <sub>2</sub> (mmHg)	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	ctCO <sub>2</sub> (mmol/L)	SO <sub>2</sub> (%)	EB (mmol/L)
Controle*	7,48 $\pm$ 0,01	109,45 $\pm$ 5,08	33,71 $\pm$ 1,13	23,94 $\pm$ 0,35	21,03 $\pm$ 0,34	97,72 $\pm$ 0,30	1,57 $\pm$ 0,49
02 h	7,50 $\pm$ 0,01	92,06 $\pm$ 8,23	35,77 $\pm$ 1,62	26,95 $\pm$ 0,47	23,38 $\pm$ 0,49	95,65 $\pm$ 1,41	4,53 $\pm$ 0,54
04 h	7,53 $\pm$ 0,02	114,57 $\pm$ 7,97	35,62 $\pm$ 3,09	28,19 $\pm$ 1,06	24,58 $\pm$ 1,12	97,87 $\pm$ 0,98	6,46 $\pm$ 0,52
06 h	7,50 $\pm$ 0,01	97,32 $\pm$ 8,12	36,31 $\pm$ 1,38	27,64 $\pm$ 0,75	24,40 $\pm$ 0,71	96,28 $\pm$ 1,17	5,33 $\pm$ 0,72
08 h	7,45 $\pm$ 0,01	112,49 $\pm$ 7,67	34,59 $\pm$ 1,85	22,93 $\pm$ 0,91	20,39 $\pm$ 0,85	97,64 $\pm$ 0,48	0,27 $\pm$ 0,77
10 h	7,46 $\pm$ 0,02	127,84 $\pm$ 12,89	26,01 $\pm$ 2,79	17,18 $\pm$ 1,10	15,17 $\pm$ 0,99	98,00 $\pm$ 0,40	-4,00 $\pm$ 0,71
12 h	7,35 $\pm$ 0,03	140,29 $\pm$ 10,47	27,49 $\pm$ 2,36	14,36 $\pm$ 0,82	12,89 $\pm$ 0,74	98,00 $\pm$ 0,42	-8,77 $\pm$ 0,82
16 h	7,27 $\pm$ 0,01	108,76 $\pm$ 7,07	28,03 $\pm$ 1,69	12,60 $\pm$ 0,83	11,25 $\pm$ 0,70	95,75 $\pm$ 0,75	-12,19 $\pm$ 0,88
20 h	7,27 $\pm$ 0,02	120,94 $\pm$ 12,14	27,04 $\pm$ 1,25	12,37 $\pm$ 1,01	11,12 $\pm$ 0,91	96,40 $\pm$ 0,86	-12,40 $\pm$ 1,33
24 h	7,29 $\pm$ 0,01	112,11 $\pm$ 7,36	28,89 $\pm$ 1,10	13,62 $\pm$ 0,79	12,28 $\pm$ 0,67	95,89 $\pm$ 0,96	-10,85 $\pm$ 0,99
28 h	7,40 $\pm$ 0,02	134,59 $\pm$ 14,45	22,05 $\pm$ 2,26	12,94 $\pm$ 1,16	11,59 $\pm$ 1,06	97,41 $\pm$ 0,81	-9,08 $\pm$ 0,99
32 h	7,37 $\pm$ 0,02	137,61 $\pm$ 15,05	27,08 $\pm$ 2,00	15,24 $\pm$ 1,14	13,72 $\pm$ 0,99	96,67 $\pm$ 1,78	-7,78 $\pm$ 1,09
36 h	7,40 $\pm$ 0,02	131,02 $\pm$ 11,99	26,80 $\pm$ 2,08	15,70 $\pm$ 0,83	14,12 $\pm$ 0,80	97,89 $\pm$ 0,44	-6,66 $\pm$ 0,86
48 h	7,41 $\pm$ 0,01	121,67 $\pm$ 10,54	28,54 $\pm$ 1,77	17,78 $\pm$ 1,29	16,09 $\pm$ 1,15	97,73 $\pm$ 0,59	-5,03 $\pm$ 1,31
72 h	7,46 $\pm$ 0,01	127,83 $\pm$ 10,40	32,63 $\pm$ 1,60	22,85 $\pm$ 1,10	20,88 $\pm$ 1,04	98,34 $\pm$ 0,49	0,13 $\pm$ 1,00
96 h	7,46 $\pm$ 0,01	111,71 $\pm$ 18,97	35,78 $\pm$ 1,53	24,98 $\pm$ 0,84	22,72 $\pm$ 0,77	96,30 $\pm$ 1,61	1,85 $\pm$ 0,75
120 h	7,48 $\pm$ 0,01	121,31 $\pm$ 13,12	34,83 $\pm$ 1,17	25,51 $\pm$ 0,72	23,21 $\pm$ 0,68	98,06 $\pm$ 0,43	2,77 $\pm$ 0,69
144 h	7,53 $\pm$ 0,02	124,13 $\pm$ 17,25	33,07 $\pm$ 2,12	26,59 $\pm$ 0,82	24,22 $\pm$ 0,73	98,77 $\pm$ 0,30	4,48 $\pm$ 0,87
2ª semana	7,45 $\pm$ 0,01	114,99 $\pm$ 14,57	36,18 $\pm$ 2,22	24,27 $\pm$ 0,80	21,89 $\pm$ 0,87	96,60 $\pm$ 1,15	1,34 $\pm$ 0,57
3ª semana	7,47 $\pm$ 0,01	109,89 $\pm$ 8,73	33,93 $\pm$ 0,96	24,26 $\pm$ 0,57	21,65 $\pm$ 0,57	97,69 $\pm$ 0,53	1,70 $\pm$ 0,64
4ª semana	7,48 $\pm$ 0,02	103,84 $\pm$ 10,57	33,74 $\pm$ 2,53	23,97 $\pm$ 1,03	21,19 $\pm$ 1,01	97,42 $\pm$ 0,69	1,71 $\pm$ 0,92
CV	1,13	30,03	20,70	20,84	21,35	2,83	-206,14

\*Controle: média das colheitas -15 dias, -7 dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose



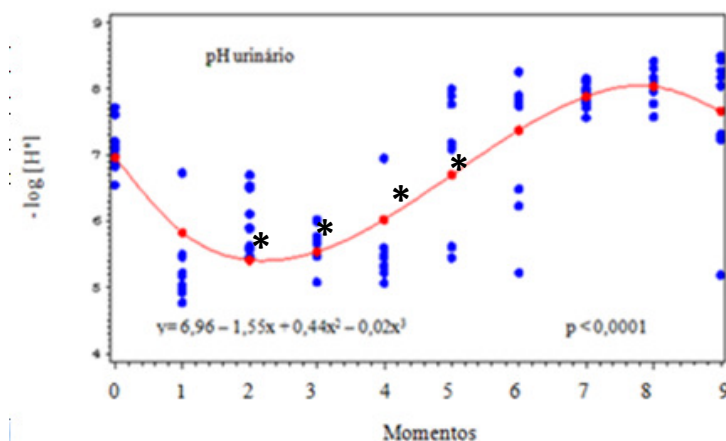


**Figura 1.** Análise de regressão da hemogasmetria arterial de ovinos com ALRA [logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio (pH), pressões parciais de oxigênio - pO<sub>2</sub> e dióxido de carbono - pCO<sub>2</sub> (mmHg); concentrações de bicarbonato - HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e de dióxido de carbono total - ctCO<sub>2</sub> (mMol/L); saturação de oxigênio - SO<sub>2</sub> (%) e excesso de base - EB (mMol/L)] e o tempo. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (2h), 2 (4h), 3 (6h), 4 (8h), 5 (10h), 6 (12h), 7 (16h), 8 (20h), 9 (24h), 10 (28h), 11 (32h), 12 (36h), 13 (48h), 14 (72h), 15 (96h), 16 (120h), 17 (144h), 18 (2ª semana), 19 (3ª semana) e 20 (4ª semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) dos valores referentes ao logaritmo negativo da atividade de íons hidrogênio (pH) da urina. Momentos de colheita: controle\*, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana administração da sacarose via oral.

	pH urina
Controle*	7,11 $\pm$ 0,11
24 h	5,28 $\pm$ 0,17
48 h	5,97 $\pm$ 0,14
72 h	5,65 $\pm$ 0,08
96 h	5,50 $\pm$ 0,16
120 h	6,96 $\pm$ 0,32
144 h	7,32 $\pm$ 0,31
2ª semana	7,90 $\pm$ 0,0
3ª semana	8,05 $\pm$ 0,07
4ª semana	7,64 $\pm$ 0,31
CV	10,39

\*Controle: média das colheitas -15 dias, -7 dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose.



**Figura 2.** Análise de regressão dos valores do pH urinário ( $-\log [H^+]$ ) de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (24h), 2 (48h), 3 (72h), 4 (96h), 5 (120h), 6 (144h), 7 (2ª semana), 8 (3ª semana) e 9 (4ª semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### 3.4 Discussão

O valor de quinze gramas de sacarose por quilograma de peso corporal foi suficiente para a indução da ALRA nos animais, possibilitando o estudo hemogasométrico sem verificar óbitos. Hajikolael et al. (2006) e Silva et al. (2013) utilizaram, respectivamente, 18g e 10g de sacarose por Kg de peso

corporal para indução de ALRA em ovinos. Patra et al. (1995), utilizando trigo finamente moído, verificaram óbito 12 horas após a indução de ALRA em quatro de seis animais estudados.

Quatro horas após a indução da ALRA notaram-se os maiores valores das médias do pH arterial, da concentração bicarbonato e EB. Porém, esse aumento dos parâmetros foi transitório, como também evidenciado por Cao et al. (1987), Hajikolaei et al. (2006) e Kievitsbosch et al. (2011). Após 6 horas, notou-se diminuição nos valores do pH e a menor média foi obtida 20 horas após a indução da ALRA; comportamento semelhante foi observado com os teores de bicarbonato e do EB. Segundo Hajikolaei et al. (2006), após a ingestão excessiva de carboidratos ocorre aumento das quantidades de ácidos graxos voláteis e de ácido láctico produzidos no rúmen. Devido a esse incremento na produção, a quantidade total de ácido láctico não é consumida pela microbiota ruminal, levando à absorção sanguínea e conseqüente queda do pH arterial, caracterizando estado de acidose metabólica.

Diminuição do teor de bicarbonato plasmático ocorreu entre 6 e 20 horas após a indução da ALRA. Sabidamente a diminuição do pH sanguíneo ativa os mecanismos compensatórios, sendo o bicarbonato plasmático consumido na manutenção da homeostasia do meio interno. Dessa maneira, após 72 horas de evolução da ALRA ocorreu a estabilização do pH e também dos teores de bicarbonato, possivelmente devido à diminuição da produção e/ou aumento da utilização do ácido láctico pela microbiota ruminal, com conseqüente diminuição da acidemia (REECE, 2006).

No presente trabalho houve diminuição significativa nos valores médios do pH urinário após a indução da ALRA, desde a primeira colheita realizada 24 horas e, retornando aos valores considerados normais para a espécie com 120 horas. O consumo de grandes quantidades de carboidrato leva ao acúmulo das formas D (-) e L (+) do ácido láctico, levando a metabolização hepática da forma L (+) e aumento da forma D (-), pois a mesma não é metabolizada, culminando com a ocorrência da acidose metabólica (HAJIKOLAEI et al, 2006). A acidemia age como estímulo a secreção de íons hidrogênio pelas células tubulares renais no filtrado tubular, o que inicialmente assegura que todo o bicarbonato no filtrado glomerular será reabsorvido. O excesso de íons hidrogênio acidifica a urina, e a maior parte desse excesso é excretada

(REECE, 2006). Com o restabelecimento do pH sanguíneo para níveis fisiológicos, o mecanismo de excreção renal de íons hidrogênio é interrompido, e o valor do pH urinário também retornou ao detectado no momento controle após cinco dias.

Até oito horas após indução da ALRA, a  $p\text{CO}_2$  não alterou significativamente, sendo a média semelhante à aferida no período D-15, D-7 e D0 antes da indução da ALRA. Porém, a partir de 10 horas da administração da sacarose por via oral, as médias diminuíram, e o menor valor foi encontrado após 28 horas. A queda do valor do pH sanguíneo estimula o sistema de controle respiratório, resultando no aumento da ventilação pulmonar e da taxa de expiração de dióxido de carbono, conforme foi citado por REECE (2006). Decorridas 72 horas houve o restabelecimento dos valores normais do pH, o mecanismo de compensação respiratório foi interrompido e as médias da  $p\text{CO}_2$  ficaram estabilizadas até o final do período experimental.

O EB é calculado a partir do pH sanguíneo e da  $p\text{CO}_2$  sendo um importante parâmetro para identificar estado de acidose ou alcalose metabólica (SUCUPIRA e ORTOLANI, 2003). O EB se comportou de maneira semelhante ao pH, sendo aferidos aumentos negativos entre 10 horas e 20 horas, caracterizando acidose metabólica relativamente severa. Após este intervalo de tempo, o EB foi retornando aos valores iniciais gradativamente, retornando à normalidade após 72 horas. Os valores da  $\text{ctCO}_2$  também se comportaram de maneira semelhante às outras variáveis. Sabe-se que a concentração de  $\text{ctCO}_2$  indica a saturação de dióxido de carbono no plasma sanguíneo (SUCUPIRA e ORTOLANI, 2003), e que durante a acidose metabólica o mecanismo de ajuste compensatório respiratório se inicia em poucos minutos.

### **3.5 Conclusão**

As variações do pH, da concentração de bicarbonato e do excesso de base do sangue arterial dos ovinos indicam que os animais apresentaram acidose metabólica entre 12 e 24 horas após administração de sacarose via oral.

### 3.6 Referências

BARROS, N. N.; SIMPLÍCIO, A. A.; FERNANDES, F. D. Terminação de borregos em confinamento no Nordeste do Brasil. Sobral: **EMBRAPA-CNPC**. 24 p. (Circular Técnica, 12), 1997.

CAO G.R.; ENGLISH P.B.; FILIPPICH L.J.; INGLIS, S. Experimentally induced lactic acidosis in the goat. **Australian Veterinary Journal.**, v.64, p.367-370, 1987.

DIBARTOLA, S.P. **Fluid therapy in small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1992.

DIRKSEN, G.; GRUNDER, H.; Stober, M. **Medicina interna y cirugía del bovino**, fourth ed. Buenos Aires: Inter-médica, 2005.

GONZAGA Neto, S.; SILVA SOBRINHO, A. G.; RESENDE, K. T.; ZEOLA, N. M. B. L.; SILVA, A. M. A.; MARQUES, C. A. T.; ROMBOLA, L. G. Composição corporal e exigências nutricionais de macrominerais para cordeiros Morada Nova. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.6, p.2133-2142, 2005.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, fifth ed. Academic. San Diego, EUA, 1997.

KIEVITSBOSCH, T.; DELFIOL, D.J.Z.; CUNHA, P.H.J.; BORGES, A.S. Avaliação do pH sanguíneo em ovinos confinados recebendo dieta rica em carboidratos com adição de bicarbonato de sódio. **Veterinária e Zootecnia.**, v.18, p.629-632, 2011.

LEAL, M. L. R.; SOARES, P. C.; BERTAGNON, H. G.; SILVA, P. E. G.; ORTOLANI, E. L.; BENESI, F. J. Efeito da refrigeração sobre o exame gasométrico em sangue venoso de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.43, p.80-85, 2006.

HAIKOLAEI, M.R.H.; NOURI, M.; AFSHAR, F.S.; DEHKORDI, A.J. Effects of experimentally induced ruminal lactic acidosis on blood pH, bicarbonate and pCO<sub>2</sub> in the sheep. **Pakistan Journal of Biological Sciences.**, v.9, p.2003-2005, 2006.

MARUTA C. A.; ORTOLANI, E. L. Susceptibilidade de bovinos da raça Jersey e Gir a acidose láctica ruminal: I – Variáveis ruminais e fecais. **Ciência Rural**, v.32, p.55-59, 2002a.

MARUTA, C.A.; ORTOLANI, E. L. Susceptibilidade de bovinos das raças Jersey e Gir à acidose láctica rumenal: II – acidose metabólica e metabolização do lactato-L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.61-65, 2002b.

ORTOLANI, E. L.; MARUTA, C. A.; MINERVINO, A. H. H. Aspectos clínicos da indução experimental de acidose láctica rumenal em zebuínos e taurinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.47, n.4, p.253-261, 2010.

PATRA, R.C.; LAL, S.B., SWARUP, D. Biochemical profile of rumen liquor, blood and urine in experimental acidosis in sheep. **Small Ruminant Research**, v.19, p.177-180, 1995.

REECE, W. O. **Dukes, fisiologia dos Animais Domésticos**. 12<sup>th</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

SAS Institute. **Statistics Analysis System: user's guide**. Version 9.1.3. Cary (NC). SAS Institute Inc., 2005.

SILVA, S.T.G.; MIRANDA NETO, E. G.; MENDONÇA, C. L.; CARVALHO, C. C. D.; AFONSO, J. A. B. Avaliação clínico laboratorial do emprego da monensina sódica na prevenção da acidose láctica ruminal em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n.1, p.76-84, 2013.

SIQUEIRA, E. R.; AMARANTE, A. F. T.; FERNANDES, S. Estudo comparativo da recria de cordeiros em confinamento e pastagens. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.5, p.17-28, 1993.

SOBRINHO, A. G. S.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L.; SUSIN, I.; SILVA, J. F. C.; TEIXEIRA, J. C.; BORBA, M. F. S. **Nutrição de ovinos**. 1<sup>a</sup> ed. Funep, Jaboticabal, 1996.

SUCUPIRA, M. C. A.; ORTOLANI, E. L. Uso de sangue arterial e venoso no exame do equilíbrio ácido básico de novilhos normais ou com acidose metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p.863-868, 2003.

VIEIRA, A. C. S.; AFONSO, J. A. B.; MENDONÇA, C. L.; COSTA, N. A.; SOUZA, M. I. Estudo retrospectivo da acidose láctica em caprinos e ovinos atendidos na Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns/UFRPE. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.1, p.97-101, 2006.

#### **Capítulo 4 - Proteinogramas séricos de ovinos com acidose láctica ruminal aguda induzida experimentalmente**

**Resumo:** o fracionamento eletroforético representa um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas sanguíneas em ruminantes, para tal objetivou-se avaliar o proteinograma sérico de ovinos com acidose láctica ruminal aguda (ALRA) através da técnica de eletroforese SDS-PAGE. Dez ovelhas adultas receberam 15 gramas/kg de peso corporal de sacarose por via oral e as amostras de sangue foram obtidas nos seguintes intervalos: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120, 144 horas e na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas seguintes. Para dosagem do fibrinogênio plasmático as amostras foram obtidas nos intervalos: 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas e também na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas seguintes. Foram identificadas 13 proteínas sendo elas: imunoglobulinas A (IgA) e G (IgG), ceruloplasmina (Cp), transferrina (Tf), albumina (Ab),  $\alpha_1$ -antitripsina ( $\alpha_1$ AT), haptoglobina (Hp),  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida ( $\alpha_1$ GA), 95 (PPM<sub>95</sub>), 46 (PPM<sub>46</sub>), 36 (PPM<sub>36</sub>) e 31 (PMM<sub>31</sub>) kDa proteínas de peso molecular. Em todos animais com ALRA a proteína total apresentou alterações a partir de 08 horas da indução, coincidindo com os sinais clínicos de desidratação, que ocorreram até 36 horas após a indução da ALRA. O aumento da haptoglobina a partir de 08 horas coincide com a diminuição ruminal do pH, e se deve possivelmente pela morte das bactérias gram negativas, além do processo inflamatório em decorrência da instalação da acidose. A albumina apresentou comportamento semelhante ao da proteína total, também indicando desidratação. Já as imunoglobulinas A e G aumentaram a partir de 12 horas da indução, retornando aos valores normais com 72 horas. O fibrinogênio é conhecido por ser um importante marcador de resposta inflamatória aguda em ovinos e, no presente estudo, ele apresentou sua maior média com 48 horas e retorno a normalidade com 144 horas após indução.

**Palavras-chave:** eletroforese, haptoglobina, fibrinogênio, ovelhas, acidose.

## 4.1 Introdução

De acordo com a função metabólica, as proteínas séricas podem ser divididas em categorias tais como, as de fase aguda (PFA), imunoproteínas, do complemento, de coagulação e de transporte. As PFA alteram a concentração em animais sujeitos à desafios tais como infecção, inflamação, trauma cirúrgico e estresse. Suas atividades contribuem na defesa do hospedeiro por neutralização de agentes inflamatórios, diminuindo a extensão do dano tecidual e atuando na reparação dos tecidos. Assim, estas proteínas podem alterar suas concentrações séricas em até 25% em resposta à estimulação de citocinas pró-inflamatórias (EVANS, 2009).

Lesões teciduais e infecções ou exposição a moléculas pro-inflamatórias como lipopolissacarídeos (LPS) resulta em mecanismo de defesa imediato e não específico, nomeado resposta de fase aguda (RFA). A RFA envolve componentes tanto locais quanto sistêmicos e constitui um complexo mecanismo de numerosos tipos celulares e órgãos além de citocinas e outros mediadores (BAUMANN e GAULDIE, 1994). Em bovinos as principais proteínas de fase aguda são: ceruamiloide A (Ca), haptoglobina (Hp) e fibrinogênio (Fib) (ECKERSALL; CONNER, 1988; GRUYS et al., 1994; ECKERSALL, 2000).

O fracionamento eletroforético representa um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas sanguíneas. As técnicas de eletroforese mais utilizadas em Medicina Veterinária têm como matrizes fitas de acetato de celulose (FAGLIARI et al., 1988; BORGES et al., 2001) ou filmes de agarose (KEAY e DOXEY, 1982) e permitem o fracionamento de apenas cinco a sete grupos de proteínas. Gordon (1995) relatou que a técnica de eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a visualização de concentrações séricas extremamente baixas e a identificação de várias proteínas.

Sabidamente, a acidose sistêmica influencia na imunidade celular e humoral (HOFIREK et al., 1995; PLAIZIER et al., 2008) e sabe-se que a acidose ruminal é particularmente presente nos bovinos leiteiros durante o período de transição, período esse em que outras alterações metabólicas como

cetose e hipocalcemia são prevalentes (KLEEN et al., 2003; MULLIGAN; DOHERTY, 2008). As vacas leiteiras são suscetíveis à ocorrência da acidose láctica ruminal subaguda, ou ambas as formas de acidose, tanto a aguda quanto à subaguda, além da ocorrência de acidose metabólica devido as altas concentrações de carboidratos empregados na dieta desses animais. Diversos estudos mostraram que a acidose láctica ruminal subaguda leva a aumentos das concentrações séricas de Ca e em alguns casos da Hp nessa espécie (GOZHO et al., 2005; GOZHO et al., 2006; KHAFIPOOR et al., 2006; GOZHO et al., 2007).

A concentração sérica de PFA pode fornecer informações quantitativas úteis para o estudo e o diagnóstico de doenças metabólicas, além do monitoramento das respostas à terapia (ECKERSALL, 2007). Estudos que relacionam o perfil eletroforético de proteínas séricas de ruminantes e a ocorrência de ARLA já foram descritos (GONZÁLEZ et al., 2010; DANSCHER et al., 2011), porém, não foram encontradas pesquisas semelhantes para ovinos. Diante do aumento da criação de ovinos no país, modelos de produção intensivos são utilizados com o objetivo de se obter em curto prazo metas de ganho de peso e, devido ao incremento do número de animais confinados e susceptíveis a diversas patologias, este estudo teve como objetivo avaliar a resposta de fase aguda em ovinos com acidose láctica ruminal induzida experimentalmente.

## **4.2 Material e Métodos**

Dez ovelhas adultas, da raça Santa Inês, híginas, não prenhes, criadas a campo e alimentadas exclusivamente com gramíneas foram alocadas em duas baias sob devidas condições de higiene, junto ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Todas as ovelhas foram vermifugadas e mantidas sob dieta basal com feno de capim coast cross (*Cynodon dactylon*) à vontade, a qual atendia às necessidades nutricionais de ovinos em manutenção (SOBRINHO et al., 1996).

Também tiveram livre acesso à água potável e mistura mineral apropriada para manutenção. O período de adaptação teve duração de 30 dias.

No início do período experimental (D {dia} -15, -7 e 0) amostras de sangue foram colhidas de todos os animais para estabelecimento dos valores iniciais das variáveis eletroforéticas (média das três colheitas) para comparações e análises estatísticas. Para a indução da ALRA, os animais receberam, via oral, com auxílio de sonda esofágica, 15 gramas de sacarose/kg de peso corpóreo diluída em água morna. Após a indução da ALRA as colheitas de sangue venoso para mensuração da proteína total e para realização da eletroforese foram realizadas nos seguintes momentos: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Para a obtenção do fibrinogênio plasmático, as colheitas de sangue venoso foram realizadas nos seguintes intervalos: 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Posteriormente, as colheitas foram realizadas a cada sete dias completando-se o período de um mês.

As amostras de sangue foram obtidas, com os animais contidos em tronco tombador (Tronco tombador para ovinos e caprinos ITC do Brasil)<sup>12</sup>, em decúbito dorsal, através de punção da veia jugular externa após devida antissepsia da região, por sistema a vácuo (BD Vacutainer®)<sup>13</sup> com agulhas de colheita múltipla 25 x 8 mm, sendo um tubo de plástico estéril sem anticoagulante e com capacidade de 10 mL para obtenção do soro sanguíneo, e um tubo com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (K<sub>2</sub>EDTA 7,2 mg) com capacidade de 4 mL para dosagem do fibrinogênio. As amostras tiveram as frações de soro separadas por meio de centrifugação a 2.500 g por 10 minutos. O soro foi armazenado a -20°C, em microtubos de plástico estéreis tipo Eppendorf de 1,5 mL, para fracionamento das proteínas por eletroforese.

As análises foram executadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV – UNESP Câmpus de Jaboticabal. A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método do biureto, utilizando-se conjunto de reagentes comerciais<sup>14</sup> e leitura da

---

<sup>12</sup> Patina Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, Castro, Paraná, Brasil.

<sup>13</sup> BD Diagnostics – Preanalytical Systems, São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>14</sup> Labtest, Belo Horizonte, MG

amostra em espectrofotômetro<sup>15</sup>. A concentração plasmática de fibrinogênio foi estimada pelo método de precipitação pelo calor, por meio da refratometria (MILLAR et al., 1971).

Para o fracionamento das proteínas foi utilizado eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Após fracionamento, o gel foi corado durante 10 minutos em solução de Comassie Blue, constituída de metanol (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e comassie blue (0,25%). Em seguida, o gel foi colocado em solução de ácido acético a 7% para retirada do excesso de corante, até que as frações se apresentarem nítidas. As concentrações das frações foram determinadas em densitômetro computadorizado<sup>16</sup>, com referência em solução marcadora<sup>17</sup> com pesos moleculares 36.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 daltons (Da), além de proteínas purificadas haptoglobina,  $\alpha_1$ -antitripsina.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas no tempo, em que o fator testado foi colheita (17 níveis), com os animais constituindo os blocos (10). Também se realizaram análises por regressão (linear, quadrática e cúbica) das variáveis sobre as colheitas. Para tanto, foi utilizado o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS, 2005)<sup>18</sup>. As médias também foram submetidas à análise pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp Câmpus Jaboticabal, sob o Protocolo nº 03888/14.

### 4.3 Resultados

Foram identificadas 13 proteínas, sendo: imunoglobulina A (IgA) e G (IgG), ceruloplasmina (Cp), transferrina (Tf), albumina (Ab),  $\alpha_1$ -antitripsina

---

<sup>15</sup> Labquest-Labtest, Belo Horizonte, MG

<sup>16</sup> Shimadzu CS9301, Tokyo, Japan.

<sup>17</sup> Sigma, Saint Louis, Missouri, USA.

<sup>18</sup> SAS Institute, Statistics Analysis System: user's guide. Version 9.1.3. Cary (NC). SAS Institute Inc; 2005.

( $\alpha_1$ AT), haptoglobina (Hp),  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida ( $\alpha_1$ GA), e outras proteínas de peso molecular 95 (PPM<sub>95</sub>), 46 (PPM<sub>46</sub>), 36 (PPM<sub>36</sub>) e 31 (PMM<sub>31</sub>) kDa.

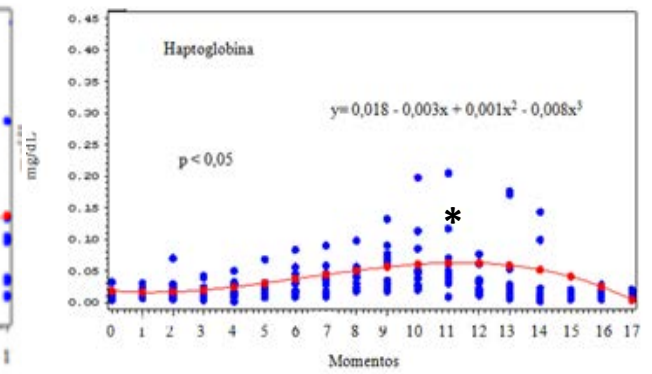
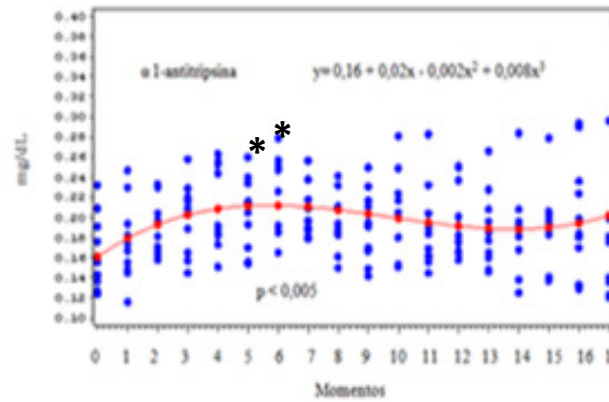
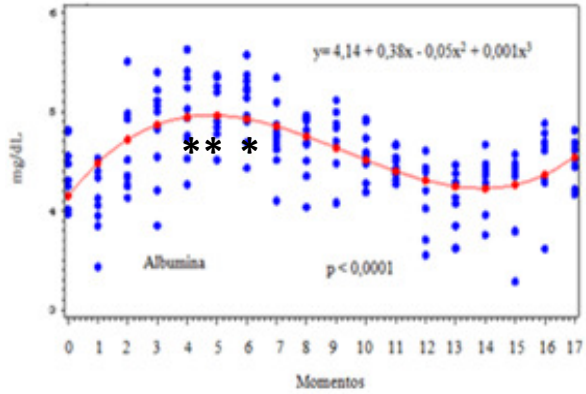
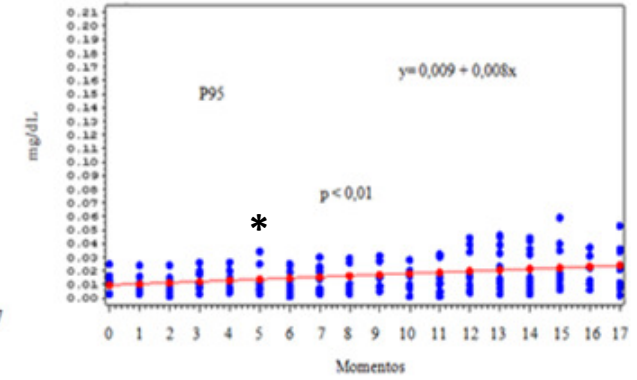
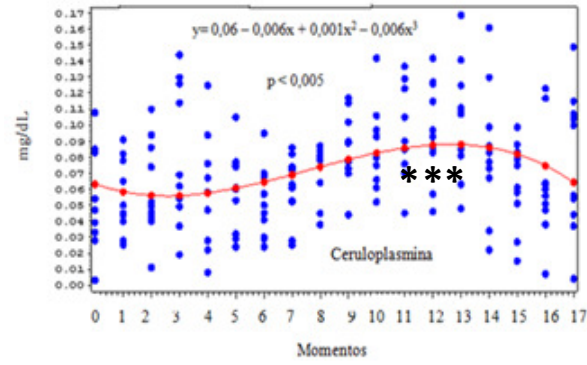
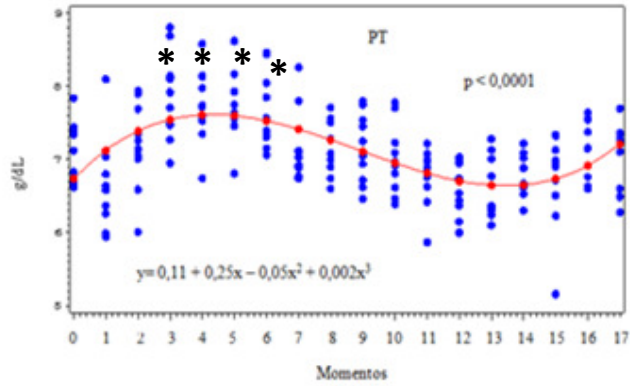
As seguintes proteínas não apresentaram associação com o tempo ( $p > 0,05$ ): IgG, IgA, transferrina, P46 e P31. O tempo teve regressão quadrática com os valores da P95 ( $p < 0,01$ ; apresentando o menor e o maior valor com 04 e 36 horas após indução, respectivamente; pelo Teste de Tukey a média com 20 horas apresentou diferença significativa em relação ao controle). Já a regressão cúbica ocorreu com os valores da proteína total ( $p < 0,0001$ ; sendo a maior média obtida com 12 horas e, a menor com 04 horas; diferença significativa foi observada com 12, 16, 20 e 24 horas pelo Teste de Tukey em relação ao controle); do fibrinogênio ( $p < 0,01$ ; maior média com 48 horas e menor na 4ª semana após indução; observou-se diferença significativa com 48, 72, 96 e 120 horas em relação ao controle pelo Teste de Tukey); Cp ( $p < 0,005$ ; notou-se aumento significativo com 04 horas, seguido por diminuição contínua, até atingir o menor valor com 24 horas; diferença observada com 72, 96 e 120 horas em relação ao controle pelo Teste de Tukey), da Ab ( $p < 0,0001$ ; menor média com 120 horas e maior com 20 horas; pelo Teste de Tukey foi observada diferença com 16, 20 e 24 horas em relação ao controle), da  $\alpha_1$ AT ( $p < 0,005$ ; menor valor com 04 horas e maior com 24 horas após indução; diferença com 20 e 24 horas pelo Teste de Tukey), da Hp ( $p < 0,05$ ; menor média com 04 horas e maior com 72 horas; diferença significativa com 72 horas pelo Teste de Tukey); da  $\alpha_1$ GP ( $p < 0,05$ ; menor valor com 96 horas e maior com 28 horas; pelo Teste de Tukey foi observada diferença com 32 horas em relação ao controle) e da P36 ( $p < 0,05$ ; menor média com 36 horas e maior obtida na terceira semana; diferença significativa observada com 16 e 20 horas em relação ao controle pelo Teste de Tukey). Os dados da média, desvio padrão e coeficiente de variação do proteinograma sérico encontram-se na Tabela 1. As representações gráficas das equações dos parâmetros obtidos encontram-se na Figura 1.

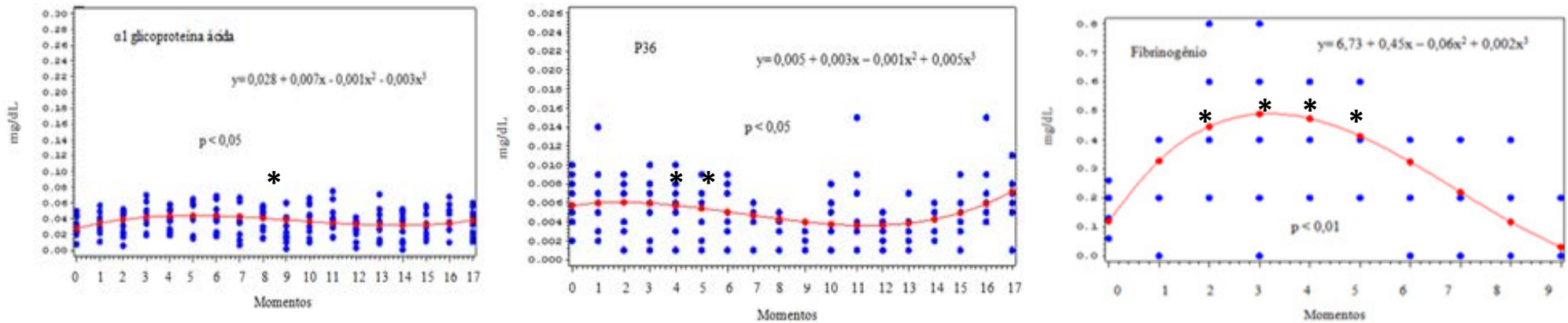
**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das concentrações séricas da proteína total (g/mL) e das proteínas de fase aguda (mg/dL) de ovinos com ALRA: IgA - imunoglobulina A; ceruloplasmina; transferrina; albumina;  $\alpha$ 1AT; P46; haptoglobina;  $\alpha$ 1GA; P36; P31; IgG; Fib. IgA – imunoglobulina A;  $\alpha$ 1AT -  $\alpha$ 1-antitripsina;  $\alpha$ 1AG -  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida; IgG - imunoglobulina G; Fib – fibrinogênio. Momentos de colheita: controle, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 2<sup>a</sup> semana, 3<sup>a</sup> semana e 4<sup>a</sup> semana após administração de sacarose via oral.

Colheitas	PT (g/mL)	IgA (mg/mL)	Ceruloplasmina (mg/mL)	P95 (mg/mL)	Transferrina (mg/mL)	Albumina (mg/mL)	$\alpha$ 1AT (mg/mL)	P46 (mg/mL)	Haptoglobina (mg/mL)	$\alpha$ 1GA (mg/mL)	P36 (mg/mL)	P31 (mg/mL)	IgG (mg/mL)	Fib (mg/mL)
<b>Controle*</b>	7,06 $\pm$ 0,13	0,016 $\pm$ 0,007	0,056 $\pm$ 0,010	0,012 $\pm$ 0,002	0,387 $\pm$ 0,021	4,414 $\pm$ 0,102	0,165 $\pm$ 0,011	0,003 $\pm$ 0,008	0,012 $\pm$ 0,002	0,031 $\pm$ 0,003	0,005 $\pm$ 0,009	0,007 $\pm$ 0,001	0,461 $\pm$ 0,055	0,15 $\pm$ 0,02
<b>04 hs</b>	6,60 $\pm$ 0,19	0,008 $\pm$ 0,002	0,054 $\pm$ 0,007	0,009 $\pm$ 0,001	0,356 $\pm$ 0,032	4,168 $\pm$ 0,112	0,175 $\pm$ 0,012	0,005 $\pm$ 0,001	0,014 $\pm$ 0,002	0,034 $\pm$ 0,004	0,006 $\pm$ 0,001	0,013 $\pm$ 0,002	0,474 $\pm$ 0,064	-
<b>08 hs</b>	7,19 $\pm$ 0,18	0,016 $\pm$ 0,005	0,060 $\pm$ 0,009	0,010 $\pm$ 0,002	0,368 $\pm$ 0,041	4,621 $\pm$ 0,141	0,187 $\pm$ 0,008	0,004 $\pm$ 0,001	0,022 $\pm$ 0,005	0,034 $\pm$ 0,005	0,005 $\pm$ 0,009	0,012 $\pm$ 0,002	0,454 $\pm$ 0,056	-
<b>12 hs</b>	7,85 $\pm$ 0,18	0,016 $\pm$ 0,005	0,080 $\pm$ 0,013	0,012 $\pm$ 0,002	0,418 $\pm$ 0,026	4,808 $\pm$ 0,151	0,199 $\pm$ 0,011	0,004 $\pm$ 0,001	0,039 $\pm$ 0,020	0,044 $\pm$ 0,005	0,006 $\pm$ 0,009	0,014 $\pm$ 0,003	0,541 $\pm$ 0,076	-
<b>16 hs</b>	7,69 $\pm$ 0,15	0,011 $\pm$ 0,003	0,057 $\pm$ 0,011	0,012 $\pm$ 0,002	0,375 $\pm$ 0,043	4,987 $\pm$ 0,135	0,209 $\pm$ 0,128	0,003 $\pm$ 0,007	0,020 $\pm$ 0,004	0,036 $\pm$ 0,004	0,005 $\pm$ 0,001	0,019 $\pm$ 0,004	0,553 $\pm$ 0,076	-
<b>20 hs</b>	7,70 $\pm$ 0,15	0,019 $\pm$ 0,008	0,059 $\pm$ 0,008	0,013 $\pm$ 0,004	0,344 $\pm$ 0,060	5,152 $\pm$ 0,128	0,217 $\pm$ 0,018	0,005 $\pm$ 0,001	0,023 $\pm$ 0,005	0,045 $\pm$ 0,005	0,005 $\pm$ 0,007	0,015 $\pm$ 0,003	0,499 $\pm$ 0,079	-
<b>24 hs</b>	7,66 $\pm$ 0,16	0,011 $\pm$ 0,003	0,050 $\pm$ 0,007	0,011 $\pm$ 0,002	0,384 $\pm$ 0,047	5,084 $\pm$ 0,108	0,223 $\pm$ 0,012	0,002 $\pm$ 0,005	0,033 $\pm$ 0,007	0,041 $\pm$ 0,005	0,005 $\pm$ 0,008	0,013 $\pm$ 0,002	0,546 $\pm$ 0,067	0,22 $\pm$ 0,04
<b>28 hs</b>	7,24 $\pm$ 0,16	0,013 $\pm$ 0,005	0,059 $\pm$ 0,006	0,011 $\pm$ 0,002	0,376 $\pm$ 0,042	4,750 $\pm$ 0,105	0,211 $\pm$ 0,009	0,003 $\pm$ 0,007	0,034 $\pm$ 0,007	0,062 $\pm$ 0,027	0,004 $\pm$ 0,005	0,013 $\pm$ 0,003	0,489 $\pm$ 0,057	-

<b>32 hs</b>	7,12± 0,11	0,010± 0,004	0,064 ± 0,008	0,012± 0,003	0,345± 0,049	4,681 ± 0,096	0,207± 0,016	0,006± 0,003	0,039± 0,007	0,038± 0,004	0,005± 0,002	0,011± 0,002	0,482± 0,040	-
<b>36 hs</b>	7,15 ± 0,15	0,027± 0,013	0,079 ± 0,009	0,034± 0,018	0,391 ± 0,038	4,646 ± 0,110	0,192± 0,011	0,003± 0,009	0,028 ± 0,005	0,028± 0,005	0,002± 0,003	0,025± 0,018	0,520± 0,060	-
<b>48 hs</b>	6,99 ± 0,14	0,008± 0,004	0,077 ± 0,011	0,012± 0,002	0,433 ± 0,049	4,567 ± 0,075	0,196± 0,014	0,004± 0,001	0,065 ± 0,017	0,036± 0,006	0,003± 0,006	0,010± 0,001	0,480± 0,045	0,54 ± 0,06
<b>72 hs</b>	6,76 ± 0,12	0,016± 0,006	0,100 ± 0,010	0,012± 0,003	0,403 ± 0,028	4,353 ± 0,118	0,188± 0,013	0,007± 0,002	0,093 ± 0,030	0,040± 0,005	0,005± 0,001	0,014± 0,003	0,462± 0,043	0,48 ± 0,07
<b>96 hs</b>	6,61 ± 0,11	0,028± 0,008	0,097 ± 0,009	0,018± 0,004	0,416 ± 0,024	4,327 ± 0,172	0,196± 0,011	0,005± 0,001	0,063 ± 0,028	0,026± 0,003	0,002± 0,004	0,014± 0,003	0,425± 0,055	0,44 ± 0,04
<b>120 hs</b>	6,59 ± 0,13	0,009± 0,003	0,103 ± 0,011	0,025± 0,005	0,429 ± 0,025	4,100 ± 0,096	0,187± 0,011	0,004± 0,001	0,051 ± 0,020	0,032± 0,006	0,002± 0,006	0,014± 0,001	0,420± 0,054	0,44 ± 0,05
<b>144 hs</b>	6,77 ± 0,09	0,019± 0,010	0,083 ± 0,012	0,024± 0,005	0,433 ± 0,033	4,303 ± 0,083	0,195± 0,016	0,003± 0,009	0,033 ± 0,015	0,032± 0,006	0,004± 0,005	0,012± 0,002	0,440± 0,044	0,32 ± 0,04
<b>2ª semana</b>	6,72 ± 0,20	0,012± 0,005	0,063 ± 0,008	0,024± 0,005	0,410 ± 0,034	4,193 ± 0,133	0,186± 0,013	0,004± 0,005	0,053 ± 0,041	0,031± 0,005	0,004± 0,007	0,012± 0,002	0,495± 0,053	0,22 ± 0,05
<b>3ª semana</b>	7,10 ± 0,12	0,008± 0,003	0,062 ± 0,010	0,021± 0,004	0,379 ± 0,025	4,519 ± 0,115	0,203± 0,018	0,004± 0,001	0,014 ± 0,002	0,039± 0,005	0,007± 0,001	0,011± 0,002	0,496± 0,056	0,10 ± 0,04
<b>4ª semana</b>	7,06 ± 0,14	0,017± 0,007	0,077 ± 0,014	0,020± 0,005	0,392 ± 0,019	4,478 ± 0,072	0,194± 0,027	0,007± 0,002	0,015 ± 0,001	0,034± 0,005	0,006± 0,009	0,019± 0,002	0,486± 0,047	0,04 ± 0,02
<b>CV</b>	7,07	135,06	46,37	108,95	29,54	8,33	22,75	99,98	140,44	69,17	63,54	115,50	37,20	54,79

\*Controle: média das colheitas 15 dias, 7 dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose





**Figura 1.** Gráficos resultantes da análise de regressão realizada entre as concentrações séricas da proteína total (PT - g/mL) e das proteínas de fase aguda (mg/dL) de ovinos com ALRA: IgA - imunoglobulina A; ceruloplasmina; albumina;  $\alpha$ 1AT; P46; haptoglobina;  $\alpha$ 1GA; P36; P31; IgG e Fibrinogênio. IgA – imunoglobulina A;  $\alpha$ 1AT -  $\alpha$ 1-antitripsina;  $\alpha$ 1AG -  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida; IgG – imunoglobulina. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (4h), 2 (8h), 3 (12h), 4 (16h), 5 (20h), 6 (24h), 7 (28h), 8 (32h), 9 (36h), 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2ª semana), 16 (3ª semana) e 17 (4ª semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

#### 4.4 Discussão

Os animais apresentaram como sinais clínicos decorrentes da indução da ALRA apatia, hiporexia, distensão abdominal bilateral, timpanismo, atonia ruminal, desidratação, taquicardia, taquipnéia e redução do peso corporal. A temperatura corpórea e as mucosas aparentes permaneceram normais durante todo o período experimental. Tanto a inflamação decorrente da ALRA quanto alguns sinais clínicos podem ser notados através das diversas alterações apresentadas no proteinograma sérico.

As médias da PT indicam alterações a partir de 08 horas, seu pico máximo foi alcançado com 12 horas, momento em que os sinais de desidratação e hemoconcentração, decorrentes do influxo de fluídos da corrente sanguínea para o rúmen foram mais evidentes. A partir de 36 horas, os valores da PT retornaram a normalidade inicial, assim permanecendo até o final do período de observação. Esses dados não corroboram com os obtidos por Vieira et al. (2012), em que não foram observadas variações da PT até 48 horas após indução da ALRA em pequenos ruminantes.

Estudos demonstram que o ácido láctico presente em níveis elevados no rúmen e na circulação sistêmica é o fator chave no desencadeamento da resposta inflamatória (FISHELSON et al., 1987; TREVANI et al., 1999; JACOBSEN et al., 2004; KELLUM et al., 2004). A ruminite, presença de LPS e outras substâncias pró-inflamatórias na circulação sistêmica podem levar ao aumento da expressão das PFA. Jacobsen et al. (2004) afirmaram que o LPS é um potente indutor das PFA e sabe-se que as concentrações de LPS no fluido ruminal aumentam durante a acidose láctica, podendo ocorrer a migração do mesmo para a circulação sistêmica e, dessa forma, estimular a síntese hepática das PFA (DOUGHERTY et al., 1975; BOOSMAN, 1990; ANDERSEN et al., 1994b). Além disso, o pH ácido e certos ácidos orgânicos podem ativar componentes tanto da resposta celular quanto da humoral; aumentando a resposta ao processo inflamatório (FISHELSON et al., 1987; TREVANI et al., 1999; KELLUM et al., 2004) como foi observado após a indução de ALRA em novilhas utilizando oligofrutose (DANSCHER et al., 2011).

Sabe-se que a RFA em ruminantes é diferente em relação às outras espécies, sendo a Hp uma das mais importantes PFA. Em bovinos saudáveis a concentração sérica de Hp é de <20 mg/L, porém ela pode aumentar para valores maiores do que 2 g/L dentro de dois dias nos casos de infecções. Em bovinos, a Hp é eficaz no diagnóstico e prognóstico de doenças como mastite, enterite, peritonite, pneumonia, endocardite e endometrite (MURATA et al, 2004; PETERSEN et al., 2004).

No presente estudo os valores da Hp aumentaram a partir de 08 horas após indução, permanecendo alterado até a segunda semana e, posteriormente retornando à valores semelhantes ao momento controle. O aumento nos valores de Hp foi associado ao meio ruminal ácido (MOHEBBI et al., 2010), o que leva ao aumento da lise de bactérias Gram negativas e, dessa maneira, liberação de LPS e sua translocação para a circulação sistêmica, resultando em resposta inflamatória (GOZHO et al., 2005; KHAFIPOUR et al., 2009); porém Huo et al. (2010), demonstraram que somente o LPS pode não ser o único indutor da resposta inflamatória e posteriormente aumento da concentração de Hp. Skinner e Roberts (1994), num estudo com ovelhas, confirmaram que a haptoglobina foi um melhor indicador de infecção bacteriana que o leucograma. Danscher et al. (2011), compararam a RFA em novilhas que foram induzidas à ALRA, porém receberam como alimentação silagem, indicando que a resposta inflamatória também depende de condições pré-existentes no rúmen, o que pode afetar o grau de ruminite, a alteração na população bacteriana e a quantidade de ácido láctico produzido.

A  $\alpha$ 1AT apresentou aumento a partir de 08 horas, com maior média obtida às 24 horas após indução. Essa proteína possui atividade de antiprotease, sendo que o aumento dos seus valores pode ser explicado através de sua característica em inibir proteases liberadas por fagócitos ou patógenos, limitando a lesão tecidual ao sítio da inflamação (TOTHOVA et al., 2014). Essa característica é pouco estudada em animais de produção, e em ruminantes, pouco se sabe acerca da utilidade da mesma no diagnóstico de enfermidades.

O uso da ceruloplasmina como marcador de inflamação não é tão comum quanto o uso de outras PFA, como a haptoglobina (MURATA et al., 2004; COSTA et al., 2010). No presente estudo essa PFA apresentou dinâmica

diferente das outras proteínas estudadas, sendo sua média apresentou aumento a partir de 32 horas, observando maior média 120 horas após indução, aumento esse considerado tardio. Não foi verificado na literatura compulsada, estudos da Cp em animais com ALRA, dificultando a discussão mais acurada destes resultados. Pfeffer e Rogers (1989) observaram aumento da concentração da Cp em ovelhas com pneumonia e obstrução bronquial, sendo esse aumento detectado nos primeiros dias; Pereira et al. (2009) e Costa et al. (2010) estudando cordeiros com intoxicação por cobre e com mastite aguda induzida em ovelhas, respectivamente, também relatam aumento desta proteína. O estudo da Cp ainda é pouco explorado, entretanto Murata et al. (2004) acreditam que essa ferroxidase pode ser utilizada como indicador de infecções em bovinos.

A Ab é classificada como PFA negativa, pois durante a RFA a necessidade de aminoácidos para a síntese das proteínas positivas sofre grande aumento, o que torna necessária a readequação da síntese de proteínas hepáticas (TOTHOVA et al., 2014). A maior média da Ab foi obtida com 20 horas após indução, coincidindo com o período em que os animais apresentaram sinais clínicos de desidratação, retornando aos valores similares ao controle a partir das 144 horas. Costa et al. (2010) ao induzirem mastite aguda em ovelhas, descreveram aumento discreto da Ab com 96 horas após infecção e, posteriormente, retorno à normalidade, coincidindo com a melhora clínica dos animais.

Outra proteína que também é classificada como negativa é a Tf, que apresenta a característica de se ligar às moléculas de ferro, inibindo a multiplicação de alguns vírus, bactérias e fungos, limitando o acesso dos mesmos ao ferro (TOTHOVA et al., 2014). O aumento das concentrações séricas durante o processo inflamatório pode auxiliar a resposta imune não específica contra microorganismos patogênicos (MURATA et al., 2004).

Os valores de IgA não apresentaram variações significativas, porém acredita-se que essa imunoglobulina apresenta característica de proteger superfícies contra infecções (COSTA et al., 2010). A IgG também não apresentou diferença significativa, porém em estudo realizado por Costa et al. (2010), essa imunoglobulina é apontada como uma das responsáveis pelo controle de diversas infecções.

Em bovinos, a  $\alpha 1$ GA é conhecida por ser uma importante proteína anti-inflamatória e capaz de modular monócitos e polimorfonucleares na resposta inflamatória, incluindo quimiotaxinas, radicais livres reativos do oxigênio e degranulação de outras células (CECILIANI et al., 2012). Eckersall et al. (2007), sugeriram que essa proteína pode ser utilizada como marcador para alterações crônicas em ovelhas, descrevendo aumento em sua concentração nos casos de linfadenite caseosa. No presente estudo, os maiores valores foram encontrados a partir de 28 horas após indução, retornando à normalidade com 120 horas. Essa proteína pode modular o recrutamento e agregação plaquetária, levando à diminuição da liberação das plaquetas, diminuindo a resposta inflamatória local e prevenindo alterações no tecido lesado (HOCHEPIED et al., 2003).

O fibrinogênio é classificado como uma menor/moderada PFA em bovinos, e em resposta a inflamação e infecção seus valores podem aumentar em 2 a 3 vezes (PETERSEN et al., 2004). Sua concentração plasmática eleva-se sob a ação estimuladora de interleucinas (IL-1 e 6) e do fator de necrose tecidual liberado durante o processo inflamatório (ANDREWS et al., 1994). Segundo Schalm et al. (1975), durante o processo inflamatório agudo, a concentração plasmática desta substância aumenta, alcançando picos entre o quinto e sétimo dia. O estímulo à síntese de fibrinogênio segundo Jain (1993) ocorre de seis a oito horas após a injúria, sendo os valores máximos obtidos nesse estudo com 48 horas após indução; retornando a normalidade a partir de 144 horas. Os dados obtidos mostraram que o fibrinogênio pode ser utilizado como um marcador de resposta inflamatória aguda em ovinos conforme foi descrito por Pfeffer e Rogers (1989); Pfeffer et al. (1993), González et al. (2008), Costa et al. (2010), e Danscher et al. (2011). Porém autores como Vieira et al. (2012) afirmaram que os valores de fibrinogênio não se alteram após indução da acidose através as sacarose ou por dietas com alto teor de concentrado (GOZHO et al., 2007; GONZÁLEZ et al., 2010; MOHEBBI et al., 2010).

Na literatura compilada não há menções acerca das proteínas PPM<sub>95</sub>, PPM<sub>46</sub>, PPM<sub>36</sub> e PPM<sub>31</sub>, portanto, suas funções são desconhecidas.

#### **4.5 Conclusão**

Variações dos teores séricos de proteína total, haptoglobina, ceruloplasmina, fibrinogênio e das proteínas de fase aguda negativas, podem auxiliar na avaliação clínica e diagnóstico da ALRA.

#### 4.6 Referências

ANDERSEN, P.H., HESSEHOLT, M., JARLØV, N. Endotoxin and arachidonic acid metabolites in portal, hepatic and arterial blood of cattle with acute ruminal acidosis. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v.35, p.223-234, 1994b.

ANDREWS, D. A.; REAGAN, W.J.; DENICOLA, D.B. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. Continuing education for the practicing veterinarian, **Yardley, DA**, v.16, n.10, p.1349-1357, 1994.

BAUMANN, H., GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v.15, n.2, p.74-80, 1994.

BOOSMAN, R. Bovine laminitis. Histopathologic and arteriographic aspects, and its relation to endotoxinaemia. Faculteit der Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit, Utrecht, **The Netherlands**, Utrecht, The Netherlands, 1990.

BORGES, A.S.; FEITOSA, F.L.F.; BENESI, F.J. Influência da forma de administração e da quantidade fornecida de colostro sobre a concentração de proteína total e de suas frações eletroforéticas no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.629-634, 2001.

CECILIANI, F., CERON, J. J., ECKERSALL, P. D.; Sauerwein, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v. 5, p.4207-4231, 2012.

COSTA, N. A., SIMÃO, L. C. V., SANTOS, R. A., AFONSO, J. A. B., FAGLIARI, J. J. CARDOSO, E. C., SOARES, P. C.; MENDONÇA, C. L. Proteinograma e teores de cobre, ferro e zinco no soro sanguíneo de ovelhas da raça Santa Inês com mastite experimental por *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.435-442, 2010.

DANSCHER, A. M.; THOEFNER, M. B.; HEEGAARD, P. M. H.; EKSTRØM, C. T.; JACOBSEN, S. Acute phase protein response during acute ruminal acidosis in cattle. **Livestock Science**, Amsterdam, v.135, n.1, p.62-69, 2011.

DOUGHERTY, R.W., COBURN, K.S., COOK, H.M., ALLISON, M.J., 1975. Preliminary study of appearance of endotoxin in circulatory system of sheep and cattle after induced grain engorgement. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.6, p.831-832, 1975.

ECKERSALL, P.D., CONNER, J.G., 1988. Bovine and canine acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, 12, p. 169–178.

ECKERSALL, P.D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revista de Medicina Veterinária**, v.151, n.7, p.577-584, 2000.

ECKERSALL, P. D. Acute phase protein: biomarkers of disease in cattle and sheep. **Cattle Practice**, Frampton-on-Severn, v.15, p.240-243, 2007.

EVANS, G. O. **Animal Clinical Chemistry – a practical guide for toxicologists and biomedical researchers**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press. 310p, 2009.

FAGLIARI, J.J.; PASSIPIERI, M.; CURI, P.R. Valores padrões das proteínas séricas de bovinos da raça Guzará. II. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos. **Ars Veterinaria**, v.4, p.225-232, 1988.

FISHELSON, Z., HORSTMANN, R.D., Mullereberhard, H.J. Regulation of the alternative pathway of complement by pH. **J. Immunol.**, v.138, n.10, p.3392-3395, 1987.

GONZÁLEZ, F. H. D., TECLES, F., MARTINEZ-SUBIELA, S., TVARIJONAVICIUTE, A., VASCO, L. S.; CERÓN, J. J. Acute phase protein responses in goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.45-49, 2008.

GONZÁLEZ, F. H. D., RUIPÉREZ, F. H., SÁNCHEZ, J. M., SOUZA, J. C., MARTINEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Haptoglobin and serum amyloid A in subacute ruminal acidosis in goats. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.159-167, 2010.

GORDON, A.H. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. **New York: Elsevier Science Publishers**, 213p, 1995.

GOZHO, G.N., PLAIZIER, J.C., KRAUSE, D.O., KENNEDY, A.D., WITTENBERG, K.M. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.4, p.1399-1403, 2005.

GOZHO, G.N., KRAUSE, D.O., PLAIZIER, J.C. Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.11, p.4404-4413, 2006.

GOZHO, G.N., KRAUSE, D.O., PLAIZIER, J.C. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.2, p. 856-866, 2007.

GRUYS, E., OBWOLO, M.J., TOUSSAINT, M.J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinaria Bull**, v.64, n.11, p.1009-1018, 1994.

HOCHEPIED, T.; BERGER, F. G.; BAUMANN, H.; IBERT, C.  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein. an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 14, p.25-34, 2003.

HOFIREK, B., SLOSARKOVA, S., ONDROVA, J. Effect of chronic metabolic acidosis on migration activity of polymorphonuclear leukocytes in sheep. **Vet. Med. Praha**, v.40, n.6, p.171-175, 1995.

HUO, W., ZHU, W.; MAO, S. Effects of feeding increasing proportions of corn grain on concentration of lipopolysaccharide in the rumen fluid and the subsequent alterations in immune responses in goats. **Asian-australas. Journal of Animal Science**, v.26, p.1437-1445, 2010.

JACOBSEN, S., ANDERSEN, P.H., TOELBOEL, T., HEEGAARD, P.M.H. Dose dependency and individual variability of the lipopolysaccharide-induced bovine acute phase protein response. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3330-3339, 2004.

JAIN, N.C. The plasma proteins, dysproteinemias and immune deficiency disorders. In: **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, cap.21, p.349-380, 1993.

KEAY, G.; DOXEY, D.L. Species characteristics of serum proteins demonstrated after agarose gel electrophoresis. **Veterinarian Research Communication.**, n.5, p.263-270, 1982.

KELLUM, J.A., SONG, M.C., LI, J.Y. Science review: extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiologic implications. **Critical Care**, v.8, n.5, p. 331-336, 2004.

KHAFIPOOR, E., PLAIZIER, J.C., KRAUSE, D.O. Influence of grain induced subacute ruminal acidosis (SARA) on lipopolysaccharide endotoxin (LPS), and acute phase proteins. **Canadian Journal of Animal Science**, v.86, n.4, 577, 2006.

KHAFIPOUR, E., KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1060-1070, 2009.

KLEEN, J.L., HOOIJER, G.A., REHAGE, J., NOORDHUIZEN, J.P.T.M. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. **Journal of Veterinary Medicine.**, v.50, n.8, p.406-414, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

MILLAR, H. R.; SIMPSON, J. G.; STALKER, A. L. An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. **Journal of Clinical Pathology**, v.24, p.827-830, 1971.

MOHEBBI, M., SAJEDIANFARD, J., NAZIFI, S.; SAMIMI, A. S. Changes of serum amyloid A, haptoglobin, ceruloplasmin, fibrinogen, and lipid-associated sialic acid in sheep fed high grain rations with altered digestive functions. **Comparative Clinical Pathology**, v.19, p.541-546, 2010.

MULLIGAN, F.J., DOHERTY, M.L. Production diseases of the transition cow. **Veterinary Journal**, v.176, n.1, p.3-9, 2008.

MURATA, H., SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis. an overview. **Veterinary Journal**, v.168, p.28-40, 2004.

PEREIRA, W. A. B., FARIA, J. L. M., SILVA, P. C., HATAYDE, M. R.; FAGLIARI, J. J. Proteinograma sérico de ovinos intoxicados por cobre. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, p.354-359, 2009.

PFEFFER, A.; ROGERS, K. M. Acute phase response of sheep. changes in the concentrations of ceruloplasmin, fibrinogen, haptoglobin and the major blood cell types associated with pulmonar damage. **Research in Veterinary Science**, v.46, p.118-124, 1989.

PFEFFER, A., ROGERS, K. M., O'KEEFFE, L.; OSBORN, P. J. Acute phase protein response, food intake, liveweight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep. **Research in Veterinary Science**, v.55, p.360-366, 1993.

PLAIZIER, J.C., KRAUSE, D.O., GOZHO, G.N., MCBRIDE, B.W. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. **Veterinary Journal.**, v.176, n.1, p.21-31, 2008.

PETERSEN, H.H., NIELSEN, J.P., HEEGAARD, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v.35, n.2, p.163-187, 2004.

SAS Institute. **Statistics Analysis System: user's guide**. Version 9.1.3. Cary (NC). SAS Institute Inc, 2005.

SCHALM, O.W.; SMITH, R.; KANEKO, J.J. Plasma protein: fibrinogen ratios in dogs, cattle and horses - Part I. Influence of age on normal values and explanation of use in disease. **The California Veterinarian**, Sacramento, CA, v.24, n.2, p.09-10, 1975.

SOBRINHO, A. G. S.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L.; SUSIN, I.; SILVA, J. F. C.; TEIXEIRA, J. C.; BORBA, M. F. S. **Nutrição de ovinos**. 1<sup>st</sup> ed. Funep, Jaboticabal, 1996.

TOTHOVA, C., NAGY, O.; KOVAC, G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants. a review. **Vet. Med. (Praha)**, v.59, p.163-180, 2014.

TREVANI, A.S., ANDONEGUI, G., GIORDANO, M., LOPEZ, D.H., GAMBERALE, R., MINUCCI, F., GEFFNER, J.R. Extracellular acidification induces human neutrophil activation. **Journal of Immunology**, v.162, n.8, p.4849-4857, 1999.

VIEIRA, A. C., CÂMARA, A. C., MENDONÇA, C. L.; AFONSO, A. B. Hematological and biochemical profile of sheep supplemented with salinomycin and submitted to experimental lactic ruminal acidosis. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, p.259-271, 2012.

## **Capítulo 5 - Expressão das metaloproteinases 2 e 9 em ovinos com acidose láctica ruminal aguda e laminite aguda..**

**Resumo:** a acidose láctica ruminal aguda (ALRA) é conhecida por ser uma das causas mais comuns de laminite em ovinos. Algumas teorias foram criadas tentando explicar o exato mecanismo de ocorrência de laminite aguda após ALRA, porém sem obter sucesso. Uma das teorias empregadas é da liberação de metaloproteinases (MMPs) da corrente sanguínea para o dígito. Este estudo teve por objetivo avaliar a expressão das MMPs 2 e 9 de ovinos com ALRA induzida experimentalmente. Dez animais receberam 15 gramas/kg de peso corporal de sacarose por via oral e as amostras de sangue foram obtidas nos seguintes intervalos: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120, 144 horas e na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas seguintes. Todos os animais apresentaram sinais de ALRA e cinco deles manifestaram laminite aguda entre 24 e 72 horas após indução. Somente as formas pró-ativas das MMPs foram expressas nos géis de zimografia, com aumento dos valores ocorrendo principalmente entre 32 e 144 horas. Em equinos acredita-se que as MMPs são, também, causa de laminite após episódios de abdômen agudo. Em ruminantes acredita-se que as MMPs apresentam a mesma dinâmica que a apresentada em equinos e, os resultados obtidos no estudo demonstram que essas enzimas desempenham papel fundamental na gênese de laminite após ALRA.

**Palavras-chave:** zimografia, sangue, acidemia, ovelhas.

## 5.1 Introdução

A acidose ruminal, seja na forma aguda ou subaguda, é considerada uma das principais causas etiopatogênicas da laminite nas suas diversas formas (NOCEK, 1997; DANSCHER et al., 2009). As fases do desenvolvimento da laminite constituem estágios alternantes de distúrbios metabólicos, desordens vasculares e subseqüentes alterações mecânicas da estrutura interna do casco ocasionando dor, inchaço, temperaturas elevadas acima da banda coronária, degeneração da região laminar, deslocamento do osso podal, formação deficiente do casco, hematomas, lesões difusas, úlceras de sola e sola dupla (NOCEK, 1997; JACKSON; COCKCROFT, 2002).

Pesquisas sobre laminite e lesões associadas já evidenciaram vários fatores de risco (COOK et al., 2004; KNOTT et al., 2007; HOLZHAUER et al., 2008) e alterações decorrentes das diversas formas de laminite (HENDRY et al., 2003; MILLS et al., 2009; MENDES et al., 2010). Apesar disso, ainda não foram evidenciados os exatos mecanismos fisiopatológicos ligando os fatores de risco e fatores desencadeantes às lesões observadas (BERGSTEIN e MULLING, 2004; THOEFNER et al., 2004). A carência de informações referentes às lesões podais nestes animais induz a erros no diagnóstico, condutas terapêuticas inadequadas diante de surtos e dificulta o sucesso dos tratamentos (HILL et al., 1997; WINTER, 2004b).

As metaloproteinases (MMPs) constituem uma família de mais de 20 endopeptidases cálcio e zinco dependentes, relacionadas com a degradação da matriz extracelular. As MMPs são classificadas como collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMPs tipo membrana e outras MMPs. O grupo das gelatinases é composto pela gelatinase-A (MMP-2) e pela gelatinase-B (MMP-9) (RAFFETTO; KHALIL, 2008). A MMP-2 e a MMP-9 são importantes na migração de células provenientes do sangue para os tecidos, devido à sua propriedade de digerir o colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, rompendo desta forma a integridade estrutural da parede dos vasos sanguíneos permitindo que as células inflamatórias migrem para o espaço extracelular (SELLNER; LEIB, 2006).

As MMPs são secretadas como pró-enzimas por neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e por células tumorais em resposta a estímulos

variados (WOESSNER, 1991). Estas pró-enzimas (pró-MMPs) necessitam passar por clivagem proteolítica para que ocorra sua ativação (VISSE e NAGASE, 2003). A clivagem proteolítica faz parte de uma cascata enzimática que envolve proteases plasminogênicas, agentes não proteolíticos e até mesmo outras MMPs (NAGASE; WOESSNER, 1999).

A expressão das MMPs pode ser regulada por citocinas pró-inflamatórias em diversos tipos de tecidos, o que indica relação entre a inflamação e as MMPs (CLUTTERBUCK et al., 2010). A degradação laminar podal causada pelas MMPs tem sido associada à resposta inflamatória devido à liberação de fatores de ativação de MMPs da corrente sanguínea para os dígitos, contribuindo para o processo degenerativo (CLUTTERBUCK et al., 2010), processo esse evidenciado principalmente em equinos.

A laminite aguda causada por ALRA em ovinos é pouco explorada nas pesquisas científicas, as quais abordam superficialmente estes distúrbios na espécie, limitando-se na maioria das vezes a descrições de achados clínicos. Considerando-se o aumento do número de ovinos no país e susceptíveis a desordens como ALRA e laminite, este trabalho objetivou avaliar a expressão das MMPs na ALRA e sua correlação com o desenvolvimento de laminite aguda.

## 5.2 Material e Métodos

Dez ovelhas adultas, da raça Santa Inês, híbridas, não prenhes, criadas a campo e alimentadas exclusivamente com gramíneas foram alocadas em duas baias sob as devidas condições de higiene, junto ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Todas as ovelhas foram vermifugadas e mantidas sob dieta basal com feno de capim coast cross (*Cynodon dactylon*) à vontade, a qual atendia às necessidades nutricionais de ovinos em manutenção (SOBRINHO et al., 1996). Também tiveram livre acesso à água potável e mistura mineral apropriada para a manutenção. O período de adaptação teve duração de 30 dias.

No início do período experimental (D {dia} -15, -7 e 0) amostras de sangue foram colhidas de todos os animais para estabelecimento dos valores

iniciais das variáveis zimográficas (média das três colheitas) para comparações e análises estatísticas. Para a indução da ALRA, os animais receberam, via oral, com auxílio de sonda esofágica, 15 gramas de sacarose/kg de peso corpóreo diluída em água morna. Após a indução da ALRA as colheitas de sangue venoso para realização da zimografia foram realizadas em intervalos de 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Posteriormente, as colheitas foram realizadas a cada sete dias completando-se o período de um mês.

A colheita das amostras de sangue foi efetuada, com os animais contidos em tronco tombador (Tronco tombador para ovinos e caprinos ITC do Brasil)<sup>19</sup>, em decúbito dorsal, através de punção da veia jugular externa após a devida antisepsia da região, por sistema a vácuo (BD Vacutainer®)<sup>20</sup> com agulhas de colheita múltipla 25 x 8 mm e tubo de plástico estéril sem anticoagulante e com capacidade de 10 mL. As amostras tiveram as frações de soro separadas por meio de centrifugação a 2.500 g por 10 minutos. O soro foi armazenado a -80°C, em microtubos de plástico estéreis tipo Eppendorf de 1,5 mL, para realização do exame zimográfico.

As análises foram executadas no Laboratório de Patologia Aplicada – LAPAP junto ao Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP/Câmpus de Araçatuba. Os microtubos tipo Eppendorf foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 rpm, a 4°C. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante que foi transferido para outro microtubo para quantificação protéica. Para tal foi utilizado o método do ácido bicinconínico<sup>21</sup>. Foram pipetados 10 µL das amostras em placa de ELISA em duplicata, assim como a curva padrão, também, em duplicata. Adicionaram-se 200 µL da solução de trabalho<sup>22</sup> à placa, a qual foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após este período, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro com absorvância de 562 nm. A concentração de proteínas (µg/mL) foi estimada por meio de equação de regressão, calculando-se, individualmente, a quantidade em µL de amostra suficiente para que fosse obtido 15 µg de proteína por amostra.

---

<sup>19</sup> Patina Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda, Castro, Paraná, Brasil.

<sup>20</sup> BD Diagnostics – Preanalytical Systems, São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>21</sup> BCA 23225, Pierce Biotechnology.

<sup>22</sup> BCA Protein Assay Reagent, Pierce Biotechnology.

A zimografia foi realizada segundo o método descrito por Melo et al. (2011), sendo as amostras de soro sanguíneo homogeneizadas em solução tampão de dissociação (125M Tris-Hcl pH 6.8; 20% glicerol; 4% dodecil sulfato de sódio - SDS; 0,2% azul de Bromofenol) por cinco minutos a temperatura ambiente, e, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida copomerizada a 10% utilizando-se sistema vertical.

Para o preparo do gel utilizaram-se 4mL de gelatina tipo A<sup>21</sup> (1mg/mL), 3,3mL de acrilamida/bisacrilamida (30:0,8), 2,5mL de tris-Hcl pH 8,8 (1M), 100µL de SDS (1%) e a polimerização foi possível pela adição de 4µL de N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED). As placas de vidro contendo os géis foram colocadas em cuba específica com tampão de corrida pH 8,3. Este tampão é constituído por 30,2g de tris base 250mM, 144g de glicina 1,92M, 10g de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e 1000mL de água destilada. Ato contínuo, as amostras foram pipetadas e a corrida iniciada, permanecendo durante três horas a 125V e 80mA.

Após a corrida eletroforética, os géis foram lavados em solução Triton X-100 (2,5%) por 30 minutos a temperatura ambiente, sob constante agitação, seguido de incubação em tampão de ativação enzimática pH 7,6 (6,057g de Tris 50mM; 1,11g de CaCl<sub>2</sub> 10mM; 2 g de Brij-35® 0,2% e 1000ml de água destilada) por 20 horas em estufa a 37°C. Em seguida, foram corados pela solução azul de Comassie<sup>22</sup> 0,5% (1g de azul de Comassie R250 0,5% e 200mL de solução fixadora) por 30 minutos sob agitação. A solução fixadora e também descorante, é constituída de 500mL de álcool metílico, 100mL de ácido acético glacial e 400mL de água destilada. Após a coloração, os géis foram descorados por 30 minutos, também sob constante agitação. Na sequência, os géis foram fotografados em alta resolução, empregando-se fotodocumentador<sup>23</sup>, sendo as bandas analisadas por densitometria para a comparação dos dados obtidos nos diferentes momentos. Assim, as imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ 1.46r<sup>24</sup>, utilizando o método da densidade integrada (expresso em unidade arbitrária). Para normalização entre

---

<sup>21</sup> G8150-100G, Sigma®, St Louis-MO, EUA .

<sup>22</sup> Coomassie Brilliant Blue R250 Dye, Pierce®, Rockford-IL, EUA .

<sup>23</sup> ImageQuant LAS 4000, GE.

<sup>24</sup> Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, EUA.  
<http://rsb.info.nih.gov/ij>.

os géis, foi utilizada amostra de líquido de cães infectados com o vírus da cinomose.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas no tempo, em que o fator testado foi colheita (17 níveis), com os animais constituindo os blocos (10). Também se realizaram análises por regressão (linear, quadrática e cúbica) das variáveis sobre as colheitas. Para tanto, foi utilizado o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS, 2005)<sup>25</sup>. As médias também foram submetidas à análise pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp Câmpus Jaboticabal, sob o Protocolo nº 03888/14.

### 5.3 Resultados

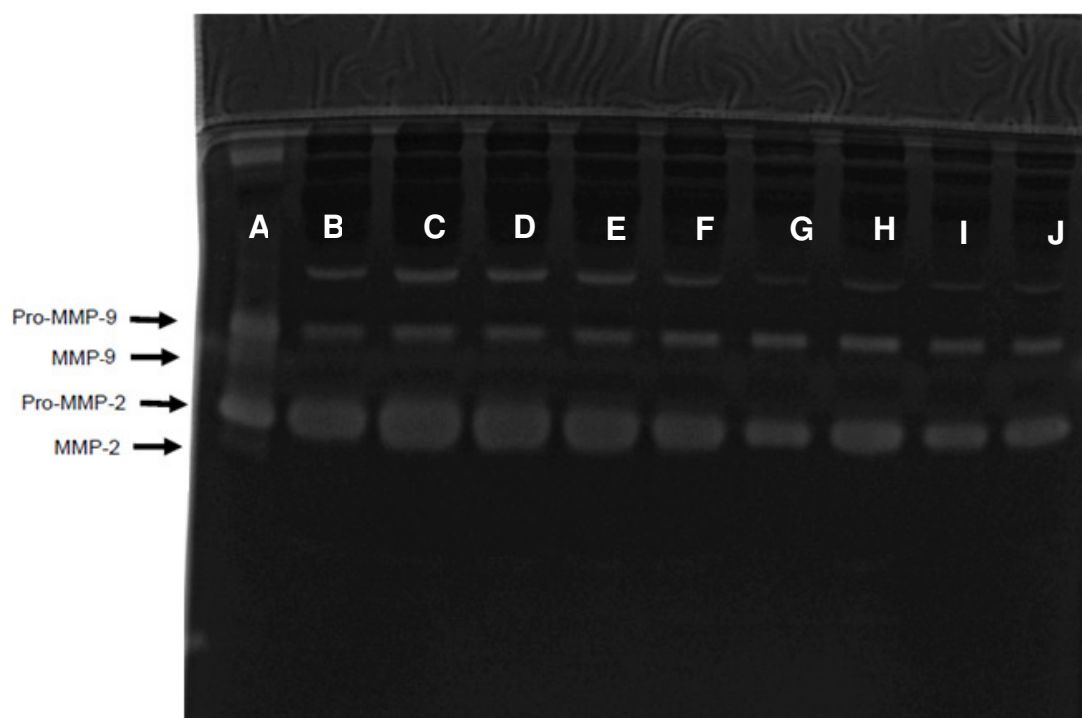
As formas ativas das MMP-2 e MMP-9 não foram identificadas, somente as formas pré-ativadas de ambas. O tempo teve regressão linear com os valores da pró MMP-9 ( $p < 0,005$ ); apresentando o menor e o maior valor com 16 e 96 horas após indução da ALRA, respectivamente e cúbica com a pró MMP-2 ( $p < 0,05$ ); valor mais baixo na 4ª semana e maior valor com 36 horas pós indução. Ambas as formas pró-ativas das MMPs apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey com 32, 36 e 48 horas em comparação ao controle. Durante as manifestações clínicas de ALRA cinco animais apresentaram alternância de apoio dos membros torácicos, relutância em se locomover, permanência em decúbito lateral por tempo prolongado, úngulas sensíveis à palpação e temperatura dos estojos córneos aumentados, caracterizando o processo de laminite aguda que se iniciou entre 24 e 28 horas e foi notória até às 72h após a indução da ALRA.

As metaloproteinasas foram expressas em géis de zimograma (figura 1) por meio de bandas de diferentes pesos moleculares, expressas em Quilodalton (kDa). O programa computacional ImageJ expressou valores para

---

<sup>25</sup> SAS Institute, Statistics Analysis System: user's guide. Version 9.1.3. Cary (NC). SAS Institute Inc; 2005.

as bandas correspondentes a cada uma das MMPs. Os dados da média, desvio padrão e coeficiente de variação dos valores zimográficos encontram-se na Tabela 1. As representações gráficas das equações dos parâmetros obtidos encontram-se na Figura 2.

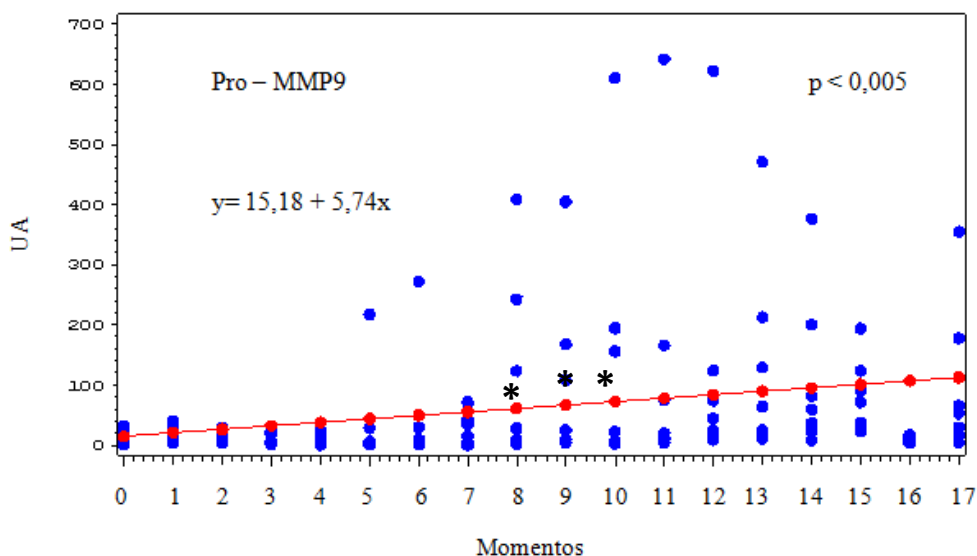


**Figura 1:** Zimograma do soro sanguíneo evidenciando a disposição das bandas da pro-MMP-9, MMP-9, pro-MMP-2 e MMP-2. Coluna A: controle positivo (líquor de cão infectado com o vírus da cinomose), colunas B, C e D (colheitas 15 dias, 7 dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose), coluna E (4 hs), coluna F (8hs), coluna G (12 hs), coluna H (16hs), coluna I (20hs) e coluna J (24hs) após fornecimento da sacarose a um dos animais utilizados no estudo.

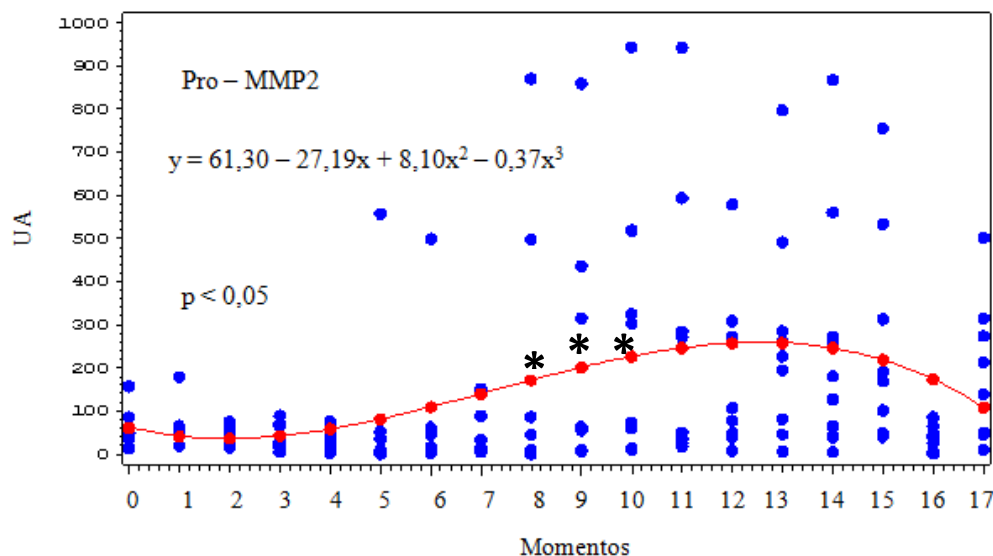
**Tabela 1:** Média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação (CV) das variáveis zimográficas de ovinos com ALRA: Pró MMP- 9 (pró-metaloproteinase 9) e Pro MMP-2 (pro metaloproteinase 2), expressos em unidades arbitrárias. Momentos de colheita: controle\*, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 2ª semana, 3ª semana e 4ª semana após administração de sacarose via oral.

Colheitas	Pró MMP-9	Pró MMP-2
Controle*	13,42 $\pm$ 4,09	55,03 $\pm$ 16,68
04 hs	14,81 $\pm$ 5,51	64,49 $\pm$ 19,77
08 hs	15,76 $\pm$ 3,82	48,50 $\pm$ 7,37
12 hs	11,27 $\pm$ 3,14	39,45 $\pm$ 11,03
16 hs	8,64 $\pm$ 3,08	29,62 $\pm$ 9,91
20 hs	32,78 $\pm$ 26,59	87,49 $\pm$ 67,45
24 hs	41,13 $\pm$ 33,17	87,35 $\pm$ 59,33
28 hs	24,27 $\pm$ 9,96	44,06 $\pm$ 21,09
32 hs	102,63 $\pm$ 53,08	216,51 $\pm$ 127,82
36 hs	103,56 $\pm$ 55,51	305,37 $\pm$ 117,56
48 hs	125,39 $\pm$ 74,32	251,13 $\pm$ 105,40
72 hs	117,67 $\pm$ 77,35	251,07 $\pm$ 107,75
96 hs	131,64 $\pm$ 83,11	180,64 $\pm$ 69,06
120 hs	125,10 $\pm$ 54,82	266,13 $\pm$ 82,60
144 hs	102,89 $\pm$ 44,43	263,95 $\pm$ 93,95
2ª semana	74,54 $\pm$ 21,22	244,24 $\pm$ 83,21
3ª semana	9,83 $\pm$ 1,73	39,16 $\pm$ 9,88
4ª semana	10,57 $\pm$ 4,75	19,37 $\pm$ 5,91
CV	185,32	139,78

\*Controle: média das colheitas -15 dias, -7 dias e imediatamente antes do início do fornecimento da sacarose



**Figura 2.** Análise de regressão da expressão (em unidades arbitrárias) da forma pró ativa da MMP 9 de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (4h), 2 (8h), 3 (12h), 4 (16h), 5 (20h), 6 (24h), 7 (28h), 8 (32h), 9 (36h), 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2ª semana), 16 (3ª semana) e 17 (4ª semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.



**Figura 3.** Análise de regressão da expressão (em unidades arbitrárias) da forma pró ativa da MMP 2 de ovinos com ALRA. Momentos de colheita: 0 (controle), 1 (4h), 2 (8h), 3 (12h), 4 (16h), 5 (20h), 6 (24h), 7 (28h), 8 (32h), 9 (36h), 10 (48h), 11 (72h), 12 (96h), 13 (120h), 14 (144h), 15 (2ª semana), 16 (3ª semana) e 17 (4ª semana). \*: momentos em que as médias apresentaram diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de significância.

#### 5.4 Discussão

Este estudo em ovinos é pioneiro, portanto, uma discussão acurada deixa a desejar, haja vista que na literatura compilada existem estudos semelhantes apenas em equinos com laminite. As formas pró-ativas das MMP-2 e MMP-9 apresentaram seus valores aumentados principalmente entre os períodos de 32 até 144 horas, coincidindo com a manifestação clínica da laminite aguda nos animais. As formas ativas de ambas as enzimas não foram encontradas no soro dos animais, possivelmente o processo inflamatório não foi de intensidade suficiente para que essas enzimas fossem ativadas através da clivagem proteolítica. Não foi possível a dosagem das MMPs provenientes de tecido laminar dos animais nesse estudo, pois os ovinos apresentam o casco muito frágil, não sendo possível a realização da biopsia para obtenção do tecido laminar, como é realizada em bovinos e equinos.

As MMPs de tecido laminar de equinos foram isoladas pela primeira vez em casos clínicos de laminite, em que foi descoberto que o tecido laminítico contém atividade aumentada de MMP-2 e MMP-9 em comparação a tecidos saudáveis (POLLITT et al., 1998). Sabe-se que quatro fatores podem desencadear a ativação de MMPs em equinos com laminite, sendo eles a

liberação de aminas pela descarboxilação bacteriana dos aminoácidos, liberação de endotoxinas oriundas da lise de bactérias, liberação de exotoxinas por bactérias gram-positivas e fatores relacionados à obesidade (BAILEY et al., 2004). A degradação laminar podal causada pelas MMPs tem sido associada à resposta inflamatória devido à liberação de fatores de ativação de MMPs da corrente sanguínea para os dígitos, contribuindo para o processo degenerativo (CLUTTERBUCK et al., 2010).

Em equinos sabe-se que algumas formas de laminite podem ter ligações com a liberação de toxinas do intestino para a corrente sanguínea, como por exemplo, quando lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias Gram-negativas mortas levam à liberação de mediadores inflamatórios (MENZIES-GOW et al., 2004), podendo estimular a ativação de MMPs no dígito equino (CLUTTERBUCK et al., 2010). Acredita-se que esse também seja o motivo pelo qual ocorra a liberação das formas tanto pró-ativas das MMPs em ovinos com acidose, pois a diminuição do pH ruminal para valores próximos à 5,8 leva à mudanças na composição microbiana, principalmente ocorrendo morte das bactérias Gram Negativas e, conseqüente liberação dos lipopolissacarídeos presentes na parede celular, levando à possível ocorrência de resposta inflamatória (GOZHO et al., 2005). Outro importante fator é o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, entre elas o *Streptococcus bovis*, bactéria classificada como Gram positiva (ASCHENBACH; GABEL, 2000), o que pode levar à liberação de exotoxinas e conseqüente ativação das MMPs.

Loftus et al. (2009) ao induzirem laminite em equinos utilizando sobrecarga de carboidratos não encontraram alterações da pró MMP2, resultados estes que não corroboram com o presente estudo. Aumentos da pró MMP-9 são relatados em equinos por Johnson et al. (1998) e Loftus et al. (2009), embora, Medina-Torres et al. (2011) ao avaliar a possível relação entre a isquemia nos tecidos laminares e a possível produção e/ou ativação das MMPs, relataram diminuição nos valores da pró MMP-9.

Em equinos é sabido que a expressão da pró MMP-9 está diretamente relacionada com a presença de citocinas pró-inflamatórias, as quais atraem células inflamatórias para o tecido laminar e ocasionam a liberação e ativação da pró MMP-9 (CLUTTERBUCK et al., 2010), desta forma a expressão dessa enzima pode estar relacionada ao grau de laminite sofrida pelos animais

através da indução da ALRA, o que provavelmente levou a liberação de mediadores inflamatórios sistêmicos.

## **5.5 Conclusão**

As formas pró-ativas das MMP-2 e MMP-9 foram detectadas entre 32 e 144 horas após indução da ALRA, período em que se verificou manifestação clínica da laminite aguda nos animais.

## 5.6 Referências

ASCHENBACH, J.R.; GABEL, G. Effect and absorption of histamine in sheep rumen: Significance of acidotic epithelial damage. **Journal of Animal Science**, v.78, p.464-470, 2000.

BAILEY, S.R.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. **The Veterinary Journal**, v.167, p.129-142, 2004.

BERGSTEN, C.; MULLING, C. Some reflections on research on bovine laminitis, aspects of clinical and fundamental research. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM & CONFERENCE ON LAMENESS IN RUMINANTS, 13., 2004, Maribor. **Anais eletrônicos**...[on line]. Maribor, 2004.

CLUTTERBUCK, A. L.; HARRIS, P.; ALLAWAY, D.; MOBASHERI, A. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **The Veterinary Journal**, v.183, p.27-38, 2010.

COOK, N. B.; NORDLUND, K. V.; OETZEL, G. R. Environmental influences on claw horn lesions associated with laminitis and subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, suplemento 1, p. E36-E46, 2004.

DANSCHER, A. M.; ENEMARK, J. M. D.; TELEZHENKO, E.; CAPION, N.; EKSTROM, C. T.; THOEFNER, M. B. Oligofrutose overloads induces lameness in cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.2, p.607-616, 2009.

GOZHO, G. N.; PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; KENNEDY, A. D.; WITTENBERG, K. M. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, n.4, p.1399-1403, 2005.

HENDRY, K. A. K.; KNIGHT, C. H.; GALBRAITH, H.; WILDE, C. J. Basement membrane integrity and keratinization in healthy and ulcerated bovine horn tissue. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.70, n.1, p.19-27, 2003.

HILL, N. P.; MURPHY, P. E.; NELSON, A. J.; MOUTTOTOU, N.; GREEN, L. E.; MORGAN, K. L. Lameness and foot lesions in adult British dairy goats. **Veterinary Record**, London, v.141, p.412-416, 1997.

HOLZHAUER, M.; HARDENBERG, C.; BARTELS, C. J. M. Herd and cow level prevalence of sole ulcers in the Netherlands and associated-risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.85, n.1-2, p.125-135, 2008.

JACKSON, P. G. G.; COCKCROFT, P. D. **Clinical examination of farm animals**. Malden: Blackwell Science, 313 p, 2002.

JOHNSON, P. J.; TYAGI, S. C.; KATWA, L. C.; GANJAM, V. K.; MOORE, L. A.; KREEGER, J. M.; MESSER, N. T. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. **Veterinary Record**, v.142, p.392-396, 1998.

KNOTT, L.; TARLTON, J. F.; CRAFT, H.; WEBSTER, A. J. F. Effects of housing, parturition and diet change on to biochemistry and biomechanics of the support structures of the hoof of dairy heifers. **The Veterinary Journal**, v.174, n.2, p.277-287, 2007.

LOFTUS, J. P.; JOHNSON, P. J.; BELKNAP, J. K.; PETTIGREW, A.; BLACK, S. J. Leukocyte-derived and endogenous matrix metalloproteinases in the lamellae of horses with naturally acquired and experimentally induced laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, p.221-230, 2009.

MEDINA-TORRES, C. E.; MASON, S. L.; FLOYD, R. V.; HARRIS, P. A.; MOBASHERI, A. Hypoxia and a hypoxia mimetic up-regulate matrix metalloproteinase 2 and 9 in equine laminar keratinocytes. **The Veterinary Journal**, v.190, p.54-59, 2011.

MENDES, H. F. M.; FALEIROS, R. R.; FERREIRA, P. M.; ALVES, G. E. S.; ZAMBELLI, B. L.; LIMA, I. R.; ARAZALES, J. R.; MAIA, T. S.; MOREIRA, D. O. Histopathology of the hoof dermo-epidermal junction in dairy cows with and without clinical signs associate to laminitis. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 26., 2010, Santiago. **Anais eletrônicos...**[on line]. Santiago, 2010.

MENZIES-GOW, N.J.; BAILEY, S.R.; KATZ, L.M.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. Endotoxin induced digital vasoconstriction in horses: associated changes in plasma concentrations of vasoconstrictor mediators. **Equine Veterinary Journal**, v.36, p.273–278, 2004.

MIILS, J. A.; ZARLENGA, D. S.; HABECKER, P. L.; DYER, R. M. Age, segment and horn diseaseaffect expression of cytokines, growth factors, and receptors in the epidermis and dermis of the bovine claw. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.12, p.5877-5987, 2009.

NAGASE, H.; WOESSNER, J.R.F. Matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, n.31, p.21491-21494, 1999.

NOCEK, J. E. Bovine Acidosis: Implications on Laminitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 1005-1028, 1997.

POLLITT, C. C.; PASS, M. A.; POLLITT, S. Batimastat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. **Equine Veterinary Journal**, v.26, p.119-124, 1998.

RAFFETTO, J.D.; KHALIL, R.A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v.75, p.346-359, 2008.

SAS Institute. **Statistics Analysis System: user's guide**. Version 9.1.3. Cary (NC). SAS Institute Inc, 2005.

SOBRINHO, A. G. S.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L.; SUSIN, I.; SILVA, J. F. C.; TEIXEIRA, J. C.; BORBA, M. F. S. **Nutrição de ovinos**. 1<sup>st</sup> ed. Funep, Jaboticabal, 1996.

SELLNER, J.; LEIB, S.L. In bacterial meningitis cortical brain damage is associated with changes in parenchymal MMP-9/TIMP-1 ratio and increased collagen type IV degradation. **Neurobiology of Disease**, v.21, p.647-656, 2006.

THOFNER, M. B.; POLLIT, C. C.; VAN EPS, A. W.; MILINOVICH, G. J.; TROTT, D. J.; WATTLE, O.; ANDERSEN, P. H. Acute bovine laminitis: a new induction model using alimentary oligofrutose overload. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.9, p.2932-2940, 2004.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v.92, p.827-839, 2003.

WINTER, A. Lameness in sheep 2. Treatment and control. **In Practice**, London, v.26, p.130-139, 2004b.

WOESSNER Jr, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB Journal**, v.5, n.8, p.2145-2154, 1991.