

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
Campus de Araçatuba

AMANDA THAÍS PIZANI

***HIPOFERREMIA, A CONSEQUÊNCIA DA ENDOTOXEMIA
EXPERIMENTAL EM OVINOS***

Araçatuba
2020

AMANDA THAÍS PIZANI

***HIPOFERREMIA, A CONSEQUÊNCIA DA ENDOTOXEMIA
EXPERIMENTAL EM OVINOS***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientadora: Prof.^a Ass. Dra. Flávia de Almeida Lucas

Coorientador: Prof. Adj. Luiz Claudio Nogueira Mendes

Araçatuba

2020

P695h Pizani, Amanda Thaís
Hipoferrêmia, a consequência da endotoxemia experimental em ovinos / Amanda Thaís Pizani. -- Araçatuba, 2020 26 p. : tabs. + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Flávia de Almeida Lucas
Coorientador: Luiz Claudio Nogueira Mendes

1. Endotoxemia. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Pequenos ruminantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Hipoferremia, a consequência da endotoxemia experimental em ovinos

AUTORA: AMANDA THAÍS PIZANI

ORIENTADORA: FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

COORIENTADOR: LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. FERNANDA BOVINO

Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA VALÊNTE FERREIRA

Departamento de Ciências da Saúde / Centro Universitário Toledo - UNITOLEDO - Araçatuba/SP

Araçatuba, 21 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais um objetivo alcançado.

Agradeço aos meus pais por estarem ao meu lado, mesmo longe fisicamente, sempre apoiando e dando forças para não desistir.

Agradeço ao meu noivo pela compreensão e paciência, e por não medir esforços para conseguirmos juntos realizar nossos sonhos.

Agradeço ao Professor Adjunto Luiz Claudio Nogueira Mendes pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e pela confiança depositada em mim.

Agradeço à Professora Adjunta Juliana Regina Peiró pelos ensinamentos e instruções ao longo do trabalho.

Agradeço à Professora Assistente Flávia de Almeida Lucas pela orientação.

Agradeço aos amigos Marilene, Matheus, Rafaela, Daniela, Lucas e Tatiane por estarem disponíveis a me ajudar com as dúvidas a respeito do trabalho, sempre acompanhados de um sorriso e um café.

Agradeço as companheiras e amigas de laboratório, Nathália, Tainá e Gabriela, por sustentarem a rotina quando eu precisei estar ausente e por compartilhar as dores e alegrias de todos os dias.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-SP, pela estrutura física concedida assim como o apoio da Coordenação e equipe de Pós-Graduação.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

*“Todo dia eu peço a Deus
saúde pra trabalhar
que me dê sabedoria
e coragem pra lutar
e que eu perceba, sim,
que só vem até mim
aquilo que eu for buscar.”
(Bráulio Bessa Uchôa)*

PIZANI, A.T. **Hipoferrêmia, a consequência da endotoxemia experimental em ovinos.** 2020. 28 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

A ovinocultura aumentou nos últimos dez anos no Brasil e, assim como qualquer outra atividade pecuária, o bem-estar animal deve ser priorizado para que sejam obtidos produtos de qualidade para o consumidor e lucro para o produtor. No presente estudo foi realizada a indução experimental de endotoxemia por meio da inoculação de baixa dose de Lipopolissacarídeos (LPS), tendo como objetivo investigar se tal exposição é capaz de causar alterações na concentração plasmática de ferro, bem como em parâmetros hematológicos em ovinos da raça Suffolk. Foram utilizados nove animais, sendo que três destes fizeram parte de ambos grupos. Os animais foram separados em dois grupos: o grupo controle, constituído por seis animais que receberam solução fisiológica, e grupo experimental, constituído por seis animais, que receberam o LPS. Constatou-se que a endotoxemia experimental com baixa dose de LPS induziu alterações nas variáveis hematológicas como diminuição inicial da contagem total e diferencial de leucócitos nas primeiras quatro horas após a infusão, seguida de leucocitose, 12 horas após a infusão. Além disso, a exposição ao LPS também foi capaz de induzir hipoferrêmia após 12 horas, com retorno ao intervalo de referência ao final do período estudado.

Palavras-chave: Endotoxemia. Lipopolissacarídeos. Pequenos ruminantes.

PIZANI, A.T. **Hypoferremia, the consequence of experimental endotoxemia in sheep.** 2020. 28 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

Sheep farming has been growing in recent years in Brazil and, like any other livestock activity, animal welfare must be prioritized in order to obtain quality products for the consumer and profit for the producer. In the present study, an experimental induction of endotoxemia was performed by low-dose lipopolysaccharide (LPS) inoculation, aiming to investigate whether such minimal exposure is capable of causing changes in plasma iron concentration as well as hematological parameters in Suffolk sheep. Nine animals were used, three of which were part of both groups. The animals were separated into two groups: the control group, consisting of six animals that received physiological solution, and experimental group, consisting of six animals, which received the LPS. It was found that experimental low-dose LPS endotoxemia induced changes in hematological variables such as initial decrease in total and differential leukocyte count in the first four hours after infusion, followed by leukocytosis 12 hours after infusion. In addition, exposure to LPS was also able to induce hypoferremia after 12 hours, returning to the reference range at the end of the study period.

Keywords: Endotoxemia. Lipopolysaccharides. Small ruminants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Média \pm DP da temperatura corporal média obtida da região ocular (FLIR i60) nos grupos controle (linha escura) e experimental (linha clara), no momento antes da administração, após quatro, 12, 24, 42, 48 e 72 horas.....	17
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Médias \pm desvio padrão de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos dos grupos controle (n=6) e experimental (n=6) no momento antes da administração, após quatro, 12, 24, 48 e 72 horas.....19
- Tabela 2. Médias \pm desvio padrão do ferro sérico dos grupos controle (n=6) e experimental (n=6) no momento antes da administração, após quatro, 12, 24, 48 e 72 horas.....19
- Tabela suplementar 1. Médias \pm desvio padrão dos parâmetros hematológicos nos animais do grupo controle (n=6) e experimental (n=6) nos momentos antes da administração, após 4, 12, 24, 48 e 72 horas.....27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODO	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4 CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
ANEXO.....	29

1 INTRODUÇÃO

Entre os diversos ramos do agronegócio, a ovinocultura vem se destacando nos últimos anos devido ao seu rápido giro financeiro. O comércio de produtos derivados destes animais estabeleceu-se a partir do século XX com a valorização da lã no mercado internacional e na região sul do Brasil é uma das principais atividades pecuárias (VIANA; SILVEIRA, 2009).

A produção de ovinos possui importância econômica e social, tanto para produtores que investem em rebanhos de genética e/ou comercial, quanto para os produtores de subsistência (SILVA; SILVA; GAMEIRO, 2019). Atualmente, no Brasil, há um rebanho estimado em 18,4 milhões de cabeças de ovinos e a maioria é produzida por sistemas extensivos (IBGE, 2017).

O estado de São Paulo, apesar de não ter notoriedade na criação, possui grande potencial para a atividade, visto que é considerado o maior mercado de carne ovina do país, incentivando para que os produtores busquem melhorias na criação e no manejo dos animais visando um melhor rendimento das carcaças (OLIVEIRA, 2017).

Para que as exigências comerciais sejam atendidas e proporcionem lucro aos produtores, as necessidades dos animais devem ser supridas para que a produção seja eficiente, tenham boa qualidade de vida e forneçam produtos de qualidade para os consumidores. O bem-estar animal exige que haja um programa de sanidade, com prevenção e tratamento de doenças, alimentação e manejo corretos, além de abate ético (FREITAS; QUIRINO; BASTOS, 2017).

A busca pelo aumento da produção e a necessidade da diminuição dos custos da produção acarretaram em desenvolvimento de tecnologias nos sistemas de produção, entretanto, além da importância econômica, os ovinos são muito utilizados também como modelo experimental em pesquisas pois suas respostas fisiológicas são semelhantes à dos seres humanos (BUSTAMANTE et al., 2009).

Dentre os fatores que podem reduzir o desempenho dos sistemas de produção animal estão as parasitoses e infecções bacterianas que são as principais causas de morbidade e mortalidade em ovinos (DUFF; GALYEAN, 2007).

Nos ruminantes, a microbiota gastrintestinal é parte essencial do seu sistema, pois ela auxilia na absorção de nutrientes e na imunidade, sendo constituída

por uma população microbiana diversificada e suscetível a um desequilíbrio que pode trazer prejuízos ao organismo (MORGAVI et al., 2000; MALMUTHUGE; GRIEBEL; GUAN, 2015).

Consequências importantes deste desequilíbrio são a presença de endotoxinas bacterianas na corrente sanguínea que podem levar a sepse, que é determinada quando resposta imune do organismo é incapaz de controlar efetivamente a infecção local e resulta na ativação do sistema imunológico, além da liberação descontrolada de mediadores endógenos, antecipando a ocorrência de uma cascata de alterações metabólicas e hemodinâmicas (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005; VAALA; HOUSE, 2006).

O principal grupo de bactérias encontrado no líquido ruminal são as gram-negativas, dentre elas, a *Escherichia coli*, que possui fatores de virulência importantes denominadas endotoxinas e exotoxinas, sendo as endotoxinas componentes da membrana e as exotoxinas proteínas produzidas e excretadas pelo microrganismo (MORRIS & SOJKA, 1985).

Um dos componentes da parede celular de bactérias gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS), é responsável por desencadear essa resposta inflamatória generalizada. Este componente está relacionado também com o choque séptico, que é caracterizado pela vasodilatação periférica acompanhada de aumento da permeabilidade vascular, processo que ocasiona a diminuição drástica da perfusão sanguínea (BONE, 1991; MORRISON; RYAN 1987).

O LPS derivado de *E.coli* tem sido extensivamente usado como modelo para simular choque séptico por seus resultados serem relativamente semelhantes ao que acontece em uma bacteremia sistêmica (POST et al., 2003), entretanto, sabe-se que baixas doses de LPS são consideradas altamente tóxicas para determinadas espécies, como o ser humano. Uma única célula de *E. coli*, contém aproximadamente $3,5 \times 10^6$ moléculas de LPS (VAN AMERSFOORT et al., 2003).

Estruturalmente, cada molécula de LPS possui três domínios: a região "O" de polissacarídeo polar, que se projeta em direção ao ambiente aquoso extracelular, a região "A" lipídica hidrofóbica, que está quase completamente submersa à membrana externa da bactéria e, por fim, a região central envolta por ácido polissacarídeo ligando as demais regiões (AURELL; WISTROM, 1998; ROBERT, 2006).

A região “O” do LPS é variável e contém antígenos específicos para cada cepa bacteriana, enquanto a região central glicolípídica é relativamente constante entre as bactérias e é mediadora da maioria dos efeitos tóxicos que as endotoxinas produzem. A liberação de grandes agregados de LPS e proteínas de membrana acontecem quando há proliferação ou morte das bactérias por meio de uso de antibióticos ou pela ação do sistema complemento do hospedeiro, além disso, o lipídio “A” é o responsável pela indução dos efeitos fisiopatológicos desta endotoxina (BENTALA et al., 2002; KOYAMA, 1999; ROBERT, 2006).

A endotoxina pode chegar à circulação sanguínea e causar sinais clínicos quando há desequilíbrio ou dano na pele ou mucosa que esteja infectada por bactérias gram-negativas, entretanto, a endotoxina é comprovadamente onipresente no ambiente, isolada ou como componente das bactérias e é normalmente eliminada pelo organismo quando este se encontra em bom estado imunológico (ROBERT, 2006).

Quando em contato com o sangue, uma parte das endotoxinas são neutralizadas por anticorpos anti-LPS que existem devido a exposições prévias às endotoxinas, entretanto, a maioria liga-se às proteínas de ligação de LPS (LBL) presentes na corrente sanguínea (AURELL; WISTROM, 1998). Este complexo endotoxina-LBL liga-se ao CD14 nas membranas de macrófagos intravasculares e de monócitos e, tanto o CD14 solúvel no plasma, quanto o ligado à membrana funcionam como receptores de LPS (BREKKE, et al., 2008; ROBERT, 2006).

O reconhecimento de produtos bacterianos por meio do sistema imune inato é uma condição estritamente importante para a produção de uma resposta efetiva com o recrutamento de leucócitos para o local de infecção e remoção bacteriana, no entanto, em uma sepse por bactérias gram-negativas, a ativação do sistema imune também pode causar uma resposta inflamatória patológica (MCAVOY et al., 2011).

Além da resposta inflamatória, a presença de toxinas bacterianas está acompanhada pela hipoferrêmia, um mecanismo defensivo primitivo que permite a redução plasmática de ferro, minimizando sua disponibilidade aos patógenos que utilizariam este componente para compor citocromos e outras enzimas essenciais para a sua sobrevivência (DESCHEMIN; VAULONT, 2013).

O ferro é um elemento essencial para a entrega adequada de oxigênio aos tecidos e um componente indispensável de armazenamento e transporte de proteínas,

como a hemoglobina, mioglobina ou citocromos, envolvidos na respiração mitocondrial (BURRATTI et al. 2014).

O equilíbrio entre os processos de absorção, reciclagem, mobilização e utilização do ferro é mantido por um eficiente mecanismo de controle. A célula intestinal possui proteínas envolvidas no processo de absorção, no interior da célula o ferro é liberado e transportado ao plasma pela transferrina e, por fim, fica estocado nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea nas formas de ferritina e hemossiderina (LONGO, 2016).

Quando o organismo está enfrentando um processo inflamatório, infeccioso ou até mesmo a presença de endotoxinas na circulação sanguínea, há um aumento da concentração sistêmica de interleucina 6 (IL-6), que estimula diretamente os hepatócitos a liberarem hepcidina, que bloqueia o efluxo de ferro dos macrófagos resultando em hipoferremia, sendo uma resposta particularmente importante durante a fase inicial da infecção, antes que outros componentes da imunidade inata e adaptativa sejam mobilizados (GANZ, 2003; KRAUSE, et al. 2000).

Determinadas linhagens de *E. coli* possuem mecanismos de captação exógena do ferro, como a síntese de exoproteínas denominadas sideróforos e hemolisinas. Por ser um elemento essencial no metabolismo bacteriano, a capacidade da *E. coli* em competir e disponibilizar o ferro no organismo animal, ou até mesmo adaptar-se à multiplicação em baixas concentrações do íon é considerada um importante mecanismo de virulência (SUSSMAN, 1997).

Poucos estudos descrevem a magnitude e conexão entre os parâmetros inflamatórios após a exposição a baixas doses de LPS de *E. coli* em ovinos, uma vez que existe uma grande variabilidade dos valores de referência para a hematologia e bioquímica clínica desses animais em diferentes regiões do mundo (BRAUN; TRUMEL; BÉZILLE, 2010).

Nesta perspectiva, o objetivo desse estudo é investigar se a indução experimental de endotoxemia por LPS é capaz de causar alterações na concentração plasmática de ferro, bem como em parâmetros hematológicos em ovinos.

2 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi devidamente aprovado pelo comitê de ética animal (CEUA Nº 378/2018) da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, campus Araçatuba-SP.

Foram utilizadas nove ovelhas mestiças com idade média de 1 a 5 anos, sendo que três animais fizeram parte de ambos grupos. Todos os animais incluídos neste estudo foram considerados ovinos saudáveis com base nos achados clínicos e laboratoriais. Durante o período experimental, que teve a duração de 30 dias, permaneceram alojados em baias, alimentados com silagem de milho, sal mineral para ovinos e água de boa qualidade à vontade.

Foram distribuídos em dois grupos; o grupo controle (n=6), os quais receberam solução fisiológica (NaCl 0,9%) e grupo experimental (n=6), que receberam o LPS de *E. coli*. Três animais do grupo controle que receberam solução fisiológica, após um intervalo de 15 dias, também receberam o LPS, tornando-se parte do n amostral do grupo experimental.

Os animais do grupo experimental receberam LPS (*Escherichia coli* O55:B5: Sigma, St. Louis, MO) na dose de 400 ng/kg, considerada a dose mínima capaz de causar resposta fisiológica no organismo ainda preservando o seu bem-estar (BADIAL; et al., 2011).

Para o preparo da solução, o LPS foi inicialmente pesado para cada animal e diluído em 2 ml de solução fisiológica, seguida de sonicação (Kondortech® CD-4820) em três pulsos de 480 segundos cada. Para a administração, o LPS preparado foi diluído em um volume final de 500 ml de solução fisiológica.

A administração das soluções foi realizada às 7:00 da manhã, seguindo as coletas conforme os momentos programados. A infusão foi controlada por bomba peristáltica através da veia jugular canulada com cateter 16G para permitir a infusão contínua durante 30 minutos, sendo que, ambos grupos receberam o mesmo volume, nas mesmas condições.

Foi realizado exame geral e coleta de sangue venoso dos animais imediatamente antes do início e quatro, 12, 24, 48 e 72 horas após a infusão de solução fisiológica ou solução com LPS (M0, M4, M12, M24, M48 e M72, respectivamente). Os parâmetros avaliados foram: temperatura corporal, perfil

hematológico (hemácias totais, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e proteína plasmática total) e dosagem do ferro sérico.

A aferição da temperatura média corporal foi realizada por meio de termografia infravermelha (TIF) (FLIR® i60) com a intenção de diminuir o estresse ao ser necessário conter o animal caso fosse utilizada a temperatura retal. Estudos demonstraram que a região ocular é a que apresenta melhor correlação significativa com a temperatura retal, sendo, portanto, a região escolhida para aferição da temperatura (DE DIEGO et al., 2013). Todas as imagens obtidas foram interpretadas através do software FLIR® Tools, desenvolvido pela FLIR® Systems, Inc.

Para o hemograma, as amostras de sangue foram coletadas pelo sistema a vácuo em frascos de vidro siliconizados com a capacidade de 5 ml contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e processadas em analisador hematológico automatizado BC 5000 VET (Mindray®). Distensões sanguíneas de cada amostra foram confeccionadas manualmente e coradas com o corante panótico rápido (Laborclin®), segundo instruções do fabricante. A contagem diferencial relativa de leucócitos foi realizada e conferida a partir de 200 células, aumentando de acordo com o número total, em microscópio óptico (GARCIA-NAVARRO, 1994).

Para a dosagem do ferro sérico, foram coletadas amostras de sangue total em tubos de vidro siliconizados, sem nenhum tipo de anticoagulante, centrifugadas a 1000 G durante 10 minutos, obtendo-se alíquotas de soro que foram armazenadas em microtubos de 1,5 ml, previamente identificados, e congeladas a -80°C, até o momento da análise. O soro foi processado em aparelho de bioquímica semi-automatizada (Bioplus®), utilizando o reagente Ferro Sérico (Ref 38-80, Lote 1802, Labtest®), sendo as dosagens realizadas em duplicata segundo instruções do fabricante.

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias. Foram submetidos à análise da variância (ANOVA) com medidas repetidas entre os momentos. A comparação entre dois grupos de dados numéricos foi feita após teste de Tukey para comparação entre as médias. Os dados numéricos foram apresentados em média \pm desvio padrão. As análises foram feitas com auxílio de um programa computacional estatístico (SAS University Edition, SAS Institute, Carey, NC, USA, 2019) sendo significativo quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que se refere a aferição da temperatura corporal, o grupo experimental e o grupo controle apresentaram temperatura corporal média (TM°) de $37,5 \pm 0,6$ e $37,9 \pm 0,5$ °C, respectivamente, antes da inoculação. No grupo controle ($n=6$), após a administração de solução fisiológica, a TM° manteve-se dentro do intervalo de referência ($TIF < 38.54^{\circ}C$) (DE DIEGO et al., 2013). No grupo experimental, foi observada uma variação mínima no M4, quatro horas após a infusão de LPS (Figura 1).

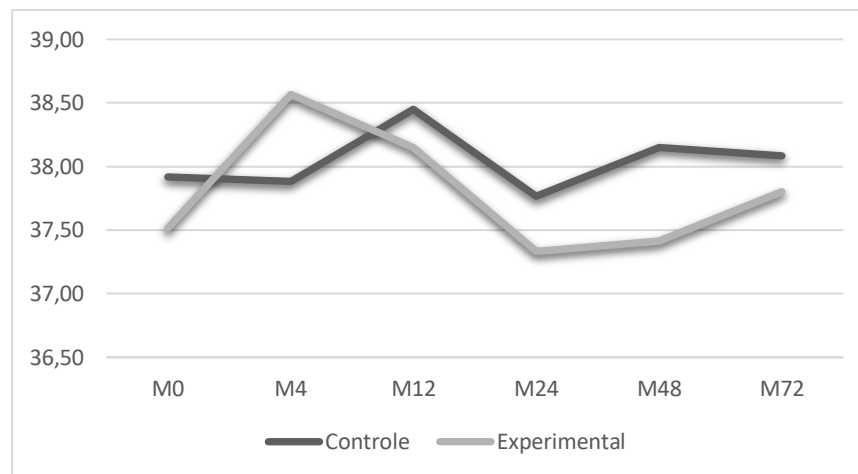


Figura 1. Média \pm DP da temperatura corporal média obtida da região ocular (FLIR i60) nos grupos controle (linha escura) e experimental (linha clara), no momento antes da administração, após quatro, 12, 24, 42, 48 e 72 horas.

Os parâmetros hematológicos completos do grupo controle e experimental estão apresentados na Tabela Suplementar 1. A contagem média da série vermelha em ambos grupos apresentou valores dentro do intervalo de referência (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 1986) em todos os momentos, não apresentando diferença estatística entre grupos ou momentos. Resultados semelhantes foram observados em coelhos (PEÑAILILLO et al., 2016), bezerras (BIENIEK et al., 1998) e ovelhas (RIQUELME et al., 2018).

A contagem média de leucócitos totais (Tabela 1) dos animais de ambos grupos se apresentou dentro dos valores de referência ($4,0-12,0/\mu L$) (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 1986) no momento antes da infusão (M0), possibilitando considerar que,

antes do experimento, todos os animais encontravam-se com valores hematológicos normais.

No M4 a contagem média de leucócitos totais do grupo experimental ($4,7 \pm 1,9/\mu\text{L}$) apresentou uma diminuição em relação ao valor basal ($p=0,1112$) sendo significativa estatisticamente apenas quando comparada com o grupo controle ($p=0,0059$). A diminuição do total de leucócitos é acompanhada por uma diminuição no total de linfócitos, no mesmo momento, cujo valor foi inferior a 45,8% em relação ao valor basal ($p<0,0001$).

A diminuição inicial (M4) do total de leucócitos foi seguida por leucocitose no M12 ($12,1 \pm 2,9/\mu\text{L}$ $p=0,0007$) e M24 ($14,4 \pm 3,9/\mu\text{L}$ $p<0,0001$), 12 e 24 horas após a infusão do LPS. O aumento da contagem total de leucócitos pode estar relacionado à neutrofilia no M12 ($7417,8 \pm 1761,5$ $p<0,0001$) e ao aumento discreto de monócitos no M12 ($581,8 \pm 185,1/\mu\text{L}$ $p=0,0020$), como mostrado na Tabela 1.

A infusão de LPS em coelhos também resultou em uma diminuição inicial dos leucócitos, após 4 horas, seguida de um aumento entre 12 e 24 horas (PEÑAILILLO et al., 2016). Os mesmos resultados foram observados em ovelhas tratadas com LPS, com uma leucopenia seguida por leucocitose entre 8 e 24 horas após a infusão (RIQUELME et al., 2018). Esta diminuição da contagem total nos primeiros momentos após a infusão pode ser explicada devido à infiltração e armazenamento de células dessa linhagem em órgãos como o fígado e baço, diminuindo a sua disposição no sangue periférico (GRYDLEY et al., 2007) e pelo recrutamento e marginalização dessas células a fim de alcançarem o sítio inflamatório (BROWN et al., 2006). O aumento subsequente dos leucócitos pode ser explicado pelo efeito sinérgico entre o LPS e a liberação de corticoides no organismo que leva o animal a produzir um nível mais elevado de citocinas, estimulando a liberação de células imaturas da medula óssea para a circulação (ALTENBURG et al., 2002).

O total de leucócitos nos animais do grupo controle permaneceu dentro do intervalo de referência durante todo o período de amostragem ($p>0,05$) (Tabela 1). A normalização da contagem nos animais do grupo experimental ocorre a partir do M48 ($9,1 \pm 1,8$) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias \pm desvio padrão de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos dos grupos controle (n=6) e experimental (n=6) no momento antes da administração, após quatro, 12, 24, 48 e 72 horas.

Grupos	Leucócitos Totais (4,0-12,0/ μ L)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	6,9 \pm 1,3 ^{aA}	8,6 \pm 1,7 ^{aA}	9,1 \pm 2,2 ^{aA}	8,7 \pm 1,5 ^{aB}	9,1 \pm 1,6 ^{aA}	8,2 \pm 1,0 ^{aA}
Experimental	7,6 \pm 1,6 ^{cA}	4,7 \pm 1,9 ^{cB}	12,1 \pm 2,9 ^{abA}	14,4 \pm 3,9 ^{aA}	9,1 \pm 1,8 ^{ba}	8,6 \pm 0,9 ^{bcA}
	Neutrófilos (700-6000/ μL)					
Controle	1568 \pm 417 ^{aA}	2127 \pm 294 ^{aA}	2201 \pm 555 ^{ab}	2071 \pm 471 ^{ab}	2029 \pm 140 ^{aA}	1649 \pm 355 ^{aA}
Experimental	1824 \pm 409 ^{ba}	1842 \pm 133 ^{ba}	7417 \pm 176 ^{aA}	8159 \pm 245 ^{aA}	2844 \pm 173 ^{ba}	2623 \pm 107 ^{ba}
	Linfócitos (2000-9000/μL)					
Controle	4454 \pm 954 ^{aA}	5241 \pm 113 ^{aA}	5738 \pm 153 ^{aA}	5545 \pm 106 ^{aA}	6081 \pm 121 ^{aA}	5711 \pm 712 ^{aA}
Experimental	4979 \pm 155 ^{aA}	2284 \pm 700 ^{ba}	3443 \pm 126 ^{abB}	5486 \pm 234 ^{aA}	5174 \pm 175 ^{aA}	4970 \pm 152 ^{aA}
	Monócitos (0-750/μL)					
Controle	322 \pm 17 ^{aA}	283 \pm 86 ^{aA}	299 \pm 97 ^{ab}	344 \pm 10 ^{aA}	290 \pm 89 ^{aA}	353 \pm 18 ^{aA}
Experimental	263 \pm 98 ^{ba}	156 \pm 12 ^{ba}	581 \pm 18 ^{aA}	337 \pm 12 ^{aA}	468 \pm 22 ^{aA}	421 \pm 24 ^{aA}

a,b,c,A,B Letras minúsculas referem-se a comparação entre os momentos e letras maiúsculas entre os grupos. Médias seguidas por letras iguais na linha ou na coluna não diferem entre si ($p>0,05$).

Os níveis de ferro sérico (Tabela 2) no grupo controle e experimental, no M0, apresentaram valores médios (20,5 \pm 6,40/ μ mol/L e 27,1 \pm 4,35/ μ mol/L, respectivamente) dentro do intervalo de referência (18-48/ μ mol/L) (AITKEN, 2000). No grupo controle, os valores médios permaneceram similares durante todo o período de amostragem ($p>0,05$). Nos animais do grupo experimental, a partir do M4, foi observada uma diminuição do ferro sérico em relação ao valor basal ($p=0,0491$) e uma diminuição estatisticamente significativa nos momentos M12 e M24. A normalização dos níveis de ferro ocorreu a partir do M48 (Tabela 2).

Tabela 2. Médias \pm desvio padrão do ferro sérico dos grupos controle (n=6) e experimental (n=6) no momento antes da administração, após quatro, 12, 24, 48 e 72 horas.

Grupos	Ferro Sérico (18-48/ μ mol/L)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	20,5 \pm 6,4 ^{aA}	18,0 \pm 6,5 ^{aA}	18,7 \pm 4,7 ^{aA}	20,9 \pm 3,1 ^{aA}	20,5 \pm 2,5 ^{aA}	22,6 \pm 4,9 ^{aA}
Experimental	27,1 \pm 4,3 ^{aA}	19,8 \pm 6,0 ^{abA}	12,0 \pm 4,0 ^{bbB}	13,7 \pm 6,0 ^{bbB}	24,0 \pm 6,0 ^{aA}	24,9 \pm 4,5 ^{aA}

a,b,c,A,B Letras minúsculas referem-se a comparação entre os momentos e letras maiúsculas entre os grupos. Médias seguidas por letras iguais na linha ou na coluna não diferem entre si ($p>0,05$).

Uma resposta similar foi observada em ovelhas, oito horas após receberam o LPS, seguido por um retorno gradual aos níveis normais de ferro plasmático a partir de 42 horas em diante (BADIAL, et al., 2011). Para obterem o ferro necessário para o crescimento, as bactérias produzem compostos ligantes, os sideróforos, que quelam o ferro disponível e o capturam, sendo transportados para o interior da célula. Tal mecanismo desencadeia uma resposta inflamatória no organismo que aumenta a metabolização do ferro a fim de diminuir a disponibilidade deste elemento aos patógenos (DESCHEMIN; VAULONT, 2013).

4 CONCLUSÃO

A endotoxemia experimental com LPS em ovinos induziu alterações nas variáveis hematológicas, sendo uma diminuição inicial da contagem total e diferencial de leucócitos nas primeiras quatro horas após a infusão, seguida de leucocitose, entre 12 e 24 horas após a infusão. Além disso, a exposição ao LPS também foi capaz de induzir hipoferremia após 12 horas, com retorno ao intervalo de referência ao final do período estudado.

REFERÊNCIAS

AITKEN, I.D. Diseases of Sheep, 4th ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2000.

ALTENBURG, S. P.; VENTURA, D.G.; DA SILVA, V.A.; et al. The role of forced swim test on neutrophil leukocytosis observed during inflammation induced by LPS in rodents. **Progress in Neuro- Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 26, n. 5, p. 891-895, 2002.

AURELL, C. A.; WISTROM, A. O. Critical Aggregation Concentrations of Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides (LPS). **Biochemical and biophysical research communications**. v. 253, n. 1, p.119 – 123,1998.

BADIAL, P. R.; OLIVEIRA-FILHO, J. P.; CUNHA, P. H. J.; et al. Influence of experimental inflammatory response on hepatic hepcidin gene expression and plasma iron concentration in sheep. **Vet Immunology and Immunopathology**. V. 141, p. 157-161, 2011.

BENTALA, H.; VERWEIJ, W.R.; VAN DER VLAG, A.H.; et al. Removal off phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. **Shock**. v.18, n. 6, p. 561-566, 2002.

BIENIEK, K.; SZUSTER-CIESIELSKA, A.; KAMINSKA, T.; et al. Tumor necrosis factor and interferon activity in the circulation of calves after repeated injection of low doses of lipopolysaccharide. **Vet Immunology and Immunopathology**. v. 62, n. 4, p. 281-372, 1998.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann. Intern. Med.** V.115 p.457, 1991.

BRAUN, J. P.; TRUMEL, C.; BÉZILLE, P. Clinical biochemistry in sheep: A selected review. **Small Ruminant Research**. v. 92, n. 1, p. 10-18, 2010.

BREKKE, O. A.; CHRISTIANSEN, D.; FURE, H.; et al. Combined inhibition of complement and CD14 abolish E. Coli-induced cytokine-chemokine- and growth

factor-synthesis in human whole blood. **Molecular Immunology**. v.45, p. 3804-3813, 2008.

BROWN, K. A. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **Lancet**. v. 368, p. 157–169, 2006.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 4, n. 10, p. 854-865, 2005.

BURRATTI, P., E. GAMELLA, I. RYBINSKA, G.; et al. Recent advances in iron metabolism: relevance for health, exercise, and performance. **Med. Sci. Sports Exerc.** 2014.

BUSTAMANTE A. F.; EASLEY, B.; FULD, M. et al.; Regional aeration and perfusion distribution in a sheep model of endotoxemic acute lung injury characterized by functional computed tomography imaging. **Crit Care Med**. v.37, n. 8, p. 2402-2411, 2009.

DE DIEGO, A.C.P.; SÁNCHEZ-CORDÓN, P. J.; PEDRERA, M.; et al. The use of infrared thermography as a non-invasive method for fever detection in sheep infected with bluetongue virus. **The Veterinary Journal**. v. 198, n. 1, p. 182-186, 2013.

DESCHEMIN, J.C.; VAULONT, S. Role of hepcidin in the setting of hypoferremia during acute inflammation. **PLOS one**. v. 8, n. 4, p. e61050, 2013.

DUFF, G. C.; GALYEAN, M. L. Board-Invited Review: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. **J. Anim. Sci.** v. 85, p.823–840, 2007.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. 5. ed. Canada: Lippincott Williams and Wilkins, 1986.

FREITAS, A.C.B.; QUIRINO, C.R.; BASTOS, R. Bem-estar de ovinos: Revisão. **Pubvet: Medicina veterinária e zootecnia**. V.11, n.1, p-18-29, 2017.

GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**. v. 102, p.783–788, 2003.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. Manual de hematologia veterinária. São Paulo: Varela, 1994. 169p.

GRYDLEY, D. S.; MILLER, G. M.; PECAUT, M. J. Radiation and primary response to lipopolysaccharide: bone marrow-derived cells and susceptible organs. **In vivo**. v. 21, n. 3, p. 453-461, 2007.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário, 2017. Disponível em <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro_2017_resultados_definitivos.pdf>. Acesso em: 17 dez 2018.

KOYAMA, S.; SATO, E.; NOMURA, H.; et al. The potential of various lipopolysaccharides to release monocyte chemotactic activity from lung epithelial cells and fibroblasts. **Eur Respir J**. v. 14, p. 545-552, 1999.

KRAUSE, A.; NEITZ, S.; MAGERT, H.J.; et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Lett**. v. 480, p.147–150. 2000.

LONGO, K.B.L. Papel da hepcidina no metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, n.66, 2016.

MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P. J.; GUAN, L. L. The Gut Microbiome and Its Potential Role in the Development and Function of Newborn Calf Gastrointestinal Tract. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, p. 36, 23 set. 2015.

MCAVOY, J. M.; MCDONALD, B.; PARSONS, S. A.; et al. The Role of CD14 in Neutrophil Recruitment within the Liver Microcirculation during Endotoxemia. **J Immunol**. v. 186, p. 2592-2601, 2011.

MORGAVI, D.P. et al. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 171-177, 2000.

MORRIS, J.A. Escherichia coli fimbrial adhesins. **Pig News and Information**, v.4, n.1, p.19-21, 1983.

MORRISON, D. C.; RYAN, J. L. Endotoxins and disease mechanisms. **Annual Review of Medicine**. v. 38, p. 417–432,1987.

OLIVEIRA, M.A.G. CCP 2017. **O Ovelheiro**. v.136, p.4, 2017.

PEÑAILILLO, A. K.; SEPULVEDA, M.A.; PALMA, C.J. et al. Haematological and blood biochemical changes induced by the administration of low doses of Escherichia coli lipopolysaccharide in rabbits. **Arch Med Vet**. v. 48, n. 3, p. 315-320, 2016.

POST, L.O.; FARREL, D.E.; COPE, C.V.; et al. The effect of endotoxin and dexamethasone on enrofloxacin pharmacokinetic parameters in swine. **J Pharmacol Exp Ther**. v.304, p.889–895, 2003.

RIQUELME, J. B.; CAZANGA, V. M.; PALMA, C. J.; et al. Clinical and hematological changes in sheep induced by Escherichia coli lipopolysaccharide. **Arq. Ciênc. Vet. Zool**. v. 21, n. 2, p. 47-53, 2018.

ROBERT, J. M. In: SMITH. *Enfermidades do Trato Alimentar. Medicina Interna de Grandes Animais*. 3 ed. São Paulo: Manole, cap.30, p.633-641, 2006.

SILVA, A. C.; SILVA, M. F.; GAMEIRO, A. H. Análise da gestão de custos nas propriedades de ovinos no estado de São Paulo, Brasil. **Empreendedorismo, gestão e negócios**. v.8, n.4, p. 494-514, 2019.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. United Kingdom: Cambridge University, 1997. 639p.

VAALA W. E.; HOUSE, J. K. Infecção Neonatal. In: SMITH. Medicina Interna de Grandes Animais. 3 ed. São Paulo: Manole, 2006, cap.19, p.303-317.

VAN AMERSFOORT, E. D.; VAN BERKEL, T. J. C. KUIPER. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. **Clinical Microbiology Reviews.** v.16, n.3, p. 379-414, 2003.

VIANA, J. G. A.; SILVEIRA, V. C. P. Análise econômica da ovinocultura: estudo de caso na Metade Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Ciência Rural.** v.39, n.4, p.1187-1192, 2009.

Tabela suplementar 1. Médias \pm desvio padrão dos parâmetros hematológicos nos animais do grupo controle (n=6) e experimental (n=6) nos momentos antes da administração, após 4, 12, 24, 48 e 72 horas.

Grupos	Hemácias (9-15x10 ⁶ /μL)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	8,9 \pm 1,5	9,1 \pm 1,9	8,6 \pm 1,9	8,8 \pm 2,2	8,7 \pm 1,7	8,6 \pm 1,8
Experimental	10,2 \pm 3,0	9,9 \pm 2,4	8,7 \pm 2,6	8,9 \pm 2,5	8,6 \pm 2,6	8,3 \pm 2,2
Grupos	Hemoglobina (9-15g/dl)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	10,2 \pm 2,4	10,7 \pm 2,2	10,1 \pm 2,3	10,3 \pm 2,6	10,1 \pm 2,3	9,9 \pm 2,2
Experimental	12,1 \pm 3,4	11,3 \pm 3,2	10,3 \pm 3,5	10,6 \pm 3,3	10,0 \pm 3,4	9,6 \pm 2,8
Grupos	Hematócrito (27-45%)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	29,9 \pm 6,5	31,0 \pm 6,0	29,9 \pm 6,6	30,4 \pm 7,3	28,7 \pm 7,1	28,5 \pm 6,4
Experimental	34,9 \pm 8,6	34,3 \pm 9,2	28,9 \pm 11,2	30,5 \pm 8,8	29,5 \pm 9,4	29,0 \pm 9,3
Grupos	Proteína plasmática total (6-7,5g/dl)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	5,1 \pm 1,5	5,3 \pm 1,5	5,4 \pm 1,3	5,4 \pm 1,5	5,5 \pm 1,5	5,6 \pm 1,5
Experimental	5,8 \pm 1,4	5,1 \pm 1,5	5,0 \pm 1,7	5,3 \pm 1,6	5,2 \pm 1,5	5,6 \pm 1,4
Grupos	Leucócitos (4,0-12,0/μL)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	6,9 \pm 1,3aA	8,6 \pm 1,7aA	9,1 \pm 2,2aA	8,7 \pm 1,5aB	9,1 \pm 1,6aA	8,2 \pm 1,0aA
Experimental	7,6 \pm 1,6cA	4,7 \pm 1,9cB	12,1 \pm 2,9abA	14,4 \pm 3,9aA	9,1 \pm 1,8bA	8,6 \pm 0,9bcA
Grupos	Neutrófilos (700-6000/μL)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	1568 \pm 417aA	2127 \pm 294aA	2201 \pm 555aB	2071 \pm 471aB	2029 \pm 140aA	1649 \pm 355aA
Experimental	1824 \pm 409bA	1842 \pm 133bA	7417 \pm 176aA	8159 \pm 245aA	2844 \pm 173bA	2623 \pm 107bA
Grupos	Linfócitos (2000-9000/μL)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	4454 \pm 954aA	5241 \pm 113aA	5738 \pm 153aA	5545 \pm 106aA	6081 \pm 121aA	5711 \pm 712aA
Experimental	4979 \pm 155aA	2284 \pm 700bB	3443 \pm 126abB	5486 \pm 234aA	5174 \pm 175aA	4970 \pm 152aA
Grupos	Monócitos (0-750/μL)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72

Controle (n=6)	322±17aA	283±86aA	299±97aB	344±10aA	290±89aA	353±18aA
Experimental	263±98bA	156±12bA	581±18aA	337±12aA	468±22aA	421±24aA
Grupos	Eosinófilos (0-1000/μL)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	581±166	523±202	644±405	746±396	653±367	619±317
Experimental	501±171	408±170	412±162	429±199	581±253	533±150
Grupos	Basófilos (0-300/μL)					
	Momentos (horas)					
	M0	M4	M12	M24	M48	M72
Controle	15,5±34,2	17,3±42,5	14,3±35,1	00±00	15,7±38,3	29,3±45,4
Experimental	45,2±36,4	16,8±18,5	31,8±50,5	00±00	44,8±49,2	29,7±46,0

^{a,b,c,A,B} Valores médios com letras diferentes sobrescritas foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), ausência de letras na linha ou coluna indicam que as médias não diferem entre si ($p > 0,05$); Teste de Tukey realizado para comparações entre os grupos (letras maiúsculas) e entre os momentos (letras minúsculas).

ANEXO A – Comitê de Ética

Processo do CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) nº **378/2018**
obedecendo a Lei nº 11.794, de 08.10.2008.

Título do Projeto em português: Hipoferremia, a consequência da endotoxemia experimental em ovinos.

Título do Projeto em inglês: Hypoferremia, the consequence of experimental endotoxemia in sheep.

Pesquisador Responsável: Amanda Thaís Pizani

Demais colaboradores: Prof^a Flávia de Almeida Lucas, Prof^o Luiz Claudio Nogueira Mendes, Prof^a Juliana Regina Peiró, Rafaela Speranza Baptista.

Unidade/Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA-UNESP).