

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMOGASOMÉTRICA, DO PERFIL
METABÓLICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO DE OVELHAS
PRENHES DA RAÇA DORPER: COMPARAÇÃO ENTRE
GESTAÇÕES ÚNICA E GEMELAR.

BIANCA PAOLA SANTAROSA

Botucatu-SP

Janeiro 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMOGASOMÉTRICA, DO PERFIL
METABÓLICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO DE OVELHAS
PRENHES DA RAÇA DORPER: COMPARAÇÃO ENTRE GESTAÇÕES
ÚNICA E GEMELAR.

BIANCA PAOLA SANTAROSA

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

Orientador: Prof. Adj. Roberto Calderon Gonçalves.
Coorientadora: Profa. Dra. Andreza Amaral da Silva.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santarosa, Bianca Paola.

Avaliação clínica, hemogasométrica, do perfil metabólico e do estresse oxidativo de ovelhas prenhes da raça Dorper : comparação entre gestações única e gemelar / Bianca Paola Santarosa. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Roberto Calderon Gonçalves

Coorientador: Andreza Amaral da Silva

Capes: 50501003

1. Stress oxidativo. 2. Hormônios. 3. Gasometria. 4. Ovelha - Metabolismo.

Palavras-chave: estresse oxidativo; hemogasometria; hormônios; pequenos ruminantes; perfil metabólico.

Bianca Paola Santarosa

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMOGASOMÉTRICA, DO PERFIL METABÓLICO E DO
ESTRESSE OXIDATIVO DE OVELHAS PRENHES DA RAÇA DORPER:
COMPARAÇÃO ENTRE GESTAÇÕES ÚNICA E GEMELAR.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Roberto Calderon Gonçalves

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.

Prof. Ass. Dr. Simone Biagio Chiacchio

Membro

Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ/UNESP - Botucatu-SP.

Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Membro

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia– FMB/UNESP - Botucatu-SP.

Prof. Adj. Luiz Cláudio Nogueira Mendes

Membro

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – FMVA/UNESP -
Araçatuba-SP.

Profa. Ass. Dra. Priscilla Fajardo Valente Pereira

Membro

Departamento de Clínicas Veterinárias – UEL - Londrina-PR.

Data da Defesa da Tese: 26 de janeiro de 2018.

À minha mãe, Maria Regina Sargiolato, meu eterno exemplo de amor, amizade, dedicação e compreensão. Tenho certeza de que cada passo que dei nesta e outras trajetórias tem muito dela! Sempre seremos uma só alma!

Aos animais.

"Pensando bem... Ser veterinário não é só cuidar de animais. É, sobretudo, amá-los, não ficando somente nos padrões éticos de uma ciência médica. Ser veterinário é acreditar na imortalidade da natureza e querer preservá-la sempre mais bela. Ser veterinário não é só ouvir miados, mugidos, balidos, relinchos e latidos, mas principalmente entendê-los e amenizá-los. É gostar de terra molhada, de mato fechado, de luas e chuvas. Ser veterinário é não importar se os animais pensam, mas sim que sofrem. É dedicar parte do seu ser à arte de salvar vidas. Ser veterinário é aproximar-se de instintos. É perder medos. É ganhar amigos de pelos e penas, que jamais irão decepcioná-lo. Ser veterinário é ter ódio de gaiolas, jaulas e correntes. É perder um tempo enorme apreciando rebanhos e voos de gaivotas. É permanecer descobrindo, através de animais, a si mesmo. Ser veterinário é ser o único capaz de entender rabos abanando, arranhões carinhosos e mordidas de afeto. É sentir cheiro de pelo molhado, cheiro de almofada com essência de gato, cheiro de baias, de curral, de esterco. Ser veterinário é ter coragem de entrar num mundo diferente e ser igual. É ter capacidade de compreender gratidões mudas, mas sem dúvida alguma, as únicas verdadeiras. É aliviar olhares, é lembrar de seu tempo de criança e querer levar para casa todos os cães vadios e sem dono. Ser veterinário é conviver lado a lado com ensinamentos profundos de amor e vida".

(Autor Desconhecido)

A Deus, primeiramente, pois sem Ele nada seria possível. E também a Nossa Senhora da Aparecida, que sempre guiou meus caminhos.

A minha mãe e eterna melhor amiga, Maria Regina Sargiolato, que é a professora de Língua Portuguesa mais apaixonada por aquilo que faz que eu conheço! Apesar de ter sido também minha professora no Ensino Fundamental e Médio, sempre me ensinou muito mais do que regras gramaticais e literatura! Educou-me para enfrentar a vida, seja para ultrapassar os obstáculos ou para aproveitar os bons momentos. Pude compreender o sentido real da frase: "Não se pode falar em educação sem amor" (Paulo Freire). Nunca esquecerei da música que cantava para mim quando criança: "Você é meu amorzinho, você é meu amorzão, você é o tijolinho que faltava na minha construção...", sei que sou o amor da vida dela, pois sempre me senti muito amada. Eu a amo infinitamente!

Ao meu irmão, Marco Bianco Santarosa, meu médico preferido, meu primeiro amigo, cúmplice, exemplo de determinação, garra e força! Nossos laços de amor e carinho, com certeza, ultrapassam o parentesco sanguíneo! Eu o amo para sempre!

A minha cunhada, Bruna Riedo Zanetti Santarosa, que também viveu as mesmas angústias deste período acadêmico de pós-graduação.. Agradeço pelas nossas conversas, seu apoio, incentivo e por amar o meu irmão.

A minha tia, Maria Aparecida Sargiolato, minha melhor "teacher". Agradeço muito mais do que pelas traduções de trabalhos que já fez, por todos os presentes recebidos, agradeço, sobretudo, pelo seu amor e carinho. Somos tão próximas que por pouco não nasci no dia do seu aniversário. Jamais me esquecerei de um cartão, que me entregou em um aniversário, com os dizeres: "You are my north, my south, my east and west; my working week and my Sunday rest" (W.H. Auden). "Thanks, I love her"!

Aos meus avós maternos, Natalina Fogale Sargiolato e José Sargiolato (in memoriam). Sei que estão me protegendo e torcendo pelo meu sucesso. Sou eternamente grata por todo amor e carinho que recebi. Apesar de toda simplicidade, foram capazes de transmitir os valores mais dignos de um ser humano: bondade, honestidade, humildade e compaixão. Muita saudade!

Ao meu namorado, Athos Victor Toledo de Lima, que me acompanhou nos momentos finais do curso do Doutorado e, mesmo assim, conseguiu me ajudar com muito apoio e incentivo, além das infinitas planilhas do Excel com os dados do experimento. Nada como um engenheiro para lidar com a quantidade de números, colunas, linhas e tabelas, que foram frutos deste trabalho. Eu não imaginava que um amor

verdadeiro pudesse morar tão perto e me fazer tão bem. Éramos vizinhos por tantos meses, mas Deus soube a hora certa de promover nosso encontro. Depois de tantas incertezas, a distância do Oceano Atlântico, de mais de 10.000km, uniu-nos ainda mais. Eu o escolhi para ser meu companheiro e juntos podermos realizar um sonho incrível e inesquecível: nossa "Eurotrip". Sei que faria tudo de novo para ver aquele sorriso largo e brilhante me esperando depois de seis meses distantes um do outro, mas também sei que somente a distância física nos separava, enquanto que nossos corações continuavam bem unidos. Desejo a nós muita cumplicidade, harmonia, amizade e, sobretudo, amor! Eu o amo demais!

Ao meu orientador, Prof. Adj. Roberto Calderon Gonçalves, pelos ensinamentos, pela credibilidade e confiança. A minha admiração pelo seu dom de ensinar começou ainda no primeiro ano da graduação, em 2006, e só aumentou conforme me tornei sua orientada de iniciação científica. Com certeza isso me estimulou para meu crescimento profissional e desenvolvimento na área acadêmica. Nem sempre as soluções para os problemas foram passadas de forma fácil, mas me ensinou a buscá-las. "Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para sua produção ou criação" (Paulo Freire). Em vários momentos se transformou em figura paterna, amiga e conselheira, sempre me ajudando a traçar o melhor caminho. Talvez eu nunca possa retribuir, entretanto serei eternamente grata.

À Profa. Tit. Iracema de Mattos Paranhos Calderon da FMB/UNESP-Botucatu por ter sido tão solícita e acreditar no meu potencial para me ajudar nas redações de várias cartas de reconsideração ao pedido de Bolsa de Doutorado à FAPESP. Infelizmente nosso pedido não foi atendido, mas pude aprender muito com ela, inclusive a não desistir facilmente dos nossos sonhos, ainda mais quando estamos rodeados de injustiças.

Ao Prof. Ass. Dr. Simone Biagio Chiacchio, do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP-Botucatu, pela orientação e sabedoria transmitidas desde o primeiro estágio na Clínica de Grandes Animais durante a graduação, na minha segunda iniciação científica e nos dois anos de residência. Agradeço pelas risadas, amizade, pelo apoio nos momentos difíceis e pela participação nas bancas de Qualificação e Defesa de Tese.

À Profa. Ass. Dra. Maria Lúcia Gomes Lourenço e ao Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim, do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP-Botucatu, pelos ensinamentos, amizade, carinho e atenção prestados, além de terem me orientado no estágio de docência na disciplina de "Clínicas II, Prática Hospitalar e de Fazendas".

Ao Prof. Ass. Dr. José Paes de Oliveira Filho, do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP-Botucatu, pela orientação no estágio de docência na disciplina de "Clínica das Intoxicações e Plantas Tóxicas", e também pelas conversas sobre a vida acadêmica.

À Profa. Adj. Regina Kiomi Takahira, ao técnico Marcos Montanha Ramos e à pós-graduanda Bruna Santos do Laboratório Clínico Veterinário FMVZ/UNESP-Botucatu, pela colaboração, processamento dos exames laboratoriais de bioquímica sérica, além dos esclarecimentos de dúvidas.

À Gabriela Nascimento Dantas, que começou como minha companheira de residência na Clínica de Grandes Animais e se tornou minha grande amiga e colega de pós-graduação. Dividimos o mesmo orientador e muitos bons momentos de descontração, mas também de dificuldades. Juntas, conseguimos aprender e produzir muito mais. Desejo-lhe muito sucesso!

Às minhas amigas da pós-graduação Alexandra Frey Belotta, Marina Gonzales de Carvalho, Jaqueline de Souza Brandão, pela companhia nas disciplinas, compartilhamento de aflições e convivência em diversos momentos da pós-graduação.

À minha coorientadora Profa. Dra. Andreza Amaral da Silva da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela amizade, conselhos, correções de artigos e por sempre me incentivar a continuar nesta trajetória. Ela é um exemplo de sucesso e competência naquilo que faz.

À Juliana Gadum de Lalla pela realização das análises estatísticas e esclarecimentos das dúvidas.

À Fazenda Monjolão - Cabanha Araí & Zumbi, ao proprietário Hércio Alves de Souza, ao Médico Veterinário Danilo Otávio Laurenti Ferreira, e aos funcionários Adrielle Mendes, Julio Zangarelli e Diego Benedito por ceder as ovelhas para este projeto, ajudar nas colheitas das amostras e por todo apoio durante os seis meses de experimento. Sem eles nada seria possível.

Às secretárias do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP-Botucatu, Marlene Dias Camargo e Izabel Cristina Castro, pela amizade e serviços prestados sempre que solicitado.

Ao Departamento de Clínica Veterinária e à FMVZ/UNESP-Botucatu, pela estrutura fornecida, que foi fundamental para minha formação, lugar onde, realmente, sinto-me em casa!

À Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno, à Dra. Yuri Karen Sinzato e toda equipe da LAPGO FMB/UNESP-Botucatu pela paciência de ensinar as técnicas do estresse oxidativo, acolher no laboratório durante seis meses de análises e também pelas dosagens hormonais. Por algum tempo, pensei que não fosse conseguir concluir as complexas dosagens do estresse oxidativo, mas elas fizeram acreditar que daria certo. Além disso, toda a ajuda prestada para redação dos artigos científicos, discussão dos resultados e participação da banca do exame geral de qualificação e da defesa desta tese.

À Profa. Dra. Priscilla Fajardo Valente Pereira do Departamento Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL), e ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Nogueira Mendes do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da FMVA/UNESP-Aracátuba pela participação na banca examinadora deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela auxílio financeiro concedido permitindo a realização deste projeto (Processo 2015/08714-8) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta história.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”.*

(Albert Einstein)

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

(Cora Coralina)

SUMÁRIO

Resumo.....	01
Abstract.....	03
CAPÍTULO I	
1. Introdução.....	05
2. Revisão de Literatura.....	08
3. Objetivos Gerais.....	22
3.1 Objetivos Específicos.....	22
CAPÍTULO II	
<i>Comparação dos parâmetros bioquímicos entre gestação única e gemelar de ovelhas da raça Dorper durante a gestação, parto e pós-parto.....</i>	23
CAPÍTULO III	
<i>Comparação da glicemia, dos hormônios insulina, glucagon, cortisol, T3 (triiodotironina), T4 (tiroxina) e resistência à insulina entre gestação única e gemelar de ovelhas da raça Dorper durante a gestação, parto e pós-parto.....</i>	33
CAPÍTULO IV	
<i>Comparação dos marcadores de estresse oxidativo entre gestação única e gemelar de ovelhas da raça Dorper durante a gestação, parto e pós-parto.....</i>	52
CAPÍTULO V	
<i>Comparação dos equilíbrios ácido-básico e eletrolítico do sangue venoso entre gestação única e gemelar de ovelhas da raça Dorper durante a gestação, parto e pós-parto.....</i>	68
CAPÍTULO VI	
1. Discussão Geral	79
2. Conclusões Gerais.....	81
3. Bibliografia.....	82
Anexos	89

SANTAROSA, B.P. **Avaliação clínica, hemogasométrica, do perfil metabólico e do estresse oxidativo de ovelhas prenhes da raça Dorper: comparação entre gestações única e gemelar.** Botucatu, 2018. 89p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Durante a gestação ocorrem modificações no metabolismo de ovelhas que podem predispor a ocorrência de transtornos metabólicos, dos quais se destaca a toxemia da prenhez (TP), especialmente no terço final devido ao maior crescimento dos fetos. Os objetivos deste estudo foram avaliar o perfil metabólico de ovelhas durante a gestação e no parto imediato (até 48 horas pós-parto), comparando-se gestação única com gemelar. Foram utilizadas 60 ovelhas criadas em manejo semi-intensivo, híbridas, da raça Dorper, com dois a cinco anos de idade. Foram constituídos dois grupos experimentais: Grupo 1: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação de feto único; Grupo 2: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação gemelar. Os momentos experimentais foram definidos como: MI – imediatamente após a inseminação artificial (controle); MG30 – 30 dias de gestação; MG90 – 90 dias de gestação; MG120 – 120 dias de gestação; MG130 – 130 dias de gestação; MG140 – 140 dias de gestação; MP - dia do parto; MPP1 - 24 horas após o parto; MPP2 - 48 horas após o parto. Em todos os momentos foram realizados pesagem; ultrassonografia transabdominal para confirmação da viabilidade fetal; e colheita de amostra de sangue venoso para as diversas análises laboratoriais: exames bioquímicos (ureia, creatinina, AST, FA, GGT, PT, albumina, globulina, colesterol e triglicérides); dosagens hormonais (insulina, glucagon, cortisol, T3, T4) e glicemia; dosagens dos marcadores de estresse oxidativo (concentrações do TBARS e grupo tióis reduzidos; atividades enzimáticas da SOD, GSH-Px e catalase); equilíbrios ácido-básico e eletrolítico obtidos por exame hemogasométrico (pH, PCO₂, HCO₃⁻, TCO₂, EB, Na⁺, K⁺, Cl⁻, iCa⁺², lactato, ânion gap e diferença de íons fortes). Não houve manifestação de TP no presente estudo, provavelmente pelo manejo geral adequado da propriedade, no que se diz respeito ao plano nutricional, boas instalações e sanidade do rebanho. Portanto, não foi possível prever a ocorrência da doença a partir das análises laboratoriais

realizadas. No entanto, estabeleceu-se panorama geral metabólico da ovelha prenhe da raça Dorper em condições de criação semi-intensiva, além de ter a comparação entre gestação única e gemelar. Foi possível também concluir que o metabolismo da ovelha com gestação gemelar não apresenta maior predisposição aos transtornos metabólicos e ao desenvolvimento da TP em relação à ovelha com gestação simples. Isso porque o metabolismo depende muito mais da condição nutricional e escore corporal do que simplesmente pelo tamanho ou número de fetos. Neste trabalho, as ovelhas com gestação gemelar tiveram melhor adaptação às mudanças fisiológicas provocadas pela prenhez, visto os resultados do sistema antioxidante frente aos agentes oxidantes, bem como para manter o equilíbrio ácido-básico.

Palavras-chave: estresse oxidativo, hemogasometria, hormônios, perfil metabólico, ovinocultura.

SANTAROSA, B.P. **Clinical, hemogasometric, metabolic profile and oxidative stress evaluation of pregnant Dorper ewes: comparison between single and twin pregnancies.** Botucatu, 2018. 89p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

During pregnancy there are changes in the metabolism of sheep that may predispose to the occurrence of metabolic disorders, including pregnancy toxemia (PT), especially the final third of the development of fetal growth. The objectives of this study were to evaluate the metabolic profile of ewes during gestation, lambing and immediate postpartum (up to 48 hours), comparing single gestation with twins. Sixty ewes were raised in a semi-intensive, healthy, Dorper breed, two to five years old. Two experimental groups were formed: Group 1: 30 ewes with ultrasonographic diagnosis of single fetus gestation; Group 2: 30 ewes with ultrasonographic diagnosis of twin pregnancy. The experimental moments were defined as: MI - after artificial insemination (control); MG30 - 30 days of gestation; MG90 - 90 days of gestation; MG120 - 120 days of gestation; MG130 - 130 days of gestation; MG140 - 140 days of gestation; MP - lambing day; MPP1 - 24 hours postpartum; MPP2 - 48 hours postpartum. At all times weights were performed; transabdominal ultrasonography to confirm fetal viability, and blood samples were collected to: biochemical tests (urea, creatinine, AST, FA, GGT, PT, albumin, globulin, cholesterol and triglycerides); hormonal dosages (insulin, glucagon, cortisol, T3, T4) and glycemia; oxidative stress markers (TBARS and reduced thiol group concentrations, enzymatic activities of SOD, GSH-Px and catalase); and blood gas evaluation (pH, PCO₂, HCO₃⁻, TCO₂, EB, Na⁺, K⁺, Cl⁻, iCa⁺², lactate, anion gap and strong ions difference). There was no manifestation of PT in the present study, probably due to the adequate general management of the property, regarding the nutritional plan, good facilities and herd sanity. Therefore, it was not possible to predict the occurrence of the disease from the laboratory analyzes performed. However, a metabolic overview of the Dorper pregnant ewes was established in conditions of semi-intensive breeding, in addition to having a comparison between single and twin gestation. It was also possible to conclude that the metabolism of sheep with twin pregnancy does not present a greater predisposition to metabolic disorders and to the development of PT in relation

to sheep with simple gestation. This is because metabolism depends much more on nutritional status and body score than simply on the size or number of fetuses. In this work, sheep with twin pregnancy had better adaptation to the physiological changes caused by pregnancy, considering the results of the antioxidant system against the oxidizing agents, as well as maintaining the acid-base balance.

Key words: blood gas, hormones, metabolic profile, oxidative stress, sheep.

1. Introdução

O interesse pela produção de ovinos apresenta aumento gradativo no Brasil desde a década de 1970. O efetivo de ovinos foi de 18,41 milhões em 2015, uma variação de 4,5% sobre 2014. A região Nordeste concentrou 60,5% do rebanho nacional em 2015. A região Sul apareceu em seguida, representando 26,5% do efetivo da espécie, seguida pelas regiões Centro-Oeste (5,6%), Sudeste (3,8%) e Norte (3,6%) (IBGE, 2016). No estado de São Paulo a população ovina é cerca de 700 mil cabeças (IBGE, 2016), o que reflete a relevância crescente que esta espécie apresenta na pecuária paulista, especialmente na produção de carne e comercialização de material genético (SANTOS et al., 2012).

A partir dos anos 2000, muitos embriões da raça Dorper foram importados da África do Sul, seu país de origem, e desde então sua criação está em plena expansão no Brasil. Atualmente, no Brasil, já foram registrados de 123.000 animais e no estado de São Paulo cerca de 28.800 na categoria Puros de Origem (PO) (ARCO, 2018). A raça Dorper apresenta alta taxa de desenvolvimento de carcaça com boa conformação, sendo muito utilizada em cruzamentos comerciais para produção de carne, além de animais de elite. Esses animais também apresentam características genéticas que conferem maior resistência a parasitas gastrointestinais, o que torna essa raça de alto interesse para criação em regiões brasileiras caracterizadas por problemas com verminose (SOUZA et al., 2016).

A intensificação da produção, aliada à comercialização de animais de alto valor genético, acarretou profundas alterações no manejo alimentar dos ovinos, desencadeando aumento da ocorrência de doenças nutricionais e metabólicas, com destaque à toxemia da prenhez (TP) nas fêmeas (ORTOLANI, 1996; OLIVEIRA et al., 2014). É uma doença caracterizada por transtornos no perfil metabólico

(energético e proteico) e hormonal, que acomete ovelhas e cabras (SOUTO et al., 2013). A enfermidade tem sido frequentemente diagnosticada em criações de animais de alta genética, em que são oferecidas dietas ricas em concentrado (CALDEIRA, 2005; SOARES et al., 2009). É mais comumente observada em ovelhas obesas, nas quais o acúmulo de gordura visceral e o útero gravídico causam compressão sobre os órgãos digestivos, sobretudo o rúmen, reduzindo a capacidade de ingestão de alimentos (CAMPOS et al., 2010). Geralmente ocorre no terço final da gestação, acometendo fêmeas com fetos múltiplos ou muito grandes, múltíparas, e está associado ao deficiência energética.

As exigências nutricionais de fêmeas gestantes são elevadas no terço final da gestação, quando ocorre aproximadamente 70% do crescimento fetal (CAMPOS et al., 2010). Mediante inadequado manejo alimentar, estes animais apresentam balanço energético negativo (BEN). Fisiologicamente, o organismo promove mobilização de reservas corporais, ocorrendo lipólise dos tecidos gordurosos. Entretanto, o fígado não consegue metabolizar todo ácido graxo proveniente da lipólise, tendo como consequência a formação de corpos cetônicos (SOARES et al., 2009), que podem gerar radicais superóxidos e causar estresse oxidativo e disfunção celular (AL-QUDAH, 2011), como é observado em vacas com cetose subclínica (CASTILLO et al., 2005) ou em humanos diabéticos (JAIN et al., 2006).

Os animais acometidos manifestam inicialmente inapetência, apatia, alteração de comportamento, que evoluem para decúbito prolongado. Alguns animais apresentam hipomotilidade ou atonia ruminal, constipação, bruxismo e odor de acetona no ar expirado. Com o agravamento da doença, surgem sinais neurológicos que incluem cegueira, andar em círculos, incoordenação motora, pressão da cabeça contra obstáculos, opistótono (“olhar para as estrelas”), tremores e convulsões

(CAMPOS et al., 2010). As respostas terapêuticas conservativas tem baixa eficácia, resultando em elevadas taxas de mortalidade, principalmente nos casos em que a cesariana é realizada de forma tardia (SCHLUMBOHM e HARMEYER, 2008).

A TP é considerada umas das principais causas de mortalidade de ovelhas no pré-parto (MAVROGIANNI e BROZOS, 2008). Segundo Rook (2000), a morbidade das pacientes se dá em torno de 20%, enquanto que a mortalidade dos animais acometidos pode chegar a 80% (ANDREWS, 1997; BANI ISMAIL et al., 2008), principalmente quando o início do tratamento é retardado e os animais já se encontram incapazes de se levantar.

Portanto, diante das diversas alterações fisiológicas e patológicas que ocorrem durante a gestação, esse trabalho visou avaliar os biomarcadores de alterações clínicas, perfil metabólico, bioquímico, hormonal, hemogasométrico e do estresse oxidativo de ovelha prenhe, que possam influenciar na saúde do animal e de seus produtos que possam predizer e prevenir a TP.

Na literatura os estudos sobre a TP ocorrem de forma crescente, porém não há trabalhos que discutam as conjuntamente diversas variáveis do metabolismo da em ovelhas, comparando gestações única e gemelar.

2. Revisão de literatura

2.1 Toxemia da prenhez

Ortolani e Benesi (1989) relataram a ocorrência da TP em cinco ovelhas e cinco cabras pela primeira vez no estado de São Paulo. De acordo com estes autores, a TP pode acometer tanto fêmeas com escore de condição corporal (ECC) baixo (inferior a 2,5) alimentadas com dietas de má qualidade (Tipo I), ou fêmeas com bom ECC ou até obesas (Tipo II). Porém, estudos têm mostrado maior suscetibilidade à enfermidade em animais mais velhos e gordos, com mais de um feto, especialmente com características produtivas superiores (FIRAT e ÖZPINAR, 2002). No entanto, a sua ocorrência em animais com baixo ECC tem sido relatada, refletindo aumento do catabolismo do tecido adiposo e de proteínas que fornecem precursores endógenos da glicose, como o glicerol e do fornecimento de aminoácidos glicogênicos (SCOTT et al., 1995). As condições adversas do tempo, a qualidade do alimento e fatores de estresse ambiental podem induzir ao BEN e aumentar o risco da enfermidade (VAN SAUN, 2000).

Diferentemente dos monogástricos, que absorvem e utilizam a glicose diretamente da dieta para síntese de energia pelo organismo, os ruminantes sintetizam glicose quase que exclusivamente via gliconeogênese hepática (ARAÚJO, 2009; ARAÚJO et al., 2014). No rúmen, os alimentos são fermentados pelos micro-organismos produzindo ácidos graxos de cadeia curta, também chamados de ácidos graxos livres (AGL): ácidos propiônico, acético e butírico. Estes AGL são absorvidos e direcionados para o fígado. Nos hepatócitos, o ácido propiônico é convertido em oxaloacetato, que é metabolizado e tem como produto final a glicose. O acetato é convertido, em

menor proporção, em glicose, e também atua como precursor de ácidos graxos de cadeia longa. O butirato é convertido em corpos cetônicos que, de acordo com a necessidade, podem servir de substrato energético para os tecidos. A proporção destes AGL produzidos depende do tipo, quantidade e frequência da dieta fornecida aos animais. Alimentos ricos em energia favorecem a produção de propionato, enquanto dietas ricas em proteínas promovem decréscimo da síntese de acetato e elevam a produção de butirato. O propionato é o principal precursor da glicose, podendo ser responsável por até 65% do total desta substância energética (HERDT, 2000).

A fisiopatologia da TP ainda não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que está associada à alteração no metabolismo energético da fase final da gestação, e mais especificamente em falha na produção ou no aproveitamento de glicose pela fêmea. Neste período, os requerimentos fetais aumentam mais no momento em que a capacidade ruminal passa a ser restrita em função da expansão uterina devido ao crescimento dos fetos (ROOK, 2000). Também deve-se considerar a variabilidade individual dos animais para o desenvolvimento do desequilíbrio homeostático da glicose e por consequência, a manifestação da TP (DUEHLMEIER et al., 2013).

Uma vez instalado o quadro hipoglicêmico nas fêmeas, inicia-se a mobilização das reservas lipídicas, quando as concentrações de insulina declinam em relação ao glucagon. Os triglicerídeos do tecido adiposo são mobilizados e lisados em ácidos graxos e glicerol, sendo este o precursor da glicose (ARAÚJO, 2009). A alta concentração de AGL não consegue ser totalmente oxidada pelo fígado para que sejam reesterificados à triglicérides, e assim seus níveis ficam elevados na corrente sanguínea. Desta maneira, os

AGL infiltrados nos hepatócitos causam elevada produção de corpos cetônicos, o que pode levar ao quadro de esteatose hepática. O beta-hidroxibutirato (BHB) é o corpo cetônico mais estável no organismo dos ruminantes (SCHLUMBOHM e HARMEYER, 2004).

As reservas corporais de proteína também são mobilizadas quando o aporte de nutrientes é inferior às necessidades de manutenção. O catabolismo proteico é iniciado e mantido por meio da diminuição nas concentrações de insulina e do aumento da síntese de glicocorticoide. Esta mobilização dos tecidos reflete na perda gradual de ECC e de peso (ARAÚJO, 2009).

Segundo Rook (2000) fêmeas suscetíveis a TP provavelmente apresentam diminuição da ação da insulina, expressa sob forma de resistência insulínica. Assim, esses animais não são capazes de regular a homeostase das concentrações de glicose no final da gestação (DUEHLMEIER et al., 2013).

Os sinais clínicos da TP podem ser divididos em três fases: fase 1 - hiporexia, pode durar um a dois dias em fêmeas obesas; fase 2 - anorexia, animal permanece em estação, porém tem dificuldade de locomoção, abdução dos membros posteriores, amaurose em alguns casos, andar em círculos, apatia, alteração nos parâmetros vitais (taquicardia, taquipneia, atonia ruminal); fase 3 - decúbito, depressão da consciência, coma, taquicardia, hipotermia, uremia, oligúria e desidratação (ORTOLANI, 1996).

A enfermidade está associada à hipoglicemia, hipercetonemia, redução dos níveis séricos de cálcio, sódio, potássio e magnésio e, alteração da função hepática, atribuída à lipidose (esteatose) hepática (VAN SAUN, 2000; BALIKCI et al., 2009). Como os corpos cetônicos, em especial o acetoacetato e o BHB, têm caráter muito ácido, o seu acúmulo provoca no animal um intenso quadro

de acidose metabólica. Outros achados como azotemia, hiperproteinemia, hipercortisolemia, hipoinsulinemia e elevação nos valores de frutossamina tem sido descritos, assim como alterações no *status* hematológico e imune de cabras e ovelhas (ANDREWS, 1997; LACETERA et al., 2001; BANI ISMAIL et al., 2008; SANTOS et al., 2011; SOUTO et al., 2013).

De acordo com Ortolani e Benesi (1989), animais com TP apresentam bom prognóstico quando se faz o diagnóstico na fase inicial dos sinais clínicos (fase 1). Porém, quando a fêmea atinge fases mais avançadas o prognóstico é ruim, com poucas chances de cura. O tratamento consiste em terapia suporte baseado no quadro clínico, podendo ser necessária intervenção cirúrgica (cesariana) para remoção dos fetos. Portanto, a prevenção da doença é de extrema importância, sendo o manejo nutricional a principal medida preventiva para a ocorrência da TP (BALIKCI et al., 2009) .

2.2. Perfil metabólico

Apesar de existirem muitas pesquisas que estudaram variáveis metabólicas em ovelhas prenhes com maior probabilidade de desenvolver doenças metabólicas e nutricionais devido à condição corporal, ao número de fetos e ao efeito da dieta (ROOK, 2000; KULCSÁR et al., 2006; CALDEIRA et al., 2007a; CALDEIRA et al., 2007b; ARAÚJO, 2009) é necessário que se analise conjuntamente variáveis bioquímicas e hormonais que possam prever e prevenir a TP.

2.2.1 Perfil energético

Não há consenso entre os autores sobre uma variável de eleição para avaliação do perfil energético, devido à complexidade deste metabolismo. Por isso, recomenda-se a análise da glicose, dos AGL e de corpos cetônicos no plasma. Tanto a glicose como os AGL são influenciados pelo estresse de manipulação podendo ter alteração na sua concentração sem significar alteração na homeostase (PAYNE e PAYNE, 1987; HERDT, 2000).

Os AGL são considerados os metabólitos sanguíneos que estão mais diretamente relacionados com o balanço energético (KANEKO et al., 2008). A sua origem provem da hidrólise dos triglicérides depositados nos adipócitos, sendo liberados para a corrente sanguínea e transportados pela albumina. Em ovinos, os AGL são mais bem correlacionados com o consumo de energia do que à glicose (HERDT, 2000).

O BHB é o corpo cetônico de escolha para a avaliação clínica devido a sua estabilidade no plasma ou no soro, apesar de ser melhor indicador de distúrbio latente do que do perfil energético (HERDT, 2000). Segundo este autor, o BHB é melhor indicador que a glicose por não possuir controle homeostático tão estreito. Schlumbohm e Harmeyer (2008) relataram que altas concentrações de corpos cetônicos plasmáticos em ovelhas causam redução de 30% nos níveis de produção de glicose.

Raoofi et al. (2013), comparando ovelhas gestantes de feto único e gemelar no parto, detectaram valores maiores de AGL, BHB, colesterol e ureia, e menores valores na glicemia e cálcio em animais com gestação gemelar.

2.1.2 Perfil proteico

A determinação da ureia, albumina, globulina e proteína total séricas são indicadores úteis para a avaliação do perfil proteico. A ureia é o metabólito melhor estudado em ruminantes, pois tem relação com a digestão proteica e com o metabolismo dos microorganismos do rúmen. A ureia se altera rapidamente de acordo com a dieta, portanto reflete o perfil proteico a curto prazo, enquanto a albumina é um indicador para alterações a longo prazo (PAYNE e PAYNE, 1987; HERDT, 2000).

A albumina é a proteína mais abundante no sangue, é sintetizada pelo fígado e suas concentrações são indicadores de função hepática e do estado nutricional. Está relacionada à pressão oncótica e assegura funções de proteína de ligação e transporte de outras moléculas na circulação como os AGLs (KANEKO et al. 2008). A globulina reflete a condição imunológica do animal, portanto altas concentrações podem estar associadas com doenças ou com vacinações recentes (PAYNE e PAYNE, 1987).

2.3 Perfil hormonal

Para o estudo de doenças metabólicas e nutricionais, além do perfil metabólico, é preciso analisar concomitantemente o perfil hormonal, em especial no que se refere aos hormônios que regulam o uso de lipídeos e carboidratos no organismo (ARAÚJO, 2009). Além da insulina e de seu antagonista glucagon, os hormônios do eixo somatotrópico, hormônio de crescimento, fator de crescimento Insulina-1 (IGF-1), e os hormônios da tireoide, são considerados os principais determinantes da taxa de metabolismo basal, deposição de nutrientes ou secreção (BELLMANN et al., 2004).

2.3.1 Hormônios Tireoidianos (T3 e T4)

Os hormônios tireoidianos apresentam funções semelhantes, porém atuam de forma diferente em células alvo no organismo. Os efeitos gerais desses hormônios são: regulação do metabolismo basal, estimulação da síntese de proteínas; aumento dos processos de glicólise, gliconeogênese e absorção intestinal de glicose; estimulação da atividade cardiocirculatória através de batimentos cardíacos, débito cardíaco, fluxo sanguíneo, desenvolvimento neuronal e, aumento da transmissão em células neurais (BERNE e LEVY, 2004).

Apesar do T4 ser secretado em maior quantidade pela tireoide, o T3 é a forma biologicamente ativa no organismo. Os hormônios tireoidianos aumentam o transporte e armazenamento da glicose, sendo os efeitos de T3 elevados pela insulina e inibidos pelo glucagon. O T3 e T4 aumentam a atividade da lipase lipoproteica, promovendo a mobilização dos estoques de triacilglicerol do tecido adiposo e elevando a concentração de AGLs. A concentração plasmática de T4 foi considerada como indicador do balanço energético, do ganho de peso e da deposição de gordura (BERNE e LEVY, 2004).

Bani Ismail et al. (2008) não encontraram diferença na dosagem de T3 e T4 em cabras com TP manifestada no início (fase I) e sadias.

2.3.2 Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico sintetizado pelas células β do pâncreas, sendo um dos principais reguladores do estoque e produção de carboidratos. Promove a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, agindo principalmente nos músculos, tecido adiposo e no fígado, assim como inibe

todos os processos catabólicos. Sua secreção é normalmente estimulada pelo aumento da glicemia, o que acarreta em aumento da concentração sérica de insulina e mais rápida assimilação tecidual da glicose (BERNE e LEVY, 2004). A insulina realiza a regulação de inúmeras vias metabólicas: aumenta a captação de glicose estimulando seu armazenamento na forma de glicogênio e seu uso como substrato para a lipogênese; aumenta o fluxo na via glicolítica e na via das pentoses; inibe a glicólise e a gliconeogênese, reduzindo assim a produção hepática de glicose e inibindo a formação de corpos cetônicos (BERNE e LEVY, 2004).

A insulina é o centro da regulação do metabolismo tanto nos ruminantes como nos demais mamíferos. Em relação aos monogástricos, os ruminantes absorvem menor quantidade de glicose diretamente do trato gastrointestinal. Consequentemente, pode-se dizer que a insulina tenha papel secundário na regulação da glicose e no metabolismo dos carboidratos nos ruminantes (ARAÚJO, 2009).

2.3.3 Glucagon

A ação do glucagon é antagônica à insulina e está envolvida na regulação dos níveis de glicose circulante, sendo que a insulina age em oposição à hiperglicemia, e o glucagon é parte de um sistema contra regulatório, o qual inclui a epinefrina e vários outros fatores, normalmente de menor significância, desenvolvido em defesa contra a hipoglicemia. Em resposta ao aumento do uso da glicose, como em períodos de exercício e jejum, ou depleção induzida pela insulina, o glucagon ajuda a restaurar os níveis circulantes pela estimulação da produção de glicose pelo fígado. O

glucagon também estimula a lipólise nos adipócitos, acarretando maior afluxo de ácidos graxos para o fígado, substratos para a cetogênese (BERNE e LEVY, 2004).

2.3.4 Cortisol

O cortisol, principal corticosteroide do metabolismo é produzido nas adrenais, não é espécie específico e circula no sangue ligado à proteínas transportadoras: a transcortina e a albumina. Apenas uma pequena porção encontra-se na forma livre, ou seja, fração biologicamente ativa do hormônio (FORD et al., 1990). Estes autores referiram declínio das concentrações de cortisol em ovelhas prenhes e sadias, durante o terço final da gestação e início da lactação. De acordo com este trabalho, os níveis de cortisol se encontravam diminuídos em 80% das fêmeas que desenvolveram TP.

Santos et al. (2011) observaram aumento do cortisol sérico em ovelhas que morreram devido à TP em relação àquelas que receberam alta clínica. Tal condição também foi relatada por alguns autores em cabras e ovelhas com TP, que justificaram este aumento como decorrente da maior produção deste hormônio pela glândula adrenal, em resposta ao grave estresse observado na doença e/ou, pela habilidade prejudicada do fígado gordo em metabolizá-lo e excretá-lo (FORD et al., 1990; HENZE et al., 1998). Um dos principais efeitos dos glicocorticoides é promover o estoque de glicogênio hepático que é atribuído à intensificação da gliconeogênese, da hiperglicemia e do decréscimo na glicogenólises (KANEKO et al., 2008).

2.4. Hemogasometria

A hemogasometria é a prova laboratorial que permite analisar os gases sanguíneos e o equilíbrio ácido-básico, de forma rápida e prática. O exame hemogasométrico fornece resultados das pressões do oxigênio (PO_2) e de dióxido de carbono (PCO_2) e do potencial hidrogeniônico (pH) sanguíneos, bicarbonato plasmático (HCO_3^-), dióxido de carbono total no plasma (TCO_2), e excesso de bases (EB). Há alguns anos atrás, a realização deste exame, principalmente em grandes animais, era complicada devido à disponibilidade do equipamento especializado, além do custo oneroso (ORTOLANI, 2003). Peiró et al. (2010) compararam os resultados hemogasométricos de aparelhos convencionais com o portátil I-Stat®, mostrando alto índice de correlação entre os resultados para as espécies equina, bovina e ovina.

O exame hemogasométrico pode ser feito com sangue venoso ou arterial. Para o diagnóstico confiável de distúrbios metabólicos do equilíbrio ácido-básico têm-se utilizado o sangue venoso com maior frequência, pela facilidade da colheita (ORTOLANI, 2003).

Um fator discutido como limitante na literatura para a prática deste exame é o tempo de processamento após a colheita do sangue. No entanto, Leal et al. (2006) comprovaram que a execução do exame de sangue venoso de ovinos é eficaz até 24 horas após a colheita desde que refrigerado (de 0 a 4°C), enquanto Lisboa et al. (2001), demonstraram que o sangue para análise hemogasométrica é viável por até seis horas em bovinos, desde que mantido em banho de água gelada (de 0 a 4°C).

Muitos distúrbios do equilíbrio ácido-básico trazem poucos transtornos ao organismo, porque são transitórios ou devidamente compensados pelo

animal. Porém, em determinadas situações a correção desse *status* metabólico é essencial para a sobrevivência do indivíduo. Para isso, o exame hemogasométrico fornece dados para o diagnóstico e estabelece prognóstico de várias enfermidades dos ruminantes, como a TP (ORTOLANI, 2003). Segundo González et al. (2012) o pH sanguíneo, HCO_3^- , EB e ânion Gap podem indicar precocemente casos desta doença em cabras.

Santos et al. (2011) estudaram a ocorrência de TP em ovelhas e verificaram acidose metabólica, que foi justificada pela cetonemia, que é consequência do processo de oxidação exacerbada dos AGL, que gera a produção excessiva de corpos cetônicos (acetoacetato, acetona e BHB), e como estes são ânions com características ácidas, elevam o ânion Gap e reduzem a concentração de HCO_3^- , Cl^- , Na^+ e K^+ . Além disso, as ovelhas podem apresentar hipocalcemia e hipocalemia (SOUTO et al., 2013). Por outro lado, Araújo (2009) não observou acidose metabólica em sete ovelhas acometidas por TP.

2.5 Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) e estresse oxidativo

As ERO são derivadas do metabolismo do oxigênio molecular, representada principalmente pelos radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), e hidroperoxila ($\text{HO}_2^\bullet$), além do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Apesar do H_2O_2 não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o $\text{OH}^\bullet$ (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Embora a cadeia de transporte de elétrons seja reconhecidamente o principal sítio de produção de ERO, outras diferentes fontes podem produzir estes agentes

oxidantes, como por exemplo, as células fagocíticas, os peroxissomas e as enzimas do sistema Citocromo P450 (SORDILHO e AITKEN, 2009; BUONOCORE et al., 2010).

Sob condições normais, o balanço entre os antioxidantes e as ERO é suficiente para garantir o bom funcionamento do organismo. Entretanto, acréscimo nos agentes oxidantes ou um decréscimo no sistema antioxidante pode destruir este equilíbrio. Este estado de desequilíbrio é conhecido como estresse oxidativo, condição em que as ERO podem provocar lesões teciduais, danificando organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos e proteínas (BURTON e JAUNIAUX, 2011) e está associado com diversas enfermidades nos animais domésticos (SILVA e GONÇALVES, 2010; SILVA et al., 2012).

De todas as ações deletérias associadas ao estresse oxidativo, a oxidação das membranas celulares talvez seja a que tenha maior impacto. As ERO quando geradas próximas de membranas celulares podem provocar a oxidação dos ácidos graxos, evento conhecido como peroxidação lipídica, acarretando em inativação de receptores, perda da fluidez e aumento da permeabilidade das membranas, com liberação de nutrientes e substâncias tóxicas à célula no espaço extracelular, lesando tecidos adjacentes (SORDILLO e AITKEN, 2009; MUTINATI et al., 2013).

A produção de ERO durante o metabolismo do oxigênio exige o desenvolvimento de defesas antioxidantes para remover os intermediários reativos do oxigênio antes que eles causem danos, mantendo a homeostase entre a produção e a eliminação de ERO (SORDILLO e AITKEN, 2009). De modo geral, os agentes antioxidantes podem ser enzimáticos e não-

enzimáticos. Os enzimáticos constituem a primeira linha de defesa endógena no combate às ERO, e incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione reductase (GSH-Rd). Entre os antioxidantes não-enzimáticos podemos destacar as vitaminas E e C, a glutathione (GSH), carotenos, ácido úrico e proteínas quelantes de metais de transição (AL-GUBORY et al., 2010; BURTON e JAUNIAUX, 2011).

Jain et al. (2006) relataram que o acetoacetato pode gerar radicais superóxidos, que podem, em seguida, formar radicais hidroxila. Estes radicais livres exercem seu efeito citotóxico pela iniciação da peroxidação da membrana fosfolipídica, resultando no acúmulo dos produtos finais de peroxidação lipídica, tais como Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Estes produtos são conhecidos como componentes que causam alterações na permeabilidade de membranas e na organização lipídica, bem como na disfunção celular e destruição da membrana (AL-QUDAH, 2011; MUTINATI et al., 2013). Aumento dos marcadores de estresse oxidativo foram descritos em vacas com cetose subclínica (CASTILLO et al., 2005) e em pessoas com diabetes tipo 1 (JAIN et al., 2006).

Comparando animais prenhes com TP, Al-Qudah (2011) encontrou valores maiores de TBARS, menores de GSH-Px, SOD e GSH em ovelhas prenhes saudáveis e ovelhas vazias, além de maiores níveis de BHB e cortisol e menor taxa glicêmica nas ovelhas com TP. O aumento na concentração plasmática de TBARS descrito por esses autores sugere que há aumento significativo na peroxidação lipídica em ovelhas com TP, que pode ser causada por desbalanço evidenciado pela redução significativa nos níveis de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, no grupo de ovelhas afetadas

com maiores concentrações de corpos cetônicos. A diminuição da atividade antioxidante das enzimas pode ser associada com desequilíbrio entre a peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante em ovelhas prenhes. Em contraste com estes resultados, aumento nas atividades de enzimas antioxidantes em vacas com cetose subclínica foi reportado por Sahoo et al. (2009). A associação entre hipercetonemia e os produtos de peroxidação lipídica foi demonstrada, sugerindo que a cetose é um fator de risco no desenvolvimento de peroxidação lipídica e estresse oxidativo em ovelhas com TP (AL-QUDAH, 2011).

Apesar de estar estabelecido que o estresse oxidativo e peroxidação lipídica estão envolvidos no desenvolvimento e complicações da TP, mais estudos devem ser realizados para conhecer o comportamento do sistema antioxidante e dos agentes oxidantes durante a gestação. Além disso, buscou-se, com este estudo, a partir do conhecimento dos mecanismos fisiológicos dos marcadores do estresse oxidativo, estabelecer um método precoce de diagnóstico para identificar casos de TP sem manifestação clínica evidente, a fim de se conseguir intervir antes que o animal desenvolva sintomatologia mais grave da doença. Estes animais podem morrer, com perda da matriz e dos cordeiros, e gerar prejuízos econômicos ao produtor.

3. Objetivos gerais

- Comparação do metabolismo de ovelhas com gestação única e gemelar criadas em manejo semi-intensivo, da raça Dorper ao longo da gestação, durante o parto e pós-parto imediato.

3.1 Objetivos específicos

Avaliação das diversas variáveis do perfil metabólico das ovelhas com gestação única e gemelar:

- Capítulo II: dosagens bioquímicas (ureia, creatinina, AST, FA, GGT, PT, albumina, globulina, colesterol e triglicérides)
- Capítulo III: dosagens hormonais (insulina, glucagon, cortisol, T3, T4), glicemia e resistência à insulina
- Capítulo IV: dosagens dos marcadores de estresse oxidativo (concentrações do TBARS e grupo tióis reduzidos; atividades enzimáticas da SOD, GSH-Px e catalase)
- Capítulo V: equilíbrios ácido-básico e eletrolítico obtidos por exame hemogasométrico [pH, pressão de dióxido de carbono (PCO_2), bicarbonato (HCO_3^-), pressão total de dióxido de carbono (TCO_2), excesso de bases (EB), sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), cálcio ionizado (iCa^{+2}), lactato, ânion gap (AG) e diferença de íons fortes (SID)].

Trabalho a ser enviado para a revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

As normas estão disponíveis em:
http://www.pvb.com.br/instrucoes_aos_autores.pdf

Trabalho

Comparação dos parâmetros bioquímicos entre gestação única e gemelar de ovelhas da raça Dorper durante a gestação, parto e pós-parto¹

Bianca P. Santarosa^{2*}; Gabriela N. Dantas²; Danilo O. L. Ferreira³; Bruna Santos²; Regina K. Takahira²; Andreza A. da Silva⁴; Roberto C. Gonçalves²

ABSTRACT.- Santarosa B.P., Dantas G.N., Ferreira D.O.L., Santos B., Takahira R.K., da Silva A.A., Gonçalves R.C. 2018. **[Comparison of biochemical parameters between single and twin pregnancies of Dorper breed ewes during gestation, lambing and postpartum.]** Comparação dos parâmetros bioquímicos entre gestação única e gemelar de ovelhas da raça Dorper durante a gestação, parto e pós-parto. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. E-mail: biancasantarosavet@gmail.com.

In sheep, nutrient demand increases during gestation, particularly in the last six weeks, when the fetuses develop. The objectives of this study were to evaluate the biochemical profile of ewes during pregnancy and in the immediate peripartum (up to 48 hours postpartum) comparing single with twin pregnancy. Sixty sheep were raised in a semi-intensive, healthy, Dorper breed, with two to five years old. Two experimental groups were formed: Group 1: 30 ewes, with ultrasonographic diagnosis of single fetus gestation; Group 2: 30 ewes, with ultrasonographic diagnosis of twin pregnancy. The experimental moments were defined as: MI - immediately after artificial insemination (control); MG30 - 30 days of gestation; MG90 - 90 days of gestation; MG120 - 120 days of gestation; MG130 - 130 days of gestation; MG140 - 140 days of gestation; MP - day of birth; MPP1 - 24 hours postpartum; MPP2 - 48 hours postpartum. At all the moments weights were performed; transabdominal ultrasonography to confirm fetal viability (except MP, MPP1 and MPP2); and venous blood sample collection. In blood serum were measured by reading in spectrophotometer: urea, creatinine, total protein, albumin, globulin, aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (FA), cholesterol and triglycerides. The live weight of G2 sheep was greater than G1 at all times, even when they were empty (MI). There were differences in G1 and G2 sheep metabolism in PT, Albumin, AST and Triglycerides. From MG120, the protein profile changed, with lower levels of urea, PT, albumin and globulin, showing that the metabolic demand actually intensified in the last month of pregnancy. For cholesterol and triglycerides the shift occurred from MG140 to MP when levels decreased. Although there was no pregnancy toxemia in the studied animals, this study showed that gestation provided significant changes in the ewe's metabolism, especially in the final third of gestation, when there is a greater need to follow the animals to avoid the incidence of metabolic diseases.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Tese de Doutorado da primeira autora. Auxílio financeiro (Proc. 2015/08714-8) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Bolsa de Doutorado da CAPES

² Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. *Autora para correspondência: biancasantarosavet@gmail.com.

³ Secretaria da Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, Casa da Agricultura de Agudos. Rua Odom Pessoa de Albuquerque, 788, Centro. Agudos, SP 17120-000, Brasil.

⁴ Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, RJ 23890-000 Brasil.

INDEX TERMS: Biochemical profile, metabolic diseases, pregnancy toxaemia, sheep.

RESUMO.- Nas ovelhas, a demanda de nutrientes aumenta durante a gestação, particularmente nas últimas seis semanas, quando ocorre maior desenvolvimento do(s) feto(s). Os objetivos deste trabalho foram estudar o perfil bioquímico de ovelhas durante a gestação e no parto imediato (até 48 horas pós-parto), comparando-se gestação única com gemelar. Foram utilizadas 60 ovelhas criadas em manejo semi-intensivo, híbridas, da raça Dorper, com dois a cinco anos de idade. Foram constituídos dois grupos experimentais: Grupo 1: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação de feto único; Grupo 2: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação gemelar. Os momentos experimentais foram definidos como: MI – imediatamente após inseminação artificial (controle); MG30 – 30 dias de gestação; MG90 – 90 dias de gestação; MG120 – 120 dias de gestação; MG130 – 130 dias de gestação; MG140 – 140 dias de gestação; MP - dia do parto; MPP1 - 24h pós-parto; MPP2 - 48h pós-parto. Em todos os momentos foram realizadas pesagem; ultrassonografia transabdominal para confirmação da viabilidade fetal (exceto MP, MPP1 e MPP2); e coleta de amostra de sangue venoso. Foram mensurados no soro sanguíneo por leitura em espectrofotômetro: ureia, creatinina, proteína total (PT), albumina, globulina, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), colesterol e triglicérides. O peso vivo das ovelhas de G2 foi maior que G1 em todos os momentos, inclusive quando estavam vazias (MI). Houve diferença no metabolismo das ovelhas do G1 e G2 nos parâmetros PT, Albumina, AST e Triglicérides. A partir do MG120, o perfil proteico se modificou, com menores níveis de ureia, PT, albumina e globulina, mostrando que a demanda metabólica realmente se intensificou no último mês da gestação. Para colesterol e triglicérides a mudança ocorreu de MG140 para MP, quando os níveis diminuíram. Embora não tenha ocorrido toxemia da prenhez nos animais estudados, este trabalho mostrou que a gestação proporcionou mudanças significativas no metabolismo da ovelha, principalmente no terço final da gestação, quando há maior necessidade de acompanhamento dos animais para evitar a incidência de doenças metabólicas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bioquímica sérica, doenças metabólicas, toxemia da prenhez, ovinos.

INTRODUÇÃO

Nas ovelhas, a demanda de nutrientes aumenta durante a gestação, particularmente nas últimas seis semanas, quando ocorre maior desenvolvimento do feto, que alcança aproximadamente 70% do seu crescimento, além do requerimento de nutrientes para o desenvolvimento mamário. O período entre o final da gestação e o início da lactação tem sido considerado o estágio de maior interesse do ciclo produtivo. Este período é acompanhado de diversas alterações anatômicas, hormonais e metabólicas devido à preparação para o parto e início da lactação. Essas modificações no perfil metabólico de ovelhas podem predispor a ocorrência de transtornos metabólicos (Caldeira et al. 2007, Bani Ismail et al. 2008). Entre as enfermidades de maior ocorrência nesse período, destaca-se a toxemia da prenhez (TP), que acomete ovelhas e cabras, principalmente no último mês de gestação (Campos et al. 2010, Souto et al. 2013, Lima et al. 2015).

O monitoramento dos padrões proteico, energético e mineral em ovinos é uma ferramenta de grande importância para a adequação alimentar e da condição metabólica de ovelhas considerando a pressão do processo de intensificação da produtividade, que, em muitos casos, promove os desequilíbrios entre o ingresso e egresso dos nutrientes, tornando-se, assim, um entrave para a produção animal (Santos et al., 2012, Oliveira et al., 2014).

Na literatura os estudos sobre a TP ocorrem de forma crescente, porém não há trabalhos que discutam as alterações no perfil metabólico e bioquímico em ovelhas Dorper durante toda a prenhez, parto e pós-parto imediato, comparando gestações única e gemelar. Portanto, diante da alta relevância desta doença na espécie ovina devido à alta mortalidade, este trabalho estudou conjuntamente diversas variáveis do metabolismo da ovelha prenhe a fim de conhecer o comportamento desses parâmetros ao longo da gestação e compará-los entre gestação única e gemelar, e com isso identificar alterações que possam estabelecer diagnóstico precoce dessa enfermidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos adotados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu (Protocolo 189/2014).

Foram selecionadas 150 ovelhas vazias, hígdas, da raça Dorper, com dois a cinco anos de idade, que participaram de protocolo de sincronização de estro. Foi empregado o protocolo de longa duração (12 dias), no qual o implante vaginal com 0,33g de progesterona (Cidr®, Zoetis) foi colocado no dia 0 e permaneceu por 12 dias (D0 a D12). Após a remoção deste foi administrado em cada animal 400 a 500UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon®, Zoetis) por via intramuscular (Bicudo & Sousa 2002). Passadas 48 horas (D14), foi feita a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) por laparoscopia, com sêmen congelado, e realizaram-se as colheitas do primeiro momento, considerado controle (MI). Depois de 30 dias (MG30), foi procedido o diagnóstico de gestação única ou gemelar (Santos et al., 2004) com o Ultrassom portátil (My LabTM30 Vet Gold Esaote®, Esaote Healthcare do Brasil, São Paulo-SP, Brasil), com o transdutor linear com frequência de 5,0MHz, para o exame transretal, quando se definiu o grupo experimental em que a ovelha foi incluída. Foram delineados dois grupos experimentais: Grupo 1: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação de feto único; Grupo 2: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação gemelar. Os animais vazios foram excluídos do lote experimental. Para os demais momentos foi empregado o transdutor convexo com frequência de 3,5MHz (Santos et al., 2004), para avaliação da viabilidade fetal. Todas as ovelhas receberam vermífugo após o parto (Monepantel, Zolvix®, Novartis Saúde Animal), e vacina polivalente contra Clostridioses (Sintoxan-T Polivalente®, Merial) aos 30 e 60 dias antes do parto.

As ovelhas foram soltas pela manhã e ficaram a pasto durante o dia. A pastagem utilizada foi o capim Vaquero (cultivar *Cynodon dactylon*). No final da tarde, os animais foram presos em baias coletivas de 12m² em barracão de alvenaria, com cama de palha de arroz, onde foram alimentados com 0,5kg/animal de ração para manutenção e 1,0kg/animal de silagem de milho. No barracão havia disponibilidade *ad libitum* de sal mineral comercial para ovinos (Ovinofós com Monensina®, Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, Mairinque-SP, Brasil) em cochos de alvenaria cobertos. A água foi proveniente de poço artesiano localizado na própria cabanha, e era disponível em cochos automáticos de forma *ad libitum*. A dieta total fornecida pela propriedade aos animais foi submetida à análise bromatológica (realizada pelo Laboratório de Bromatologia – Departamento de Nutrição e Melhoramento Animal FMVZ/UNESP-Botucatu) e dos minerais (realizada pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo – Campinas-SP) da ração, silagem de milho e pastagem, conforme estão descritas nos Quadros 1 e 2.

Os momentos experimentais foram definidos como: MI – imediatamente após a IATF (controle); MG30 – 30 dias de gestação; MG90 – 90 dias de gestação; MG120 – 120 dias de gestação; MG130 – 130 dias de gestação; MG140 – 140 dias de gestação; MP - dia do parto; MPP1 - 24 horas após o parto; MPP2 - 48 horas após o parto. Em todos os momentos foram realizados os seguintes procedimentos, antes da soltura dos animais para a pastagem, de forma padronizada: exame físico para aferição das funções vitais (frequências cardíaca e respiratória, movimentos ruminais e temperatura retal); pesagem em balança (Coimma® - Comércio Indústria de Madeiras e Metalúrgica São Cristóvão Ltda., Dracena-SP); ultrassonografia transabdominal para confirmação da viabilidade fetal e colheita de amostras de sangue total.

Todas as amostras de sangue total pela punção da veia jugular foram colhidas pela manhã, com os animais em jejum alimentar, dos dois grupos experimentais e nos nove momentos. Foram utilizadas agulhas (BD Vacutainer®, BD Medical, Curitiba/PR, Brasil) 30x0,8mm, tubos a vácuo, com gel ativador de coágulo e, sem anticoagulante. Após a retração do coágulo, a amostra foi centrifugada para obtenção de soro a 2.000 x g, durante dez minutos (Centrífuga Combate Celm®, Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP, Brasil). Foram separadas alíquotas de 2,0mL de soro em tubos plásticos (Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo/SP, Brasil) e armazenadas em freezer -20°C.

Em uma única vez, as amostras foram descongeladas e analisadas em espectrofotômetro (Cobas Mira Plus - Roche®) pelo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP-Botucatu. Foram mensurados no soro sanguíneo das ovelhas, nos diferentes momentos, pelo método enzimático colorimétrico, as concentrações de: colesterol, triglicérides, ureia, proteína total, albumina, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA); e pelo método cinético colorimétrico: creatinina.

Para análise estatística foi utilizado o software SigmaStat 3.5. Para todos os parâmetros das análises bioquímicas e o peso vivo foi realizada análise de medidas repetidas no tempo (*One Way*

Repeated Measures Anova) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente. Quando houve significância ($P < 0,05$) foi realizado o Teste *Tukey* para comparação das médias ($P < 0,05$). Também em cada momento foi realizado o teste *t de Student* para comparação dos grupos em estudo ($P < 0,05$). Para os dados de período gestacional e peso ao nascimento dos cordeiros empregou-se apenas estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média e desvio padrão do período gestacional das 60 ovelhas foi de $144,75 \pm 2,12$ dias de gestação, variando de 140 a 149 dias. A média do peso ao nascimento dos 90 cordeiros foi de $3,29 \pm 0,94$ kg, sendo 42 fêmeas e 48 machos. Houve necessidade de realização de cesariana em apenas uma ovelha com gestação simples, devido à distocia de causa materna por não haver dilatação cervical. Dos 59 partos normais, 51 foram auxiliados, sendo distocia fetal a causa mais comum. A maioria das ovelhas pariram no amanhecer ou anoitecer, sendo que apenas cinco ovelhas pariram no pasto durante o dia. Nenhuma ovelha apresentou sintomatologia clínica sugestiva de TP ou outra enfermidade, portanto nenhum tratamento foi instituído na propriedade, onde foram realizadas as colheitas das amostras.

Os quadros mostram as médias e desvios padrão de peso vivo das ovelhas (Quadro 3); ureia e creatinina (Quadro 4); PT, albumina e globulina (Quadro 5); AST, FA e GGT (Quadro 6); colesterol e triglicérides (Quadro 7).

A pesagem (Quadro 3) foi realizada somente até o MP, pois não haveria disparidade em 24h e 48h após o parto. Além disso, evitou-se transportar as ovelhas com cordeiros ao pé até o centro de manejo, onde se localizava a balança, para evitar acidentes. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em todos os momentos, sendo que o G2 sempre apresentou média maior que G1, devido à gestação de dois cordeiros. No entanto, a diferença foi observada desde o momento da IATF, o que pode ser justificada pelo fato de que as ovelhas com maior peso corporal apresentaram, provavelmente, maior taxa de ovulação e portanto maior taxa de prolificidade comparado às ovelhas do G1. Isso foi comprovado por Boucinhas et. (2006), que descreveram que o sistema de manejo em que as ovelhas foram suplementadas três semanas antes e quatro após o início do manejo para concepção, três semanas antes do parto e durante a lactação influenciou positivamente o peso, a condição corporal, a fertilidade e a prolificidade. Ao longo dos momentos, ambos os grupos apresentaram médias diferentes entre si, sendo que o maior valor foi encontrado em MG140. No MP notou-se perda de peso expressiva devido ao parto, pela subtração do(s) cordeiro(s), dos envoltórios fetais, líquido amniótico e alantoide.

As médias dos valores de ureia e creatinina (Quadro 4) não se diferenciaram estatisticamente entre os grupos em nenhum dos momentos de colheita, porém apresentaram diferença entre os momentos dentro de cada grupo estudado. Os resultados das médias da ureia estiveram dentro da normalidade para a espécie ovina exceto nos momentos MG30 e MG120 em ambos os grupos. Oliveira e colaboradores (2014) avaliaram três grupos de ovelhas com diferentes estágios do período gestacional (início - 50 a 60 dias, meio - 80 a 90 dias e fim - 130 a 140 dias), e também notaram níveis mais elevados de ureia, porém relacionado com o metabolismo proteico e não devido à alteração de função renal. Os valores da ureia no G1 e G2 foram maiores no MG120, e decaíram progressivamente até o MPP2. A ocorrência de redução de metabólitos proteicos com o avanço da gestação ou da lactação está associada ao balanço proteico negativo, devido ao maior crescimento dos cordeiros e produção de leite (Silva et al. 2013).

A creatinina esteve dentro ou abaixo do intervalo de referência (Kaneko et al., 2008) em todos os momentos em ambos os grupos. A mesma situação foi descrita por Santos et al. (2012) e Silva et al. (2013) em ovelhas Santa Inês. Isso mostrou que a gestação única ou gemelar não influenciou na função renal das ovelhas estudadas.

As médias da proteína total sérica (Quadro 5) no G1 no MPP1 e em ambos os grupos no momento MPP2 ficaram abaixo da faixa de normalidade para ovinos. Todas as médias de albumina ficaram dentro do intervalo de referência. Os valores médios de Globulina ficaram abaixo da normalidade em ambos os grupos do momento MG130 até MPP2. Na PT, no G1, os momentos MG30, MG90 e MG120 não diferiram entre si, mas foram diferentes dos demais. Os momentos MI, MG130, MG140 e MP também não diferiram entre si estatisticamente, assim como os MPP1 e MPP2. No G2, a média de MG120 foi a maior e diferiu dos demais momentos, enquanto o valor mediano de MPP2 foi o menor e também foi distinto dos outros. Nos resultados das médias de Albumina e Globulina houve diferença entre os momentos em ambos os grupos estudados.

No Rio Grande do Sul, Ribeiro e colaboradores (2004), observando ovelhas em pastoreio, encontraram redução da PT e albumina com o avanço da gestação e da lactação, provavelmente

pela baixa ingestão de proteína durante essa fase. Já Oliveira et al. (2014) descreveram níveis de metabolismo proteico dentro da normalidade durante as três fases gestacionais de ovelhas Santa Inês, provavelmente devido ao consumo proteico de 396g/dia de proteína, em média. De acordo com o NRC (2007), ovelhas no final da gestação possuem requerimento de 193g/PB/dia. No presente estudo, as ovelhas consumiram em média de 400g/dia de proteínas (312g PB/dia proveniente da ração e 82,8g/dia proveniente da silagem de milho), o que é acima do recomendado para as três fases de gestação.

A albumina é considerada o indicador mais sensível para determinar o estado nutricional proteico (Oliveira et al., 2014). No presente trabalho, os níveis de albumina refletiram o consumo adequado de proteína e até acima do recomendado, embora tenha atingido média próxima do limite inferior nos momentos pós-parto (MPP1 e MPP2).

A ureia é sintetizada no fígado em quantidades proporcionais à concentração de amônia produzida no rúmen e sua concentração está diretamente relacionada aos níveis proteicos da dieta (Brondani et al. 2016). Ribeiro et al. (2003) encontraram durante o ano níveis séricos médios de ureia de 37,97mg/dL em borregas da raça Corriedale, enquanto Rabassa et al. (2009) obtiveram, em ovelhas, durante o outono/inverno níveis médios de 30,68mg/dl. Segundo Ribeiro et al. (2004), em ovelhas Border Leicester × Texel que apresentaram queda no valor da condição corporal do início ao final da gestação (3,30 e 2,11, respectivamente), os teores de albumina sanguínea também diminuíram na metade e final deste período (31,05 e 24,44g/L, respectivamente). Contudo, os teores de ureia sérica não diferiram significativamente, sendo de 5,87mmol/L para as ovelhas na metade da gestação e de 5,59mmol/L para as ovelhas em final de gestação. Segundo os autores, isto se deve ao fato de as ovelhas em final de gestação possuírem demanda proteica maior para o crescimento fetal e desenvolvimento do úbere, fazendo com que diminuam os teores de albumina, o que não ocorre com os teores de ureia pelo fato desta exprimir diretamente a concentração de amônia no rúmen. Apesar disso, no presente estudo, os níveis de ureia diminuíram a partir do MG140 em ambos os grupos. Antunovic et al. (2011) observaram menores concentrações de ureia (mmol/L), em ovelhas gestantes que em ovelhas lactantes (5,70, e 6,80, respectivamente) e maiores de albumina (g/L) 30,93 e 28,60, respectivamente, atribuindo esse resultados a maior captação de albumina pelo organismos para a produção de colostro e leite.

As enzimas hepáticas (Quadro 6) estiveram dentro da faixa de normalidade para ovinos na maioria dos momentos em ambos os grupos, exceto para a AST no G1 nos momentos MPP1 e MPP2; a GGT no MG120 para ambos os grupos e no MPP2 para o G2. O aumento de AST observado pode estar relacionado com a maior atividade da musculatura do útero no parto, decúbito ou com aumento do metabolismo hepático, decorrente principalmente da mobilização de reservas corporais frequente neste período (Nascimento et al., 2015). Esses níveis elevados de GGT ocorreram devido à mobilização de reservas para a lactação (Nascimento et al., 2015), porém ficaram muito próximos ao limite superior. Para a AST, houve diferença estatística entre os grupos somente nos momentos MI e MPP1. Nos outros parâmetros (FA e GGT) não existiu diferença entre os grupos em nenhum momento de colheita. Nas médias da AST no G1, os valores dos momentos MPP1 e MPP2 foram maiores e diferentes dos demais. Já no G2, o MPP2 diferiu de MG140, sendo que os demais momentos se assemelharam entre si. Em FA, no G1, os momentos MI e MG30 foram iguais entre si. O MG120 e MP foram diferentes dos outros, e os demais foram semelhantes entre si. Para GGT, o momento MG120 se diferiu de todos os outros em ambos os grupos. Santos et al. (2012) não encontraram diferença entre os momentos analisados (30 e sete dias pré-parto; no parto; às 24h, 72h, cinco, 15 e 30 dias pós-parto. em ovelhas Santa Inês para as enzimas AST, FA e GGT.

As médias do colesterol (Quadro 7) ficaram acima dos valores de referência para ovinos nos momentos MG30, MG120 a MP, em ambos os grupos. Para o triglicérides o mesmo ocorreu do momento MG30 ao MP. Além de alterações na condição fisiológica, como a gestação e a lactação, outros fatores afetam o metabolismo energético nos animais como o manejo alimentar e inclusão de ingredientes com alto teor de lipídios na dieta (Fernandes et al., 2012). No caso das ovelhas, somente a ração fornecida continha 9,10% MS em EE, que significa alto teor de gordura. Portanto os níveis elevados de colesterol e triglicérides podem ser justificados também pela nutrição desses animais.

Os valores de colesterol não diferiram entre os grupos em nenhum dos momentos. Para triglicérides, houve diferença estatística entre os grupos somente nos momentos MG140 e MP, onde G1 apresentou valores maiores que G2. O inverso, no caso dos triglicérides, foi descrito por Balikci et al. (2009), que as ovelhas com gestação gemelar apresentaram maiores valores de colesterol e triglicérides do que as ovelhas de gestação única aos 100 e 150 dias de prenhez. Outros autores (Hamadeh et al. 1996, Raoofi et al. 2013) também descreveram níveis mais elevados de colesterol e

triglicerídeos em ovelhas com gestação gemelar em relação à gestação simples no terço final da prenhez. Os autores atribuíram este fato à resistência à insulina, que ocorre de forma fisiológica no final da gestação, pois este hormônio influencia diretamente no metabolismo do tecido adiposo durante a prenhez. E a diminuição da capacidade de resposta dos tecidos alvos à insulina durante a gestação tardia predispõe as ovelhas apresentarem níveis mais elevados de colesterol, triglicérides e lipoproteínas (Schlumbohm et al., 1997). No entanto, neste trabalho não foi observada diferença nas dosagens de colesterol entre os dois grupos e, no caso dos triglicérides, as ovelhas com gestação gemelar apresentaram níveis mais baixos do que aquelas que pariram somente um cordeiro no último momento antes do parto e no parto.

Dentro do G1 e G2, existiu diferença significativa ($p < 0,001$) ao longo dos momentos em ambos os parâmetros. As médias de colesterol foram maiores no MG120, sendo que os momentos MG30 e MG140 foram semelhantes em ambos os grupos. E os resultados menores foram no MPP2, sendo MI e MPP2 semelhantes no G1; MG90 e MPP2 no G2. Os valores medianos de triglicérides foram maiores nos momentos MG120, e menores no MI, MPP1 e MPP2 em ambos os grupos. À semelhança do presente estudo, Balikci et al. (2007) relataram aumento gradual no colesterol e de triglicerídeos séricos durante a gestação (aos 100 e 150 dias) quando comparado ao 60 dias de prenhez e 45 dias pós-parto, em ovelhas que pariram um e dois cordeiros.

Alguns pesquisadores relataram níveis mais altos de colesterol total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicerídeos no final da gestação (Krajnicakova et al., 1993; Nazifi et al., 2002). Hamadeh et al. (1996) e Al-Dewachi (1999) relataram concentrações séricas de colesterol maiores em ovelhas prenhes em relação às ovelhas vazias. O mesmo ocorreu neste estudo, onde a concentração de colesterol e triglicérides no momento MI se assemelhou aos níveis do pós-parto. Silva et al. (2013) observaram menores níveis de colesterol e triglicérides em ovelhas Santa Inês híidas 10 dias antes do parto em relação aos 15 dias pós-parto. No entanto, Özpınar & Fırat (2003) relataram que os níveis de colesterol plasmático não foram significativamente diferentes para ovelhas prenhes e vazias. Os dados contraditórios descritos por esses autores podem ser justificados pela diferença no manejo nutricional de cada estudo ou propriedade analisada, visto que é um fator que influencia diretamente nos níveis desses parâmetros.

Apesar das alterações encontradas nos parâmetros bioquímicos das ovelhas ao longo da gestação, não houve manifestação desta enfermidade nas ovelhas estudadas devido ao manejo nutricional instituído na propriedade, que foi suficiente para suprir as necessidades de manutenção da saúde dos animais durante o período de gestação, parto e pós-parto.

CONCLUSÕES

Houve diferença no metabolismo entre gestação única e gemelar apenas nos parâmetros PT, Albumina, AST e Triglicérides, provavelmente devido ao aumento da demanda de nutrientes para o crescimento de dois cordeiros. A partir do MG120, o perfil proteico se modificou, com menores níveis de ureia, PT, albumina e globulina, mostrando que a demanda metabólica realmente se intensificou no último mês da gestação. Para colesterol e triglicérides a mudança ocorreu de MG140 para MP, quando os níveis diminuíram. Embora não tenha ocorrido TP nos animais estudados, este trabalho mostrou que a gestação proporcionou mudanças significativas no metabolismo da ovelha, principalmente no terço final da gestação, quando há maior necessidade de acompanhamento dos animais para evitar a incidência de doenças metabólicas.

AGRADECIMENTOS

À FMVZ/UNESP, Botucatu-SP pela estrutura física e equipamentos utilizados para a realização do experimento. À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo Auxílio Regular ao Projeto de pesquisa (Processo 2015/08714-8) concedido. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela Bolsa de Doutorado concedida. À Cabanha Araí & Zumbi, localizada em Pardinho-SP, pelo uso dos animais e auxílio nas colheitas das amostras.

REFERÊNCIAS

- Al-Dewachi O.S. 1999. Some biochemical constituents in the blood serum of pregnant Awassi ewes. *Iraqi J. Vet. Sci.* 12: 275-279.
- Antunovic Z., Novoselec J., Sauerwein H., Speranda M., Vegara M. & Pavic V. 2011. Blood metabolic profile and some of hormones concentration in ewes during different physiological status. *Bulgarian J Agr Sci*, 17: 687-695.

- Bani Ismail Z., Al-Majali A.M., Amireh F. & Al-Rawashdeh O.F. 2008. Metabolic profiles in goat does in late pregnancy with and without subclinical pregnancy toxemia. *Vet Clin Pathol.* 37:434-437.
- Balikci E., Yildiz A. & Gurdogan F. 2009. Investigation on some biochemical and clinical parameters for pregnancy toxemia in Akkaraman ewes. *J. Anim. Vet. Adv.* 8(7): 1268-1273.
- Boucintas C.C., Siqueira E.R. & Maestá S.A. 2006. Dinâmica do peso e da condição corporal e eficiência reprodutiva de ovelhas da raça Santa Inês e mestiças Santa Inês-Suffolk submetidas a dois sistemas de alimentação em intervalos entre partos de oito meses. *Ciência Rural, Santa Maria.* 36(3):904-909.
- Bicudo S.D. & Sousa D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas. In: *Mostra Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, 6, 2002, Botucatu, SP. Anais...Botucatu: FMVZ-UNESP. 2002. Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/sony/curtadur.pdf>, Acesso em: 05/11/14.*
- Brondani W.C., Lemes J.S., Ferreira O.G.L., Roll V.F.B. & Del Pino, F.A.B. 2016. Perfil metabólico de ovelhas em gestação. *Arch. Zootec.* 65(R): 1-6.
- Caldeira R.M., Belo A.T., Santos C.C., Vazques M.I. & Portugal AV. 2007. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rumin Res.* 68:233-41.
- Campos A.G., Afonso, J.A.B., Santos R.A., Mendonça C.L. & Guimarães J.A. 2010. Estudo clínico-laboratorial da toxemia da prenhez em ovelhas: análise retrospectiva. *Ci. Anim. Bras.* 11(3):623-628.
- Fernandes S.R., Freitas J.A., Souza D.F, Kowalski L.H., Dittrich R.L., Rossi Junior P. & Silva C.J.A. 2012. Lipidograma como ferramenta na avaliação do metabolismo energético em ruminantes. *Bras. Agrociência, Pelotas.* 18(1-4):21-32.
- Hamadeh M.E., Bostedt H. & Failing K. 1996. Concentration of metabolic parameters in the blood of heavily pregnant and nonpregnant ewes. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 109:81-86.
- Krajnicakova M., Bekeova E., Heindrichovsky V. & Maracek, I. 1993. Concentrations of total lipids, cholesterol and progesterone during oestrus synchronization and pregnancy in sheep. *Vet. Med.* 38: 349-357.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 6.ed. San Diego: Academic, 2008. 916p.
- Lima E.H.F., Souto R.J.C., Silva S.T.G., Cajueiro J.F.P, Mendonça C.L., Soares P.C. & Afonso J.A.B. 2015. Avaliação do perfil hematológico, bioquímico e lácteo em ovelhas gestantes suplementadas com monensina sódica. *Vet. e Zootec.* 22(4):634-650.
- Nascimento P.M., Morgado A.A., Nunes G.R., Nikolaus J.P., Weigel R.A., Lima A. S., Storillo V.M., Mori C.S. & Sucupira M.C.A. 2015. Metabolismo oxidativo e perfil bioquímico de ovelhas Santa Inês no período periparto: efeito da suplementação parenteral com vitamina E. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina.* 36(3):1397-1408.
- National Research Council - NRC. *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids.* Washington: National Academy Press; 2007. 362p.
- Nazifi S., Saeb M. & Ghavami S.M. 2002. Serum lipid profile in Iranian fat-tailed sheep in late pregnancy, at parturition and during the post-parturition period. *J. Vet. Med. Ser. A.* 49: 9-12.
- Oliveira R.P.M., Maduro, A.H.P., Lima E.S., Oliveira F.F. 2014. Perfil metabólico de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de gestação criadas em sistema semi-intensivo no estado do Amazonas. *Ciência Animal Brasileira.* 15(1):81-86.
- Özpinar A. & Firat A. 2003. Metabolic Profile of Pre-Pregnancy, Pregnancy and Early Lactation in Multiple Lambing Sakız Ewes 2. Changes in Plasma Progesterone, Estradiol-17 β and Cholesterol Levels. *Ann Nutr Metab.* 47:139-143
- Rabassa V.R., Tabeleão V.C., Schneider A., Menezes L.M., Severo S., Schwegler E. Goulart M.A., Del Pino F.A.B., Nogueira C.E.W. & Corrêa M.N. 2009. Avaliação metabólica de ovelhas de cria mantidas em campo nativo durante o período de outono/inverno. *Rev Bras Agrociência.* 15:125-128.
- Raofi A., Jafarian M., Safi S. & Vatankhah M. 2013. Fluctuations in energy-related metabolites during the peri-parturition period in Lori-Bakhtiari ewes. *Small Ruminant Research* 109:64-68.
- Ribeiro L.A.O, Mattos R.C., González F.H., Lopes D., Wald V.B., Silva M.A.D. & La Rosa V.L. 2004. Perfil metabólico de ovelhas Border Leicester x Texel durante a gestação e lactação. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 99(551):155-159.

- Ribeiro L.A.O., González F.H.D., Conceição T.R., Brito A.B., La Rosa V.L. & Campos R. 2003. Perfil metabólico de borregas Corriedale em pastagem nativa do Rio Grande do Sul. *Acta Scie Vet.* 31:167-170.
- Schlumbohm C., Sporleder H.P., Gurtler H. & Harmeyer J. 1997. The influence of insulin on metabolism of glucose, free fatty acids and glycerol in normo- and hypocalcaemic ewes during different reproductive states. *Deutsch. Tierärztl. Wochenschr.* 104: 359-365.
- Santos M.H.B., Oliveira M.A.L., Moraes E.P.B.X., Chalhoub M. & Bicudo S.D. Diagnóstico de gestação por ultrassonografia de tempo real. In: Santos M.H.B., Oliveira M.A.L. & Lima P.F. (Eds.) Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha. São Paulo: Varela, 2004. p.97-116.
- Santos R.A., Campos A.G.S.S., Afonso J.A.B., Soares P.C. & Mendonça C.L. 2012. Efeito da administração de propileno glicol e cobalto associado à vitamina B12 sobre o perfil metabólico e a atividade enzimática de ovelhas da raça Santa Inês no periparto. *Pesq. Vet. Bras.* 32(Supl.1):60-66.
- Silva J.S.C., Guaraná E.L.S., Lemos V.F., Soares P.C., Afonso J.A.B. & Mendonça C.L. 2013. Metabolismo energético, proteico e mineral de ovelhas Santa Inês híginas e com mastite subclínica. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(9):1087-1096.
- Souto R.J.C., Afonso J.A.B., Mendonça C.L., Carvalho C.C.D., Silva Filho A.P., Cajueiro J.F.P. & Lima E.H.F. Soares P.C. 2013. Achados bioquímicos, eletrolíticos e hormonais de cabras acometidas com toxemia da prenhez. *Pesq. Vet. Bras.* 33(10): 1174-1182.

Quadros

Quadro 1. Análise bromatológica da ração, silagem de milho e capim Vaquero utilizados no experimento. Resultados expressos em 100% de matéria seca.

Amostra	% MS	% PB	% EE	% MINERAIS	% FDN	% FDA	% Hemicelulose	pH	Energia cal/g	Celulose	Lignina
Ração	88.45	20.85	9.10	6.27	14.58	5.05	9.53	-	3871	-	-
Silagem de Milho	27.83	8.28	3.20	3.84	50.55	29.51	21.04	3.53	-	-	-
Capim Vaquero	26.19	13.48	5.94	6.59	76.39	33.75	42.64	-	-	23.89	7.46

MS- Matéria seca; PB – Proteína bruta; EE – Extrato etéreo; FB – Fibra bruta; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido

Quadro 2. Análise dos minerais de da ração, silagem de milho e capim Vaquero utilizados no experimento. Resultados expressos em matéria seca (ppm).

Amostra	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Cu	Zn	Na	B	Co	Mo	Al
Ração*	-	7290	6250	10920	2260	3370	250	120	35	200	5230	190	1	12	130
Silagem de Milho	14160	1670	13410	2960	2520	1350	271,5	46,5	6	20	74,5	2,6	<0,3	<0,3	413
Capim Vaquero	17430	2290	14140	4350	1850	2800	270,5	42,5	7,2	27,5	82,2	2	<0,3	<0,3	254,1

*Umidade 85º: 11,40%; Umidade 110º: 11,77%; Matéria Orgânica: 92,11%; Cinzas: 7,89%

Quadro 3. Peso vivo (kg) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	Grupos		P
	G1	G2	
MI	45,6 ± 6,5 dB	54,1 ± 7,7 dA	0,006
MG30	52,5 ± 6,7 cB	60,6 ± 7,8 dA	<0,001
MG90	61,8 ± 7,9 bB	71,0 ± 8,3 bcA	<0,001
MG120	63,1 ± 7,6 bB	71,4 ± 8,4 bcA	<0,001
MG130	65,3 ± 7,8 abB	74,2 ± 7,7 abA	<0,001
MG140	67,6 ± 8,0 aB	76,4 ± 7,8 aA	<0,001
MP	61,7 ± 8,5 bB	68,3 ± 8,6 cA	0,008
P	<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t (P<0,05).

Quadro 4. Concentrações séricas de ureia e creatinina (mg/dL) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	Ureia			Creatinina		
	G1	G2	P	G1	G2	P
MI	41,9 ± 6,5b	42,6 ± 6,8bc	0,711	0,98 ± 0,14cd	0,99 ± 0,10bc	0,913
MG30	45,8 ± 7,8ab	45,6 ± 4,9a	0,881	1,04 ± 0,13c	1,06 ± 0,12b	0,711
MG90	32,0 ± 7,3c	29,8 ± 4,7ef	0,225	1,23 ± 0,18a	1,18 ± 0,14a	0,281
MG120	50,0 ± 9,7a	49,8 ± 8,1a	0,953	1,19 ± 0,16a	1,25 ± 0,09a	0,135
MG130	41,6 ± 5,5b	42,3 ± 5,2c	0,641	0,95 ± 0,13d	0,97 ± 0,12bc	0,559
MG140	35,3 ± 7,8c	35,2 ± 6,0de	0,957	0,95 ± 0,14cd	1,02 ± 0,11b	0,349
MP	32,6 ± 7,8c	33,0 ± 6,8ef	0,835	1,06 ± 0,18b	1,06 ± 0,19b	0,931
MPP1	31,1 ± 7,3c	32,0 ± 11,5ef	0,724	1,00 ± 0,14cd	1,05 ± 0,19b	0,349
MPP2	30,4 ± 8,9c	27,9 ± 9,1f	0,412	0,95 ± 0,14d	0,91 ± 0,14c	0,253
P	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Ureia: 17,12 a 42,80mg/dL; Creatinina 1,2 a 1,9mg/dL (Kaneko et al. 2008).

Quadro 5. Concentrações séricas de Proteína Total, Albumina e Globulina (g/dL) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	Proteína Total			Albumina			Globulina		
	G1	G2	P	G1	G2	P	G1	G2	P
MI	6,5 ± 0,5 b	6,7 ± 0,6 cd	0,135	2,8 ± 0,2 cdB	3,1 ± 0,2 bA	<0,001	3,7 ± 0,4 b	3,6 ± 0,5 cd	0,591
MG30	7,3 ± 0,4 a	7,3 ± 0,5 ab	0,891	3,2 ± 0,2 aB	3,4 ± 0,2 aA	<0,001	4,1 ± 0,5 a	3,8 ± 0,5bc	0,078
MG90	7,1 ± 0,5 a	7,1 ± 0,5 bc	0,938	3,0 ± 0,3 bc	3,1 ± 0,2 b	0,153	4,1 ± 0,4 a	4,0 ± 0,5ab	0,281
MG120	7,3 ± 0,9 a	7,5 ± 0,4 a	0,389	3,2 ± 0,5 ab	3,4 ± 0,3 a	0,051	4,1 ± 0,7 a	4,1 ± 0,4 a	0,770
MG130	6,2 ± 0,8 b	6,3 ± 0,5 e	0,397	2,7 ± 0,4 deB	3,0 ± 0,2 bcA	0,005	3,5 ± 0,5 bc	3,4 ± 0,4 de	0,367
MG140	6,1 ± 0,9 b	6,4 ± 0,4 de	0,238	2,8 ± 0,4 cdB	3,0 ± 0,2 bA	0,011	3,3 ± 0,6 cde	3,3 ± 0,3 def	0,897
MP	6,1 ± 0,9 b	6,4 ± 0,4 de	0,240	2,8 ± 0,5 dB	3,0 ± 0,3 bA	0,023	3,3 ± 0,6 cd	3,3 ± 0,3 def	0,875
MPP1	5,6 ± 0,7 cB	6,0 ± 0,5 fA	0,049	2,6 ± 0,4 eB	2,8 ± 0,2 cdA	0,003	3,1 ± 0,4 e	3,1 ± 0,3 ef	0,635
MPP2	5,7 ± 0,7 c	5,8 ± 0,4 f	0,611	2,5 ± 0,4 e	2,7 ± 0,3 d	0,057	3,1 ± 0,5 de	3,0 ± 0,3 f	0,462
P	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t (P<0,05).

Proteína total: 6 a 7,9g/dL; Albumina: 2,4 a 4,0g/dL; Globulina: 3,5 a 5,7g/dL (Kaneko et al. 2008)

Quadro 6. Concentrações séricas de AST, FA e GGT (UI/L) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	AST			FA			GGT		
	G1	G2	P	G1	G2	P	G1	G2	P
MI	146,0 ± 36,4bB	177,9 ± 56,5abA	0,018	180,7 ± 75,8a	173,5 ± 87,6a	0,756	45,9 ± 12,7b	45,9 ± 9,6b	0,992
MG30	164,5 ± 32,2b	176,9 ± 46,0abc	0,263	155,2 ± 76,6a	134,2 ± 72,6b	0,327	48,3 ± 12,6b	46,2 ± 7,6b	0,480
MG90	168,7 ± 35,6b	163,0 ± 34,1bc	0,570	105,1 ± 41,8bc	104,6 ± 50,5bcd	0,969	49,1 ± 9,9b	45,5 ± 8,2b	0,171
MG120	184,8 ± 45,0b	189,8 ± 38,6ab	0,678	124,1 ± 47,3b	116,4 ± 62,6bc	0,615	59,2 ± 16,3a	56,9 ± 9,7a	0,546
MG130	138,1 ± 26,2b	142,3 ± 30,7bc	0,601	96,9 ± 34,7bcd	89,4 ± 49,3cd	0,530	47,4 ± 10,6b	45,5 ± 7,4b	0,477
MG140	137,0 ± 29,4b	136,5 ± 23,9c	0,952	95,8 ± 42,4bcd	83,7 ± 38,8cd	0,299	47,6 ± 10,5b	46,3 ± 8,2b	0,651
MP	148,9 ± 44,3b	141,6 ± 33,7bc	0,522	73,6 ± 34,9d	75,9 ± 35,6d	0,816	46,9 ± 10,8b	46,5 ± 8,8b	0,910
MPP1	328,4 ± 137,1aA	220,0 ± 100,4abB	0,003	100,8 ± 54,0bcd	91,7 ± 41,9cd	0,518	45,0 ± 10,8b	46,0 ± 7,9b	0,772
MPP2	288,2 ± 121,5a	226,5 ± 109,1a	0,067	78,9 ± 41,0cd	86,5 ± 46,3cd	0,535	50,0 ± 9,8b	53,1 ± 9,1b	0,247
P	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t (P<0,05).

AST: 60 a 280UI/L; FA: 68 a 387UI/L; GGT 20 a 52UI/L (Kaneko et al. 2008)

Quadro 7. Concentrações séricas de Colesterol e Triglicérides (mg/dL) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	Colesterol			Triglicérides		
	G1	G2	P	G1	G2	P
MI	67,6 ± 16,6 de	74,7 ± 12,4 cd	0,097	18,1 ± 6,2 e	18,1 ± 4,2 c	0,958
MG30	82,6 ± 18,4 ab	80,3 ± 13,8 bc	0,631	28,8 ± 9,8 cde	24,1 ± 5,5 c	0,051
MG90	70,6 ± 10,6 cd	70,2 ± 8,8 de	0,876	35,3 ± 12,3 bc	35,0 ± 11,5 b	0,935
MG120	87,0 ± 17,7 c	90,5 ± 16,4 a	0,473	48,0 ± 18,8 a	43,8 ± 12,8 a	0,370
MG130	76,9 ± 14,0 a	78,0 ± 11,4 bcd	0,570	42,4 ± 15,8 ab	37,2 ± 10,3 ab	0,187
MG140	84,1 ± 16,2 ab	84,1 ± 11,5 ab	0,996	45,1 ± 24,1 aA	31,9 ± 8,4 bB	0,017
MP	76,8 ± 14,2 bc	78,0 ± 14,5 bcd	0,776	33,3 ± 12,0 bcdA	24,2 ± 5,4 cB	0,002
MPP1	69,3 ± 11,6 cd	73,7 ± 11,5 cd	0,184	23,8 ± 10,5 de	21,0 ± 6,9 c	0,280
MPP2	60,9 ± 11,2 e	63,4 ± 15,5 e	0,504	22,2 ± 11,1 e	21,9 ± 6,4 c	0,887
P	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t (P<0,05).

Colesterol: 52 a 76mg/dL; Triglicérides: 9 a 30mg/dL (Kaneko et al. 2008).

Trabalho a ser enviado para a revista ***Small Ruminant Research***.

As normas estão disponíveis em:

<https://www.elsevier.com/journals/small-ruminant-research/0921-4488/guide-for-authors>

Comparação da glicemia, dos hormônios insulina, glucagon, cortisol, T3 (triiodotironina), T4 (tiroxina) e resistência à insulina entre gestação única e gemelar de ovelhas da raça Dorper durante a gestação, parto e pós-parto

Bianca P. Santarosa^{*a}; Gabriela N. Dantas^a; Danilo O. L. Ferreira^b; Yuri K. Sinzato^c; Débora C. Damasceno^c; Andreza A. da Silva^d; Roberto C. Gonçalves^a

^a Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. ^{*}Autora para correspondência: biancasantarosavet@gmail.com.

^b Secretaria da Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, Casa da Agricultura de Agudos. Rua Odom Pessoa de Albuquerque, 788, Centro. Agudos, SP 17120-000, Brasil.

^c Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO), Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil.

^d Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, RJ 23890-000 Brasil.

RESUMO

Embora ocorram adequações metabólicas durante todo o período gestacional, estas são mais intensas no seu terço final, fase crítica, devido ao maior crescimento dos fetos e ao desenvolvimento da glândula mamária, com consequente aumento das exigências nutricionais. Os objetivos deste estudo foram estudar a glicemia, o perfil hormonal e a avaliação do índice HOMA IR de ovelhas durante a gestação e no parto imediato (até 48 horas pós-parto), comparando-se gestação única com gemelar. Foram utilizadas 60 ovelhas criadas em manejo semi-intensivo, híbridas, da raça Dorper, com dois a cinco

anos de idade. Foram constituídos dois grupos experimentais: Grupo 1: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação de feto único; Grupo 2: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação gemelar. Os momentos experimentais foram definidos como: MI – imediatamente após a inseminação artificial (controle); MG30 – 30 dias de gestação; MG90 – 90 dias de gestação; MG120 – 120 dias de gestação; MG130 – 130 dias de gestação; MG140 – 140 dias de gestação; MP - dia do parto; MPP1 - 24 horas após o parto; MPP2 - 48 horas após o parto. Em todos os momentos foram realizados pesagem; ultrassonografia transabdominal para confirmação da viabilidade fetal; e colheita de amostra de sangue venoso para mensuração: glicemia (cartucho de hemogasometria), insulina, glucagon, cortisol, T3 e T4 (kits comerciais de ELISA). Ocorreram alterações metabólicas durante a gestação, visto que em todos os parâmetros houve diferença estatisticamente significativa ao longo dos momentos ($p < 0,001$) em ambos os grupos estudados. Comparando gestação simples e gemelar houve diferença nos parâmetros glucagon, cortisol e T4 em momentos específicos. As concentrações de glicose, cortisol, insulina, glucagon e o índice HOMA IR se elevaram no momento do parto e diminuíram 24 e 48h pós-parto. Os níveis de T3 e T4 se elevaram no momento pré-parto. Apesar das mudanças no metabolismo encontradas nas ovelhas prenhes, o manejo nutricional na propriedade assegurou a manutenção da higidez das ovelhas durante a gestação, parto e pós-parto.

Keywords: gestação, glicose, perfil hormonal, ovinos, resistência à insulina,.

INTRODUÇÃO

A gestação é importante etapa na fase produtiva da ovelha. Neste estágio as adaptações metabólicas, fisiológicas e anatômicas ocorrem para garantir a formação e o desenvolvimento fetal além da manutenção da vida da mãe e do cordeiro (Reece 2007). Embora ocorram adequações metabólicas durante todo o período gestacional, estas são mais intensas no seu terço final, fase crítica, devido ao maior crescimento dos fetos e ao desenvolvimento da glândula mamária, com consequente aumento das exigências nutricionais (Celi et al. 2008). Qualquer problema que leve ao desequilíbrio entre demanda e

aporte de nutrientes para a fêmea nesta fase pode comprometer a saúde e/ou a produção deste animal (Caldeira et al. 2007).

O perfil energético e hormonal pode ser usado como ferramenta de monitoramento tanto das adaptações como dos transtornos metabólicos e do desbalanço nutricional (Payne e Payne, 1987). Fatores como a idade, raça, sexo e estado fisiológico (Reece 2007, Araújo et al. 2014) podem influenciar na concentração dos constituintes bioquímicos. Acredita-se que haja um conjunto de variáveis que demonstre precocemente algum desequilíbrio capaz de desencadear transtorno metabólico relacionado ao terço final de gestação, sendo mais frequentes em animais gestando mais de um feto (Araújo et al. 2014). Entre as enfermidades de maior ocorrência nesse período, a toxemia da prenhez se destaca (Santos et al. 2011).

Além da insulina e de seu antagonista glucagon, os hormônios do eixo somatotrópico, hormônio de crescimento, IGF-1, e os hormônios da tireoide são considerados os principais determinantes da taxa de metabolismo basal, deposição de nutrientes ou secreção (Bellmann et al., 2004; Schimitt et al., 2012).

Embora no periparto de ruminantes, período definido como três semanas antes e três após o parto, a diminuição da sensibilidade à insulina, também chamada resistência à insulina, ocorra de forma fisiológica (Regnault et al., 2004), esta pode ser agravada em condições de desequilíbrio nutricional, assim como pelo grau de adiposidade ao parto, descrito anteriormente por Oikawa e Oetzel (2006). Tal condição, associada a altas concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados (AGNE), tem sido proposta como fator de risco para síndromes metabólicas como a TP e hipocalcemia em ovinos (Schlumbohm e Harmeyer, 2003; Husted et al., 2008). Em humanos, diferentes intensidades de resistência à insulina também estão associadas às síndromes metabólicas (Brondani et al. 2016).

O índice HOMA (*homeostatic model assessment*) de percentual de atividade das células β (HOMA β) e de resistência à insulina (HOMA IR) foi desenvolvido com objetivo de avaliar a sensibilidade à insulina e atividade das células β utilizando somente os valores de glicemia e insulinemia em jejum; uma vez que a concentração de glicose e insulina em um estado basal é determinada por retroalimentação (Vasques et al. 2008). Tais índices já foram

estudados na espécie canina (Pöppel et al. 2009), porém em ovinos ainda não foram descritos.

Diante da relevância do período periparto para provocar alterações fisiológicas e patológicas em determinadas condições de manejo, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações hormonais, de glicemia e estabelecer o índice HOMA IR de ovelhas da raça Dorper prenhes ao longo da gestação, durante o parto e pós-parto imediato, comparando gestação única e gemelar.

MATERIAIS E MÉTODOS

O método adotado no presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu (Protocolo 189/2014).

Foram selecionadas ovelhas vazias, híidas, da raça Dorper, com dois a cinco anos de idade, que participaram de protocolo de sincronização de estro. Foi empregado o protocolo de longa duração (12 dias), no qual o implante vaginal com 0,33g de progesterona (Cidr®, Zoetis) foi colocado no dia 0 e permaneceu por 12 dias (D0 a D12), quando foi removido. Em seguida, foi administrado 400 a 500UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon®, Zoetis) em cada animal por via intramuscular (BICUDO e SOUSA, 2002). Após 48 horas (D14), foi feita a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) por laparoscopia, com sêmen congelado e realizaram-se as colheitas do primeiro momento, considerado controle (MI). Depois de 30 dias (MG30), foi procedido o diagnóstico de gestação única ou gemelar (SANTOS et al., 2004) com o Ultrassom portátil (My LabTM30 Vet Gold Esaote®, Esaote Healthcare do Brasil, São Paulo-SP, Brasil), com o transdutor linear com frequência de 5,0MHz para o exame transretal, quando se definiu o grupo experimental em que a ovelha foi incluída. Foram delineados dois grupos experimentais: Grupo 1: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação de feto único; Grupo 2: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação gemelar. Os animais vazios foram excluídos do lote experimental. Para os demais momentos foi empregado o transdutor convexo com frequência de 3,5MHz (SANTOS et al., 2004) para avaliação da viabilidade fetal. Todas as ovelhas receberam vermífugo após o parto (Monepantel, Zolvix®, Novartis

Saúde Animal) e vacina polivalente contra Clostridioses (Sintoxan-T Polivalente®, Merial) aos 30 e 60 dias antes do parto.

As ovelhas foram soltas pela manhã e ficaram a pasto durante o dia. A pastagem utilizada foi o capim Vaquero (cultivar *Cynodon dactylon*). No final da tarde, os animais foram presos em baias coletivas de 12m² em barracão de alvenaria, com cama de palha de arroz, onde foram alimentados com 0,5kg/animal de ração para manutenção e 1,0kg/animal de silagem de milho. No barracão, havia disponibilidade *ad libitum* de sal mineral comercial para ovinos (Ovinofós com Monensina®, Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, Mairinque-SP, Brasil) em cochos de alvenaria cobertos. A água foi proveniente de poço artesiano localizado na própria cabanha e era disponível em cochos automáticos de forma *ad libitum*. A dieta total foi submetida à análise bromatológica (realizada pelo Laboratório de Bromatologia – Departamento de Nutrição e Melhoramento Animal FMVZ/UNESP-Botucatu) e de minerais (realizada pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo – Campinas-SP) da ração, silagem de milho e pastagem, conforme estão descritas nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1. Análise bromatológica da ração, silagem de milho e capim Vaquero utilizados no experimento. Resultados expressos em 100% de matéria seca.

Amostra	% MS	% PB	% EE	% MINERAIS	% FDN	% FDA	% Hemicelulose	pH	Energia cal/g	Celulose	Lignina
Ração	88.45	20.85	9.10	6.27	14.58	5.05	9.53	-	3871	-	-
Silagem de Milho	27.83	8.28	3.20	3.84	50.55	29.51	21.04	3.53	-	-	-
Capim Vaquero	26.19	13.48	5.94	6.59	76.39	33.75	42.64	-	-	23.89	7.46

MS- Matéria seca; PB – Proteína bruta; EE – Extrato etéreo; FB – Fibra bruta; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido

Quadro 2. Análise dos minerais da ração, silagem de milho e capim Vaquero utilizados no experimento. Resultados expressos em matéria seca (ppm).

Amostra	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Cu	Zn	Na	B	Co	Mo	Al
Ração*	-	7290	6250	10920	2260	3370	250	120	35	200	5230	190	1	12	130
Silagem de Milho	14160	1670	13410	2960	2520	1350	271,5	46,5	6	20	74,5	2,6	<0,3	<0,3	413
Capim Vaquero	17430	2290	14140	4350	1850	2800	270,5	42,5	7,2	27,5	82,2	2	<0,3	<0,3	254,1

*Umidade 85^o: 11,40%; Umidade 110^o: 11,77%; Matéria Orgânica: 92,11%; Cinzas: 7,89%

Os momentos experimentais foram definidos como: MI – imediatamente após a IATF (controle); MG30 – 30 dias de gestação; MG90 – 90 dias de gestação; MG120 – 120 dias de gestação; MG130 – 130 dias de gestação; MG140 – 140 dias de gestação; MP - dia do parto; MPP1 - 24 horas após o parto; MPP2 - 48 horas após o parto. Em todos os momentos foram realizados os seguintes procedimentos, antes da soltura dos animais para a pastagem, de forma padronizada: exame físico para aferição das funções vitais (frequências cardíaca, respiratória, movimentos ruminais e temperatura retal); pesagem em balança (Coimma® - Comércio Indústria de Madeiras e Metalúrgica São Cristóvão Ltda., Dracena-SP); ultrassonografia transabdominal para confirmação da viabilidade fetal e colheita de amostras de sangue total.

Todas as amostras de sangue total pela punção da veia jugular foram colhidas pela manhã, com os animais em jejum alimentar, dos dois grupos experimentais e nos nove momentos. Foram utilizadas agulhas (BD Vacutainer®, BD Medical, Curitiba/PR, Brasil) 30x0,8mm, tubos a vácuo com gel ativador de coágulo e sem anticoagulante. Após a retração do coágulo, a amostra foi centrifugada para obtenção de soro a 2.000 x g, durante dez minutos (Centrífuga Combate Celm®, Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP, Brasil). Foram separadas alíquotas de 2,0mL de soro em tubos plásticos (Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo-SP, Brasil) e armazenadas em freezer -80°C.

As dosagens dos hormônios glucagon (Sigma-Aldrich®, Glucagon EIA kit, RAB0202, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), cortisol (DRG® Cortisol ELISA EIA-1887, ©DRG Instruments, Deutschland), insulina (DRG® ELISA EIA-2935, ©DRG Instruments, Deutschland), tireoidianos T3 (DRG® ELISA EIA-1780, ©DRG Instruments, Deutschland) e T4 (DRG® ELISA EIA-4568, ©DRG Instruments, Deutschland) foram realizadas por kits comerciais de ELISA em espectrofotômetro de leitura em microplaca (Biotek® Power Wave XS, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) no Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da UNESP, Campus de Botucatu.

Foi colhido 1mL de sangue por punção da veia jugular, em seringa de polietileno previamente heparinizada com heparina sódica (Hemofol® 5.000UI/mL, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, São Paulo-SP), acoplada a uma

agulha 30x0,8mm (BD®, BD Medical, Curitiba-PR, Brasil). Foi realizada, imediatamente após a colheita, a avaliação hemogasométrica em aparelho portátil analisador de pH, eletrólitos e gases sanguíneos (I-STAT®, Abbott Laboratories, Illinois, EUA). Foi utilizado o cartucho CHEM8+ (I-STAT®, Abbott Laboratories, Illinois, EUA), que mensurou, dentre outros parâmetros, a glicemia.

O índice de HOMA IR (*homeostatic model assessment*) foi calculado segundo a fórmula: insulina jejum ($\mu\text{UI/mL}$) x glicose jejum (mmol/L) / 22,5 (Matthews et al. 1985). Para conversão da glicose de mg/dL para mmol/L , multiplicou-se o valor em mg/dL por 0,0555 (Oliveira et al. 2005).

Para análise estatística, foi utilizado o software SigmaStat 3.5. Para os parâmetros peso vivo, glicose, insulina, glucagon, T3 e T4 das análises de hormônios foi realizada análise de medidas repetidas no tempo (*One Way Repeated Measures Anova*) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente, seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey para comparação das médias ($P < 0,05$). Também em cada momento foi realizado o teste t de Student para comparação dos grupos de estudo ($P < 0,05$). Já os dados de Cortisol e HOMA IR, por não apresentarem distribuição normal, optou-se pela análise não paramétrica. Foi realizado o Teste de Friedman (*Friedman Repeated Measures*) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente, também seguido do Teste de comparações múltiplas de Tukey para comparação das medianas ($P < 0,05$). Em cada momento foi realizado o Teste de Mann-Whitney para comparação dos grupos de estudo ($P < 0,05$). Foi calculada Correlação de Pearson entre os parâmetros glicose x cortisol para cada grupo ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas mostram as médias e desvios-padrão da glicemia (Tabela 1), insulina e glucagon (Tabela 2), T3 e T4 (Tabela 3); as medianas, primeiros e terceiros percentis do cortisol (Tabela 4) e HOMA-IR (Tabela 5).

Tabela 1. Concentração de glicose (mg/dL) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita.

Momentos	Grupos		P
	G1	G2	
MI	100,5 ± 47,8 b	84,8 ± 46,7 b	0,246
MG30	61,4 ± 5,6 c	62,4 ± 7,5 bc	0,620
MG90	55,1 ± 6,7 c	54,7 ± 8,0 c	0,852
MG120	54,7 ± 11,6 c	57,6 ± 6,3 c	0,288
MG130	58,1 ± 9,0 c	58,9 ± 5,9 bc	0,744
MG140	65,6 ± 28,6 c	69,4 ± 23,7 bc	0,624
MP	168,8 ± 72,0 a	145,3 ± 63,0 a	0,230
MPP1	83,1 ± 41,6 bc	70,1 ± 13,5 bc	0,164
MPP2	73,0 ± 25,6 bc	68,4 ± 17,2 bc	0,470
P	<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Glicose: 50 a 80mg/dL (Kaneko et al. 2008).

Tabela 2. Concentrações de insulina (ng/mL) e de glucagon (pg/mL) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita.

Momentos	Insulina		P	Glucagon		P
	G1	G2		G1	G2	
MI	0,80 ± 0,45 cB	1,16 ± 0,76 bA	0,039	167,7 ± 69,5 aA	107,3 ± 89,6 bB	0,022
MG30	0,89 ± 0,32 bc	0,93 ± 0,28 b	0,640	73,6 ± 86,2 b	112,8 ± 86,6 b	0,159
MG90	0,84 ± 0,44 c	0,99 ± 0,68 b	0,356	132,1 ± 85,4 ab	125,2 ± 93,5 ab	0,809
MG120	1,51 ± 0,89 bc	1,90 ± 1,17 b	0,186	137,2 ± 85,6 ab	137,6 ± 83,2 ab	0,988
MG130	1,67 ± 0,94 b	1,67 ± 1,01 b	0,997	170,6 ± 63,1 a	105,4 ± 97,0 b	0,018
MG140	1,32 ± 0,95 bc	1,60 ± 1,11 b	0,338	79,5 ± 90,3 bB	198,8 ± 0,78 aA	0,001
MP	3,28 ± 1,59 a	3,49 ± 1,64 a	0,500	184,7 ± 50,6 a	155,2 ± 82,0 ab	0,331
MPP1	3,55 ± 1,53 a	3,88 ± 1,52 a	0,453	145,1 ± 87,2 ab	170,0 ± 72,4 ab	0,566
MPP2	3,64 ± 1,36 a	3,45 ± 1,45 a	0,639	106,9 ± 106,8 ab	152,6 ± 93,8 ab	0,544
P	<0,001	<0,001		<0,001	0,009	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t (P<0,05).

Tabela 3. Concentrações de T3 e T4 (ng/mL) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita.

Momentos	T3		P	T4		P
	G1	G2		G1	G2	
MI	4,29 ± 1,13 a	4,16 ± 0,75 a	0,620	1,59 ± 0,30 a	1,59 ± 0,30 ab	0,982
MG30	2,87 ± 0,65 b	2,53 ± 0,57 de	0,058	1,55 ± 0,26 aB	1,73 ± 0,21 aA	0,013
MG90	2,22 ± 0,53 c	2,14 ± 0,48 e	0,610	1,54 ± 0,18 a	1,58 ± 0,18 ab	0,426
MG120	2,93 ± 0,57 b	3,12 ± 0,42 bcd	0,210	1,26 ± 0,20 b	1,26 ± 0,18 c	0,935
MG130	3,09 ± 0,50 ab	3,00 ± 0,50 bcd	0,565	1,12 ± 0,21 b	1,06 ± 0,22 c	0,313
MG140	3,50 ± 0,49 a	3,60 ± 0,72 ab	0,550	1,73 ± 0,29 a	1,68 ± 0,49 a	0,641
MP	3,29 ± 0,62 ab	3,54 ± 1,08 ab	0,308	1,28 ± 0,35 b	1,34 ± 0,42 bc	0,594
MPP1	2,97 ± 0,67 b	2,83 ± 0,46 cd	0,395	1,27 ± 0,40 b	1,17 ± 0,36 c	0,401
MPP2	3,23 ± 0,65 ab	3,24 ± 0,74 bc	0,933	1,24 ± 0,33 b	1,30 ± 0,33 bc	0,534
P	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t (P<0,05).

Tabela 4. Concentração de cortisol (ng/mL) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita.

Momentos	Grupos		P
	G1	G2	
MI	57,6 [35,7 – 87,7] abA	37,9 [17,5 – 49,1] abB	0,003
MG30	50,7 [28,0 – 81,5] abc	34,8 [19,4 – 62,9] ab	0,180
MG90	49,5 [36,1 – 73,5] abc	50,1 [30,0 – 80,3] a	0,768
MG120	43,2 [36,4 – 72,1] bcd	42,8 [31,2 – 50,2] abc	0,216
MG130	47,3 [33,4 – 61,3] bcd	34,8 [30,0 – 49,0] ab	0,114
MG140	33,0 [26,7 – 57,4] cd	38,9 [33,4 – 47,0] bc	0,578
MP	70,5 [43,5 – 111,4] a	52,1 [27,3 – 70,6] ab	0,100
MPP1	41,6 [27,5 – 59,2] cdA	30,8 [19,9 – 33,0] bcB	0,044
MPP2	34,6 [18,0 – 50,1] d	23,6 [16,6 – 34,8] c	0,205
P	<0,001	<0,001	

Dados apresentados como mediana, primeiro e terceiro percentis.

^{a,b} Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Medianas seguidas por letras diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney (P<0,05).

Cortisol: 62 a 72nmol/L (Kaneko et al. 2008)

Tabela 5. Índice HOMA IR (resistência à insulina) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita.

Momentos	Grupos		P
	G1	G2	
MI	3,21 [1,89 – 7,48] bc	4,77 [2,61 – 8,79] b	0,614
MG30	3,14 [2,50 – 3,87] bc	3,32 [2,69 – 4,49] b	0,441
MG90	2,52 [1,84 – 3,66] c	2,83 [1,98 – 4,56] b	0,575
MG120	4,48 [3,13 – 5,72] bc	5,27 [3,88 – 7,81] b	0,174
MG130	4,69 [3,62 – 9,18] b	4,73 [3,43 – 8,91] b	0,894
MG140	4,01 [2,69 – 5,68] bc	5,38 [4,10 – 7,45] b	0,096
MP	32,24 [16,55 – 46,34]a	24,44 [15,71 – 44,89] a	0,588
MPP1	18,14 [9,67 – 20,67] a	17,72 [9,15 – 20,18] a	0,947
MPP2	18,04 [10,34 – 21,62] a	13,43 [9,46 – 18,12] a	0,304
P	<0,001	<0,001	

Dados apresentados como mediana, primeiro e terceiro percentis.

^{a,b} Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

Nas médias da glicemia (Tabela 1) das ovelhas, não houve diferença estatística comparando gestação simples e gemelar em nenhum momento. No entanto, dentro de ambos os grupos existiu diferença ao longo dos momentos, sendo o momento MP com o maior valor. Em ambos os grupos, os momentos pós-parto MPP1 e MPP2 não diferiram entre si. Os animais apresentaram-se hiperglicêmicos nos momentos MI e MP em ambos os grupos e em MPP1 para G1. Provavelmente, a hiperglicemia observada em MI, quando as ovelhas estavam vazias, deve-se ao estresse de manejo para a realização da IATF, além da sincronização do cio. Obteve-se correlação positiva alta e estatisticamente significativa ($r=0,752$; $p=0,02$) entre glicemia e cortisol somente para o G1, o que pode explicar o estresse das ovelhas durante o MI e também no MP quando o cortisol esteve mais elevado como efeito desencadeante do parto. Araújo et al. (2014), entretanto, encontraram relação moderada entre glicemia e cortisol ($p=0,001$, $r=0,338$).

Araújo e colaboradores (2014) também observaram que a glicemia aumentou no momento do parto para os grupos de ovelhas prenhes independentemente do número de cordeiros. Segundo esses autores, durante a gestação, os valores de glicemia permaneceram dentro dos limites de normalidade para espécie, o que corroborou com este trabalho. Apenas no

momento do parto as concentrações se elevaram para as fêmeas gestantes tanto de feto único como de gêmeos. Santos et al. (2011) também observaram hiperglicemia apenas no momento do parto. O aumento nas concentrações de glicose observado no parto pode sugerir aumento das concentrações de glucagon e glicocorticoides que promovem a depleção dos estoques de glicogênio hepático e/ou pode ser consequência da liberação de glicocorticoides como sinalizador do parto em ovinos (Araújo et al. 2014) corroborando com o encontrado no presente estudo, em que foi detectada correlação positiva entre glicemia e cortisol. Porém, houve aumento na concentração de glucagon no parto somente no G1.

Os valores de insulina (Tabela 2) foram maiores entre as ovelhas com gestação única e gemelar apenas no primeiro momento de colheita (MI). Porém, ao longo dos momentos houve diferença em ambos os grupos, sendo que as médias dos resultados aumentaram com a progressão da prenhez, sendo os maiores valores nos momentos MP, MPP1 e MPP2. No G1, os momentos MG90 e MG130 se diferiram e MG30, MG120 e MG140 não diferiram desses dois. No G2, os momentos MI a MG140 também não foram diferentes entre si.

A concentração de glucagon diferiu em MI e MG140 entre os grupos analisados. Contudo, os momentos se diferiram dentro de cada grupo estudado. No grupo de gestação única (G1) os maiores valores foram encontrados nos momentos MG130 e MP e, no G2, o MG140 mostrou o maior valor. Neste trabalho, apesar de ter apresentado diferenças no decorrer da gestação, o glucagon não foi um bom marcador para estudar o metabolismo hormonal de ovelhas, devido, primeiramente, à dificultosa execução laboratorial e aos resultados pouco relacionados ao quadro fisiológico.

Houve limitação do estudo do glucagon no presente trabalho, visto que, além da adequação do protocolo comercial à espécie ovina, os valores de muitas amostras ficaram acima da curva padrão estabelecida, principalmente no periparto. Por isso, o kit não teve sensibilidade para quantificar a concentração do hormônio, sendo que o limite superior de detecção foi de 2.000pg/mL.

Diferentemente deste estudo, Araújo et al. (2014) não encontraram diferenças quanto aos teores de insulina e glucagon entre os animais gestantes

como também, entre gestantes e não gestantes, provavelmente devido às condições de higidez e leve balanço energético negativo que as ovelhas gestantes se encontravam. A insulina é um importante hormônio do metabolismo energético e age aumentando a captação de glicose, estimulando seu armazenamento na forma de glicogênio e sua utilização como substrato para a lipogênese. Aumenta o fluxo na via glicolítica, inibe a glicólise e a gliconeogênese, reduzindo assim a produção hepática de glicose e inibindo a formação de corpos cetônicos. As concentrações de insulina diminuem no período final de gestação e início da lactação em vacas leiteiras, com picos agudos no momento do parto (Berne e Levi 2004).

Souto et al. (2013) descreveram baixo nível de insulina em cabras com TP, o que também foi descrito por Henze et al. (1998), Santos et al. (2011) e Hefnawy et al. (2011). Esta condição foi justificada por Schmitt et al. (2012), que relataram maior resistência dos tecidos periféricos à insulina em ovelhas no terço final de gestação. Nesse período, os tecidos periféricos apresentam menor capacidade de metabolização da glicose e, conforme a gestação avança, a concentração materna de insulina e a resposta da insulina à sobrecarga de glicose são reduzidas (Sivan e Baden, 2003).

Outro fator a considerar para as baixas concentrações de insulina, segundo Regnault et al. (2004), é influenciado também pelo aumento dos AGNE, evidenciado pela forte relação negativa ocorrida, que embora forneça à fêmea prenhe fonte de energia para o metabolismo materno, provoca o desenvolvimento de resistência à insulina nos tecidos periféricos maternos, assim como a redução da produção da insulina. A glicose, então, é poupada e disponibilizada para o aproveitamento da placenta e para atender a demanda fetal. Tal fato, ainda não está bem definido, mas pode ser resultado das interações entre os hormônios da gestação e do pâncreas materno, como resultado da elevação crônica das concentrações dos AGNE, devido ao BEN (Souto et al. 2013).

Na dosagem de T3 (Tabela 3), não houve diferença entre os grupos em nenhum dos momentos de análise, já na dosagem de T4, os grupos diferiram entre si apenas no MG30, sendo a média de G2 maior que G1. Os valores de T3 foram diferentes estatisticamente ao longo dos outros momentos em ambos os grupos. As maiores médias foram encontradas nos momentos M1 e MG140,

e as menores no MG90. Em T4, em ambos os grupos, houve diferença significativa, sendo que os valores dos momentos MI, MG30, MG90 e MG140 foram maiores, enquanto MG120 e MG130 apresentaram resultados mais baixos, assim como os momentos MP, MPP1 e MPP2. Maiores concentrações de T3 foram observadas no parto (MP) e nos momentos imediatamente antes (MG140) e após o mesmo (MPP1 e MPP2) e maiores valores de T4 foram registrados para as fêmeas gestantes no momento anterior ao parto (MG140), corroborando o estudo de Araujo et al. (2014)

O incremento da concentração dos hormônios tireoideanos (HT) nas ovelhas gestantes está relacionado ao seu importante papel no metabolismo energético (Reece 2007). Em animais não gestantes estes hormônios são considerados indicadores do status metabólico e nutricional do rebanho, quando a privação de energia causa decréscimo nos teores de T3 e o excesso de energia tem efeito oposto (Todini et al. 2007). Nas ovelhas gestantes, a maior atividade tireoidiana em relação às não gestantes ocorre devido aos aumentos tanto nas concentrações de proteínas ligadoras, como na secreção de fatores tireotróficos pela placenta e na resposta por parte da pituitária do hormônio tireoestimulante (TSH), que induz a liberação do hormônio tireotrófico (TRH) pelo hipotálamo (Celi et al. 2008).

Os valores aumentados das concentrações de T4 no MG140 e de T3 no periparto (MG140 ao MPP1) dos dois grupos estudados indicam esse incremento na atividade e concordam com as observações feitas por Araújo et al. (2014) com ovelhas Santa Inês e Todini et al. (2007), que observaram aumento nas concentrações de T3 e T4 em cabras no final de gestação. Porém esses resultados contradizem os relatados por Yildiz et al. (2005), que observaram que as concentrações de T4 diminuía progressivamente no decorrer da gestação até momento do parto e atribuíram esse decréscimo ao balanço energético negativo (BEN) que as fêmeas entravam no final da gestação. Estes autores também observaram diferenças nas concentrações dos HT em fêmeas gestantes de dois fetos, com teores de T3 e T4 menores que as gestantes de fetos únicos, especialmente no final da gestação por causa do maior BEN em que se encontravam as primeiras.

As medianas do cortisol (Tabela 4) das ovelhas do MI e MPP1 apresentaram diferença estatística entre os grupos de gestação única e

gemelar, sendo maior no G1 do que no G2 nesses momentos. Ao longo dos momentos, houve diferença em ambos os grupos. No G1, o maior valor encontrado foi no MP; enquanto no G2 foi no MG90, porém o MG30, MG130 e MP foram semelhantes. Os menores resultados foram mostrados em MPP2 nos dois grupos.

De acordo com Reece (2007), as concentrações de cortisol ficam aumentadas no final da gestação, pois funcionam como sinalizadores do momento do parto. Situações de estresse também podem provocar elevação nos teores deste glicocorticoide (Ford et al. 1990), o que justifica os valores elevados no MI, quando as ovelhas passaram pelo manejo da IATF. Este hormônio exerce papel importante no periparto devido ao seu potente efeito gliconeogênico, entretanto, suas concentrações tendem a reduzir progressivamente no pós-parto em relação às últimas semanas de gestação (Bani Ismail et al. 2008, Campos et al. 2009), o que foi possível visualizar no momento de colheita 48h (MPP2) pós-parto neste trabalho.

Hefnawy et al. (2011) e Souto et al. (2013) relataram significativa elevação nos níveis de cortisol em cabras com TP, assim como Ford et al. (1990) descreveram em ovelhas, cujos resultados podem ser explicados pelo aumento da produção pela adrenal ou devido à inabilidade encontrada pelo fígado gorduroso em casos de TP em metabolizar e excretar o cortisol circulante. Porém, Bani Ismail et al. (2008) não observaram diferença significativa entre o hormônio em cabras saudáveis e com TP subclínica em virtude de condição clínica branda nos animais acometidos. Dessa forma, o cortisol efetivamente age de maneira oposta à insulina, enquanto esta permite aos tecidos utilizar a glicose mesmo em baixas concentrações sanguíneas, o cortisol diminui a habilidade dos tecidos para utilizar a glicose nesta condição. Este efeito inibitório sobre a utilização da glicose pode estar aumentado sob condições de severa insuficiência de insulina e a severidade da cetose depende do balanço entre cortisol e insulina, mais do que da absoluta quantidade de cada hormônio secretado. Desta forma, o grau de inibição da utilização da glicose e o aparecimento dos sinais clínicos podem depender deste equilíbrio (Firat e Özpınar 2002).

As medianas do índice HOMA IR (Tabela 5) não diferiram entre os grupos em nenhum dos momentos analisados. Porém, ao longo dos momentos

houve diferença nos dois grupos experimentais e notou-se valores mais elevados a partir do parto, sendo que os momentos MP, MPP1 e MPP2 não diferiram entre si em ovelhas que pariram um e dois cordeiros. No G1, o MG90 foi diferente de MG130. Em humanos, considera-se como valor normal um HOMA-IR de até 2,8, em média. Quanto maior o valor do HOMA IR, maior a resistência à insulina (Vasques et al., 2008). Notaram-se médias mais elevadas no parto e pós-parto, o que significa que as ovelhas apresentaram resistência à insulina nesse período. A redução da sensibilidade à insulina é observada em diferentes estágios da vida e é considerada fisiológica na puberdade, nos processos de envelhecimento e na prenhez. Uma complexa adaptação endócrino-metabólica ocorre durante a gestação, envolvendo alterações na sensibilidade à insulina, aumento da resposta em massa das células beta (β), discreta elevação da glicemia principalmente após a alimentação, mudanças nos níveis circulantes de fosfolípidos, ácidos graxos livres, triglicérides e colesterol. Estas alterações não são consideradas patológicas, uma vez que representam uma adaptação metabólica para o adequado fornecimento de energia para o feto e preparo do organismo materno para o momento do parto e lactação. O feto não é capaz de realizar gliconeogênese e o seu crescimento depende do aporte de nutrientes maternos por via placentária. Devido à resistência à insulina (RI) ocorre redução na utilização de glicose, que por sua vez é redirecionada para os tecidos fetais (Oliveira et al. 2005).

A ausência de valores de corte em ovinos para o HOMA IR dificultou sua interpretação, contudo a comparação dos valores ao longo dos momentos durante a gestação deixa clara a aplicabilidade deste índice adaptado da medicina humana, para identificação de quadros de resistência à insulina também em ovelhas.

No entanto, outros estudos devem ser feitos para avaliar aplicabilidade também do índice HOMA β , a fim de se conhecer melhor o comportamento dessas variáveis em ovinos, e assim estabelecer padrões de referência.

CONCLUSÕES

O glucagon não foi um bom marcador para avaliar o metabolismo dos ovinos, além de não ter traduzido a condição fisiológica da ovelha prenhe. Não houve manifestação clínica de TP nos animais estudados devido ao manejo

alimentar adequado que supriu as necessidades fisiológicas durante a gestação, parto e pós-parto.

É de extrema relevância o estudo do perfil hormonal e energético em ovelhas gestantes, pois alterações metabólicas podem ocasionar transtornos no organismo acarretando quedas produtivas, sendo que refletem sobre a taxa de crescimento e sobrevivência dos cordeiros. Os valores dos hormônios encontrados neste estudo podem ser utilizados como referência para ovelhas Dorper híbridas durante a gestação. O HOMA IR pode ser aplicado na espécie ovina para estudar a sensibilidade à insulina.

CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

À FMVZ/UNESP, Botucatu-SP e ao Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO) da FMB/UNESP-Botucatu pela estrutura física e equipamentos utilizados para a realização do experimento. À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo Auxílio Regular ao Projeto de pesquisa (Processo 2015/08714-8) concedido. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela Bolsa de Doutorado concedida. À Cabanha Araí & Zumbi, localizada em Pardinho-SP, pelo uso dos animais e auxílio nas colheitas das amostras.

REFERÊNCIAS

- Araújo C.A.S.C., Nikolaus J.P., Morgado A.A., Monteiro B.M., Rodrigues F.A.M.L., Vechiato T.A.F., Soares P.C., Sucupira M.C.A. 2014. Perfil energético e hormonal de ovelhas Santa Inês do terço médio da gestação ao pós-parto. *Pesq. Vet. Bras.* 34(12), 1249-1255.
- Bani Ismail Z., Al-Majali A.M., Amireh F., Al-Rawashdeh O.F. 2008. Metabolic profiles in goat does in late pregnancy with and without subclinical pregnancy toxemia. *Vet Clin Pathol.* 37, 434–437.
- Bellmann O.; Wegner J. et al. 2004. Beef versus dairy cattle: a comparison of metabolically relevant hormones, enzymes, and metabolites. *Livestock Production Science.* 89, 41–54.

- Berne, R.M.; Levy, M.N.; Koeppen, B.M.; Stanton, B.A. 2004. Fisiologia. 5ed., Ed. Elsevier: Rio de Janeiro-RJ. 1082p,
- Bicudo S.D., Sousa D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas. In: Mostra Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, 6, 2002, Botucatu, SP. Anais...Botucatu: FMVZ-UNESP. 2002. Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/sony/curtadur.pdf>, Acesso em: 05/11/14.
- Brondani W.C.; Lemes J.S.; Ferreira O.G.L.; Roll V.F.B.; Del Pino F.A.B. 2016. Perfil metabólico de ovelhas em gestação. Arch. Zootec. 65, 1-6.
- Caldeira RM, Belo AT, Santos CC, Vazques MI, Portugal AV. 2007. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. Small Rumin Res. 68, 233-241.
- Campos A.G., Afonso, J.A.B., Santos R.A., Mendonça C.L., Guimarães J.A. 2010. Estudo clínico-laboratorial da toxemia da prenhez em ovelhas: análise retrospectiva. Ci. Anim. Bras. 11(3), 623-628.
- Celi P., Di Trana A. & Claps S. 2008. Effects of perinatal nutrition on lactational performance, metabolic and hormonal profiles of dairy goats and respective kids. Small Rumin. Res. 79, 129-136.
- Firat A, Özpınar A. Metabolic Profile of Pre-Pregnancy, Pregnancy and Early Lactation in Multiple Lambing Sakız Ewes 1. Changes in Plasma Glucose, 3-Hydroxybutyrate and Cortisol Levels. 2002. Ann Nutr Metab. 46, 57–61.
- Ford E.J., Evans J., Robinson, I. 1990. Cortisol in pregnancy toxemia of sheep. Brit. Vet. J. 146, 539-542.
- Hefnawy A.E., Shousha S. & Youssef S. 2011. Hematobiochemical profile of pregnant and experimentally pregnancy toxemic goats. J. Basic Appl. Chem., Egypt, 1, 65-69.
- Henze P., Bickhardt K., Fuhrmann H. & Sallmann H.P. 1998. Spontaneous pregnancy toxemia (Ketosis) in sheep and the role of insulin. J. Am. Vet. Med. Assoc. 45, 225-226.
- Husted S.M.; Nielsen M.O.; Blache D.; Ingvarsen K.L. 2008. Glucose homeostasis and metabolic adaptation in the pregnant and lactating sheep are affected by the level of nutrition previously provided during her late fetal life. Domest. Anim. Endocrinol. 34, 419-431.

- Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. 2008. Clinical biochemistry of domestic animals. 6.ed. San Diego: Academic, 916p.
- Matthews D., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F. & Turner R.C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting glucose and insulina concentrations in man. *Diabetologia*. 28, 412-419.
- Oikawa, S.; Oetzel, G.R. 2006. Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *J. Dairy Sci.* 89, 2999-3005.
- Oliveira E.P., Souza M.L.A., Lima M.D.A. 2005. Índice HOMA (homeostasis model assessment) na prática clínica: uma revisão. *J Bras Patol Med Lab*. 41(4), 237-243.
- Payne J.M. & Payne S. 1987. *The Metabolic Profile*. Oxford University Press, Oxford. 179p.
- Pöppel A.G., Lasta C.S., González F.H.D., Kucharski L.C. & Silva R.S.M. 2009. Índices de sensibilidade à insulina em fêmeas caninas: efeito do ciclo estral e da piometra. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(4), 341-350
- Reece W.O. 2007. *Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos*. 12^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 926p.
- Regnault T.R.H., Oddy H.V., Nancarrow C., Srisankarajad N., Scaramuzzi R.J. 2004. Glucose - stimulated insulin response in pregnant sheep following acute suppression of plasma non-sterified fatty acid concentrations. *Rep. Biol. Endocrinol.* 2(64),1-10
- Santos F.C.O., Mendonça, C.L., Silva Filho A.P., Carvalho C.C.D., Soares P.C., Afonso J.A.B. 2011. Indicadores bioquímicos e hormonais de casos naturais de toxemia da prenhez em ovelhas. *Pesq. Vet. Bras.* 31(11), 974-980.
- Santos M.H.B., Oliveira M.A.L., Moraes E.P.B.X., Chalhoub M., Bicudo S.D. 2004. Diagnóstico de gestação por ultrassonografia de tempo real. In: Santos M.H.B., Oliveira M.A.L. & Lima P.F. (Eds.) *Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha*. São Paulo: Varela, p.97-116.
- Santos, F.C.O.; Mendonça, C.L. et al. 2011. Indicadores bioquímicos e hormonais de casos naturais de toxemia da prenhez em ovelhas. *Pesq. Vet. Bras.* 31(11), 974-980.

- Schlumbohm C.; Harmeyer J. 2003. Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. *J. Dairy Sci.* 86, 1953-1962.
- Schmitt E., Schneider A., Gourlat M.A., Schwegler E., Pereira R.A., Hoffmann D.C.A., Lopes M.S., Hax L.T., Del Pino F.A.B., Corrêa M.N. 2012. Correlação entre cálcio e insulina durante o teste de tolerância à glicose em ovelhas gestantes e não gestantes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64(5), 1127-1132.
- Sivan E, Boden G. 2003. Free fatty acids, insulin resistance, and pregnancy. *Curr Diab Rep.* 3(4), 319-322.
- Souto R.J.C., Afonso J.A.B., Mendonça C.L., Carvalho C.C.D., Silva Filho A.P., Cajueiro J.F.P., Lima E.H.F., Soares P.C. 2013. Achados bioquímicos, eletrolíticos e hormonais de cabras acometidas com toxemia da prenhez. *Pesq. Vet. Bras.* 33(10), 1174-1182.
- Todini L., Malfatti A., Valbonesi A., Trabalza-marinucci M. & Debenedetti A. 2007. Plasma total T3 and T4 concentrations in goats at different physiological stages, as affected by energy intake. *Small Rumin. Res.* 68, 285-290.
- Vasques A.C.J., Rosado L.E.F.P.L., Alfenas R.C.G., Geloneze B. 2008. Análise Crítica do Uso dos Índices do Homeostasis Model Assessment (HOMA) na Avaliação da Resistência à Insulina e Capacidade Funcional das Células-C Pancreáticas. *Arq Bras Endocrinol Metab*;52/1.
- Yildiz A., Balikci E., Gurdogan F. 2005. Serum Mineral Levels at Pregnancy and Postpartum in Single and Twin Pregnant Sheep. *Biological Trace Element Research* 107, 247-258.

Trabalho a ser enviado para a revista **BMC Veterinary Research**

As normas estão disponíveis em:

<https://bmcvetres.biomedcentral.com/submission-guidelines>

Comparação dos marcadores de estresse oxidativo entre gestação única e gemelar de ovelhas da raça Dorper durante a gestação, parto e pós-parto

Bianca P. Santarosa^{*a}; Gabriela N. Dantas^a; Danilo O. L. Ferreira^b; Yuri K. Sinzato^c; Débora C. Damasceno^c; Andreza A. Silva^d; Roberto C. Gonçalves^a

^a Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. ^{*}Autora para correspondência: biancasantarosavet@gmail.com.

^b Secretaria da Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, Casa da Agricultura de Agudos. Rua Odom Pessoa de Albuquerque, 788, Centro. Agudos, SP 17120-000, Brasil.

^c Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO), Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil.

^d Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, RJ 23890-000 Brasil.

RESUMO

A gestação em ovinos é uma condição fisiológica caracterizada por aumento expressivo das demandas energéticas para garantir desenvolvimento e crescimento fetal adequados, portanto mais suscetível ao estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi analisar os marcadores de estresse oxidativo em ovelhas durante a gestação e no parto imediato (até 48 horas pós-parto), comparando-se gestação única com gemelar. Foram utilizadas 60 ovelhas criadas em manejo semi-intensivo, híginas, da raça Dorper, com dois a cinco anos de idade. Foram constituídos dois grupos experimentais: Grupo 1: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação de feto único; Grupo 2: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação gemelar. Os

momentos experimentais foram definidos como: MI – imediatamente após a inseminação artificial (controle); MG30 – 30 dias de gestação; MG90 – 90 dias; MG120 – 120 dias; MG130 – 130 dias; MG140 – 140 dias; MP - dia do parto; MPP1 - 24 horas após o parto; MPP2 - 48 horas após o parto. Em todos os momentos colheram-se amostras de sangue venoso em tubos com heparina e, depois, foram processadas e armazenadas a -80°C até a análise laboratorial das concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), grupos tióis reduzidos (-SH) e das atividades enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT). Os valores de TBARS do G2 foram menores que G1 em MG90 e MG140. O sistema antioxidante do G2 foi eficaz para prevenir a peroxidação lipídica, demonstrado pelos maiores valores da SOD, glutathione (grupos tióis e GSH-Px) e catalase, principalmente no periparto. Portanto, não houve estresse oxidativo exacerbado nas ovelhas com gestação gemelar de forma geral, visto que o sistema antioxidante foi capaz de manter o equilíbrio apesar de existir a produção das espécies reativas ao oxigênio.

Palavras-chave: catalase, GSH-Px, grupos tióis reduzidos, ovinos, radicais livres, TBARS, SOD.

INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produtos do metabolismo celular normal e, em concentrações baixas ou moderadas, causam efeitos benéficos e estão envolvidos na expressão gênica, ação microbiana, fisiologia das respostas celulares nos processos de sinais de transdução e regulação (Mikkelsen e Wardman, 2003) e na fisiologia do sistema reprodutivo feminino (Al-Gubory et al., 2010). No entanto, a diminuição da capacidade antioxidante provoca maior formação de ERO, levando ao quadro de estresse oxidativo (Mohanty et al., 2014). O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre o sistema antioxidante e os agentes oxidantes, podendo provocar lesões teciduais e danos às organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos e proteínas (Buonocore et al. 2010, Burton e Jauniaux, 2011).

Os estudos sobre estresse oxidativo na Medicina Veterinária com foco nas enfermidades metabólicas (Celi, 2010, Celi 2011) e processos inflamatórios (Sordillo e Aitken, 2009) é uma área em ascensão em ruminantes.

Nas ovelhas, a gestação se destaca pela maior ocorrência de doenças metabólicas, pois neste período acontecem adaptações fisiológicas e anatômicas para crescimento e desenvolvimento fetal, especialmente nas últimas semanas. Para suprir essas alterações, há aumento na demanda do metabolismo energético e maior consumo de oxigênio. Por isso, essa condição fisiológica é mais predisposta ao estresse oxidativo (Celi, 2010; Rizzo et al., 2012; Mutinati et al., 2013; Nascimento et al., 2015).

Em ruminantes, o perfil das ERO e do sistema antioxidantes tem sido estudado no periparto (Castillo et al. 2005, Celi et al., 2008, Radin et al., 2015), durante a gestação (Oztabak et al., 2005; Erisir et al., 2009) e também relacionado à toxemia da prenhez (Al-Qudah, 2011). Rizzo et al. (2008) ainda mensuraram a concentração plasmática de EROs de forma global, 36h pré e pós-parto em 100 ovelhas e mostraram elevação a partir do parto com o pico 24h pós-parto.

Segundo Gür et al. (2011) há maior produção de ERO em gestação gemelar em ovelhas sadias, pois há maior requerimento de oxigênio e mais intensa peroxidação lipídica durante a primeira metade da prenhez. No entanto, não há estudos que tenham analisado os marcadores de estresse oxidativo no decorrer da gestação simples e gemelar de ovelhas híginas desde a concepção até o pós-parto.

Diante da relevância do período gestacional, que provoca alterações fisiológicas e, conseqüentemente, estresse oxidativo, o objetivo deste trabalho foi analisar as concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), grupo tióis reduzidos (-SH) e as atividades enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) de ovelhas da raça Dorper prenhes ao longo da gestação, durante o parto e pós-parto imediato e comparar entre a gestação única e gemelar.

MATERIAIS E MÉTODOS

O método adotado no presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e

Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu (Protocolo 189/2014).

Foram selecionadas ovelhas vazias, híginas, da raça Dorper, com dois a cinco anos de idade, que participaram de protocolo de sincronização de estro. Foi empregado o protocolo de longa duração (12 dias), no qual o implante vaginal com 0,33g de progesterona (Cidr®, Zoetis) foi colocado no dia 0 e permaneceu por 12 dias (D0 a D12), quando foi removido e, em seguida, foi administrado em cada animal 400 a 500UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon®, Zoetis) por via intramuscular (Bicudo e Sousa, 2002). Passadas 48 horas (D14), foi feita a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) por laparoscopia, com sêmen congelado, e realizaram-se as colheitas do primeiro momento, considerado controle (MI). Depois de 30 dias (MG30), foi procedido o diagnóstico de gestação única ou gemelar (Santos et al., 2004) com o Ultrassom portátil (My LabTM30 Vet Gold Esaote®, Esaote Healthcare do Brasil, São Paulo-SP, Brasil), com o transdutor linear com frequência de 5,0MHz, para o exame transretal, quando se definiu o grupo experimental em que a ovelha foi incluída. Foram delineados dois grupos experimentais: Grupo 1: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação de feto único; Grupo 2: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação gemelar. Os animais vazios foram excluídos do lote experimental. Para os demais momentos foi empregado o transdutor convexo com frequência de 3,5MHz (Santos et al., 2004), para avaliação da viabilidade fetal. Todas as ovelhas receberam vermífugo após o parto (Monepantel, Zolvix®, Novartis Saúde Animal), e vacina polivalente contra Clostridioses (Sintoxan-T Polivalente®, Merial) aos 30 e 60 dias antes do parto.

As ovelhas foram soltas pela manhã e ficaram a pasto durante o dia. A pastagem utilizada foi o capim Vaquero (cultivar *Cynodon dactylon*). No final da tarde, os animais foram presos em baias coletivas de 12m² em barracão de alvenaria, com cama de palha de arroz, onde foram alimentados com 0,5kg/animal de ração para manutenção e 1,0kg/animal de silagem de milho. No barracão havia disponibilidade *ad libitum* de sal mineral comercial para ovinos (Ovinofós com Monensina®, Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, Mairinque-SP, Brasil) em cochos de alvenaria cobertos. A água foi proveniente

de poço artesiano localizado na própria cabanha, e era disponível em cochos automáticos de forma *ad libitum*.

Os momentos experimentais foram definidos como: MI – imediatamente após a IATF (controle); MG30 – 30 dias de gestação; MG90 – 90 dias de gestação; MG120 – 120 dias de gestação; MG130 – 130 dias de gestação; MG140 – 140 dias de gestação; MP - dia do parto; MPP1 - 24 horas após o parto; MPP2 - 48 horas após o parto. As amostras de sangue das ovelhas foram colhidas em tubos com heparina sódica (BD Vacutainer®, BD Medical, Curitiba/PR, Brasil), mantidas em refrigeração em isopor com gelo até o processamento. As amostras foram centrifugadas (Centrífuga 5804E, Eppendorf, Hamburg, Germany) a 185 x g por dez minutos a 4° C para retirada do plasma, glóbulos brancos e plaquetas, por aspiração com micropipeta. Em seguida, para obtenção das hemácias, o sangue foi lavado com solução tampão salina-fosfato [PBS (Solução tampão salina-fosfato, Ceaquim, Botucatu, São Paulo, Brasil)] a 4°C e centrifugado a 1575 x g durante um minuto e o sobrenadante foi descartado. A lavagem foi repetida por três vezes. No tubo Eppendorf® de 2mL foi adicionado 1900µl de água deionizada e 100µl de hemácias lavadas para obtenção do hemolisado, que foi utilizado para determinação das concentrações de Hemoglobina, TBARS e -SH. No tubo Eppendorf® de 1,5mL foi pipetado 950µL de solução estabilizadora [2,7mM EDTA e 0,7mM 2-mercaptoetanol (Solução tampão salina-fosfato, Ceaquim, Botucatu, São Paulo, Brasil)] e 50µl de hemácias lavadas para obtenção do hemolisado, que foi usado para determinação da concentração de hemoglobina, atividade enzimática da SOD, GSH-Px e catalase. As amostras de hemolisado foram estocadas em triplicatas, armazenadas a -80°C, e descongeladas apenas no momento de análise, conforme metodologia adotada pelo Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO) da FMB/UNESP-Botucatu.

Produtos químicos e aparelhos utilizados

Todas as soluções foram preparadas usando escala analítica e artigos de vidro. A água ultrapura foi obtida do aparelho GEHAKA® Master System. As soluções: Hidroperóxido de t-butila (solução aquosa a 70%), Cloreto de cálcio

(CaCl₂ - ACS), ácido 5,5-Ditiobis (ácido 2- nitro-benzóico) (DTNB – pureza ≥ 98%), ácido etilenodiamina-tetracético (EDTA – pureza ≥ 99%), Glutathione Redutase (GSH-Rd_100-300 unidades/mg de proteína), L-Glutathione Reduzida (GSH - pureza 98%), Peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - ACS), Cloreto de magnésio (MgCl₂ - ACS), 2-mercaptoetanol (Pureza ≥99%), β-nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato em hidrato de sal tetrassódico (NADPH - pureza ≥93%), peroxidase (25.000 unidades), Vermelho de Fenol, Solução de PBS (NaCl 0.138M, KCl 0.0027M, pH 7,4); Cianeto de potássio (pureza ≥ 97%), Ferrocianeto de potássio (pureza ≥ 99%), Hidróxido de sódio (NaOH - pureza ≥97%), fosfato de sódio Monohidrato monobásico (NaH₂PO₄.H₂O ACS), Ácido de ácido 5-sulfosalicílico (pureza ≥95%), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA - pureza ≥98%) e TRIS (pureza ≥99,9%) foram adquiridas da Sigma-Aldrich®; o ácido clorídrico (HCl - A.C.S.) e o ácido pirogálico (pureza ≥ 99,9%) foram adquiridos no Synth®; o Álcool etílico (A.C.S.), trihidrato de fosfato de hidrogênio dipotássio (K₂HPO₄ - pureza ≥99%) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃ - pureza ≥99,5%) foram adquiridos da Merck; a D-Glucose Anidra (Dextrose - A.C.S.), Cloreto de Potássio (KCl - A.C.S.) e Cloreto de Sódio (NaCl - A.C.S.) foram adquiridos da Vetec®; o dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄ - A.C.S.) e fosfato de sódio Dibásico (Na₂HPO₄ - A.C.S.) foram adquiridos a partir de Dinâmica®. As determinações fotométricas foram realizadas com a leitura de microplacas Power Wave XS pelo software Biotek® e Gen5. As concentrações e as leituras cinéticas das reações foram realizadas sob temperatura controlada de 25°C. O agitador IKA® MS 3 Digital para microplaca e banho de água Quimis® foram utilizados durante os ensaios. As análises foram realizadas nos aparelhos pertencentes ao LAPGO.

Hemoglobina (Hb)

As concentrações de hemoglobina (Hb) foram utilizadas para a normalização dos biomarcadores de estresse oxidativo (TBARS, SOD, GSH-Px e SH) em eritrócitos lavados de acordo com o diluente utilizado (água ultrapura ou solução estabilizadora). Para a quantificação da hemoglobina, foram adicionados 197,5µL de solução de Drabkin mais 2,5µL de eritrócitos lavados em cada poço. A microplaca foi homogeneizada seguida de 10 minutos de

repouso. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 546nm. Os resultados foram expressos em gramas (g) de hemoglobina por decilitro (dL).

Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para a quantificação do TBARS, 500µL de eritrócitos lavados (amostras em água ultrapura) foram adicionados ao tubo de ensaio contendo 500µL de ácido sulfosalicílico a 3,0%, centrifugados a 11.000 x g durante três minutos e repousados durante 15min a 25°C. Em seguida, foram diluídos 500µL de água purificada (no branco) ou do sobrenadante (amostras) em 500µL de solução de TBA 0,67%. A mistura foi aquecida a 80°C durante 30 min. Após o aquecimento, as amostras foram colocadas em gelo durante 10 minutos e equilibradas a temperatura ambiente. Em seguida, 300µL foram pipetados em microplaca. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 535nm. Os resultados foram expressos em nM de malonaldeído (MDA) por mg de hemoglobina (nM/mgHb).

Grupo Tióis Reduzidos (-SH)

Para a quantificação de -SH em eritrócitos lavados (amostras em água ultrapura), foram adicionados 195µL de solução TRIS 0,1M/EDTA 0,5 mM, 1µL de eritrócitos lavados e 4µL de solução DTNB. Em seguida, a microplaca foi homogeneizada seguida de 10 minutos de repouso. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 412nm. Os resultados foram expressos como mmol/L de SH por mg de Hb (mM/mg de Hb).

Superóxido Dismutase (SOD)

Para a atividade da SOD, foram adicionados em cada poço 125µL de solução de TRIS 1M/EDTA 5mM mais 5µL dos eritrócitos lavados (amostras em água ultrapura). Depois, foram adicionados 10µL de solução de pirogalol em cada poço (30 segundos para pipetagem da solução em todas as microplacas). A microplaca foi agitada (500rpm) durante 20 min. Então, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 420nm. Os resultados foram expressos como UI de SOD por mg de Hb (UI/mg de Hb).

Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

Para avaliação da atividade da GSH-Px foram adicionados em poços 100µL (q.s) de TRIS 50mM e solução EDTA 5mM pH 7,6 (25°C) mais 0,5µL de eritrócitos lavados (amostras em solução estabilizadora). Em seguida, foram adicionados 50µL de solução MIX (GSH 9mM, GSH-Rd 4,55 UI/mL e NADPH 1,82mM) em cada poço. Para início da cinética, foram adicionados 20µL de solução de hidroperóxido de t-butil em cada poço e realizada a leitura durante 5 minutos com intervalos de 1 minuto a 25°C no leitor de microplacas com filtro de 340nm. Os deltas de absorbância foram calculados e os resultados expressos como mM de GSH-Px por minuto por mg de Hb (mM/min/mg de Hb).

Catalase

A atividade da catalase foi determinada nas amostras de hemácias lavadas através da cinética do decaimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O ensaio foi feito em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) com controle de temperatura usando cubetas de quartzo com volume de 1,5mL. Para a realização do ensaio foi pipetada uma solução de fosfato de sódio monobásico 0,1M e 1 µL de amostra (volume determinado após piloto com as amostras da espécie ovina). Para início da cinética uma solução de H₂O₂ 1M, foi pipetada para início da reação em volume equivalente à concentração final 0,2M na cubeta. A cinética foi realizada em comprimento de onda de 240nm, 25°C por 120 segundos. Os resultados foram expressos em nM/min/mg de Hb.

Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software SigmaStat 3.5. Para os parâmetros SOD, SH-, GSH-Px e catalase das análises de estresse oxidativo, foi realizada análise de medidas repetidas no tempo (One Way Repeated Measures Anova) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente seguida do teste de Comparações Múltiplas de Tukey para comparação das médias (P<0,05). Também em cada momento foi realizado o teste t de Student para comparação dos grupos de estudo (P<0,05). Já os dados de TBARS, por não apresentar distribuição normal, optou-se pela análise não paramétrica. Foi realizado o Teste de Friedman (Friedman Repeated Measures) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente seguida do teste de Comparações Múltiplas de

Tukey para comparação das medianas ($P < 0,05$). Também em cada momento foi realizado o Teste de Mann-Whitney para comparação dos grupos de estudo ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas mostram as medianas, primeiros e terceiros percentis do TBARS (Tabela 1); as médias e desvios-padrão dos Grupos Tióis Reduzidos (Tabela 2), SOD (Tabela 3), GSH-Px (Tabela 4) e Catalase (Tabela 4).

Tabela 1. Concentração de TBARS (nM/mg de Hb) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	TBARS		P
	G1	G2	
MI	38,8 [30,0 – 63,5] ab	37,7 [29,2 – 67,6] a	0,909
MG30	61,2 [35,9 – 115,4] ab	47,9 [38,9 – 52,3] a	0,065
MG90	80,2 [64,4 – 94,3] aA	52,9 [49,4 – 55,8] aB	<0,001
MG120	89,6 [55,0 – 109,7] ab	73,5 [31,7 – 129,1] a	0,588
MG130	87,2 [41,7 – 180,4] a	64,2 [39,7 – 146,3] a	0,419
MG140	46,0 [37,2 – 71,9] abA	38,1 [26,1 – 55,2] aB	0,034
MP	45,5 [37,8 – 79,3] ab	40,3 [24,2 – 64,4] a	0,159
MPP1	58,2 [25,4 – 116,0] ab	40,7 [25,9 – 73,9] a	0,575
MPP2	33,1 [23,6 – 76,1] b	45,0 [33,7 – 63,1] a	0,342
P	0,005	0,081	

Dados apresentados como Mediana, primeiros e terceiros percentis

^{a,b} Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

^{A,B} Medianas seguidas por letras diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

As medianas do TBARS (Tabela 1) se diferenciaram estatisticamente entre os grupos nos momentos MG90 e MG140, sendo o valor do grupo com gestação gemelar (G2) foi menor que o grupo de gestação única (G1). Sendo que a hipótese era de que ocorresse o contrário: níveis mais elevados de TBARS em ovelhas do G2, e ainda mais pronunciado no periparto. Esse fato discordou de Gür et al. (2011), que mostrou que o TBARS aumentou proporcionalmente ao número de fetos, já que a concentração em ovelhas com gestação gemelar foi maior comparado à simples.

Ao longo dos momentos, o grupo G1 apresentou diferença estatística, sendo que os momentos MG90 e MG130 apresentaram a maior concentração de TBARS e a menor foi encontrada 48h pós-parto. Já os valores das ovelhas

de gestação gemelar (G2) não apresentaram diferença no decorrer da prenhez, concordando com estudos prévios que analisaram a concentração de TBARS uma vez ao mês, durante os cinco meses de gestação das ovelhas (Erisir et al. 2009) e com outro estudo que mensurou em dois momentos (105 e 148 dias de gestação) (Oztabak et al., 2005). Castillo et al. (2005) relataram que vacas não apresentaram concentrações maiores de TBARS no periparto em relação ao início da gestação.

Tabela 2. Concentração dos Grupos Tióis Reduzidos (mM/mg de Hb) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	Grupos Tióis Reduzidos		P
	G1	G2	
MI	3,31 ± 0,37 bc	3,26 ± 0,37 b	0,664
MG30	2,98 ± 0,49 cdB	3,58 ± 0,64 bA	<0,001
MG90	3,33 ± 0,34 bc	3,35 ± 0,31 b	0,849
MG120	3,58 ± 0,70 b	3,47 ± 0,36 b	0,519
MG130	2,69 ± 0,36 d	2,66 ± 0,32 c	0,773
MG140	3,07 ± 0,33 bcdB	3,33 ± 0,50 bA	0,028
MP	3,28 ± 0,38 bc	3,45 ± 0,68 b	0,256
MPP1	4,22 ± 1,51 a	4,17 ± 0,94 a	0,893
MPP2	3,36 ± 0,46 bc	3,39 ± 0,29 b	0,823
P	<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste de teste t (P<0,05).

Os grupos Tióis reduzidos (Tabela 2) apresentaram diferença entre os grupos no primeiro momento da prenhez avaliado (MG30) e no último pré-parto (MG140), sendo que o grupo G2 apresentou maiores médias que G1. Isso pode ter ocorrido devido à maior atividade do sistema antioxidante nas fêmeas com gestação gemelar, pela maior demanda e alteração no metabolismo da ovelha durante o início da prenhez (MG30) comparado ao MI e no momento final antes do parto (MG140). O mesmo fato foi descrito por Castillo et al. (2005) em vacas leiteiras, que apresentaram aumento global de substâncias antioxidantes uma semana antes do parto e se manteve mais elevada até duas semanas pós-parto.

Ao longo da prenhez, ambos os grupos mostraram diferenças, e os maiores valores de Tióis foram encontrados 24h pós-parto e os menores no momento MG130. Diferentemente deste estudo, Erisir et al. (2009) encontrou maior média no segundo mês da gestação, sendo que depois decaiu no terceiro e estabilizou até o quinto mês.

Tabela 3. Atividade enzimática da SOD (UI/mg de Hb) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

Momentos	SOD		P
	G1	G2	
MI	35,0 ± 2,7 aA	31,4 ± 2,6 bcB	<0,001
MG30	32,2 ± 2,9 bcA	29,7 ± 2,9 cdB	0,004
MG90	26,0 ± 2,5 eB	29,3 ± 6,0 cdA	0,013
MG120	27,1 ± 3,8 de	27,4 ± 4,0 cd	0,803
MG130	31,4 ± 3,2 bcd	31,3 ± 3,6 bc	0,900
MG140	29,4 ± 2,6 cdeA	27,2 ± 3,2 cdB	0,013
MP	37,2 ± 1,6 a	35,5 ± 5,8 ab	0,155
MPP1	38,1 ± 2,9 a	36,2 ± 7,9 a	0,221
MPP2	31,0 ± 6,7 cdeA	26,7 ± 4,3 dB	0,011
P	<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste de teste t (P<0,05).

A atividade enzimática da SOD (Tabela 3) no grupo G1 foi maior que G2 nos momentos MI, MG30, MG140 e MPP2. Já no MG90, o G2 mostrou valor maior que G1. Neste momento, a menor atividade de SOD pode estar relacionada com maior lipoperoxidação (aumento de TBARS) no grupo G1. Em ambos os grupos, a maior atividade da SOD foi observada nos momento do parto (MP) e 24h pós-parto. Estes dados permitem inferir a maior ativação dos mecanismos antioxidantes diante da elevada produção de EROs nesse período, pelos processos de remodelação de tecidos relacionados e involução do útero e do seu colo (Mutinati et al., 2013).

Rizzo et al. (2008) investigaram concentrações de EROs fisiológicas, de forma global, 36h antes e depois do parto em ovelhas e constataram aumento até 36 horas pós-parto, como consequência da inflamação relacionada para o parto. A concentração de EROs aumentou no periparto devido à infiltração leucocitária maciça cervical, além das flutuações hormonais e metabólicas que

caracterizam o parto. No entanto, esses autores não analisaram se o aumento das EROs foi concomitante ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes, ou se o sistema antioxidante foi eficaz para impedir a lipoperoxidação, evitando-se o estresse oxidativo.

Tabela 4. Atividade enzimática da GSH-Px (mM/min/mg de Hb) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	GSH-Px		P
	G1	G2	
MI	11,7 ± 1,5 ab	12,2 ± 1,8 bc	0,202
MG30	11,9 ± 3,4 ab	12,7 ± 2,6 ab	0,363
MG90	12,2 ± 3,2 bc	11,8 ± 2,0 bc	0,614
MG120	10,5 ± 1,5 bB	11,9 ± 2,4 bcA	0,016
MG130	13,2 ± 2,7 a	14,3 ± 2,2 ab	0,109
MG140	11,3 ± 1,3 b	11,5 ± 2,1 bc	0,789
MP	12,0 ± 1,7 ab	11,8 ± 2,4 bc	0,683
MPP1	12,0 ± 2,1 ab	11,9 ± 2,9 bc	0,928
MPP2	9,0 ± 1,4 cB	10,4 ± 1,5 cA	0,002
P	<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste de teste t (P<0,05).

Nas médias da GSH-Px (Tabela 4), houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos momentos MG120 e MPP2, sendo o valor de G1 menor que G2. Esse fato se distinguiu do descrito por Gür et al. (2011), sendo valores de GSH-Px maiores em ovelhas com gestação única do que gemelar. No entanto, nesse estudo as ovelhas com gestação gemelar também apresentaram maior concentração de TBARS, sugerindo maior lipoperoxidação. Nesse sentido, no presente trabalho, pode-se dizer que o sistema antioxidante foi mais eficaz nas ovelhas do G2 do que nos animais do G1, uma vez que não apresentaram maiores concentrações de TBARS em relação às ovelhas de gestação simples.

Em relação a diferença observada entre os momentos na dosagem de GSH-Px, ambos os grupos apresentaram menores valores de 48h pós-parto. Isso pode ser justificado pelo consumo dos agentes oxidantes devido à intensa produção de EROs durante o parto (Rizzo et al., 2008). A queda nos níveis de

GSH-Px pós-parto também foi observada em cabras por Celi et al. (2008), cujos momentos de avaliação foram um, três e 21 dias pré-parto, 14 e 28 dias pós-parto. Entretanto, esses autores relataram ausência de diferença dos resultados da SOD entre os momentos.

Erisir et al. (2009) não avaliaram o momento do parto e pós-parto, porém observaram que a média da GSH-Px aumentou no segundo e terceiro mês e decaiu no quarto e quinto mês de gestação.

Tabela 5. Atividade enzimática da catalase (mM/min/mg de Hb) das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita.

M	Catalase		P
	G1	G2	
MI	32,0 ± 5,3 de	32,7 ± 6,3 bcd	0,659
MG30	27,1 ± 7,8 eB	33,4 ± 8,8 bcdA	0,010
MG90	29,6 ± 7,0 de	30,9 ± 4,6 cd	0,431
MG120	34,2 ± 4,9 cd	36,0 ± 6,4 abc	0,257
MG130	41,0 ± 7,1 b	40,8 ± 9,0 a	0,910
MG140	34,1 ± 6,5 cd	32,4 ± 6,5 bcd	0,354
MP	38,6 ± 4,7 bc	36,3 ± 6,9 abc	0,148
MPP1	47,4 ± 11,0 aA	38,6 ± 6,0 abB	0,001
MPP2	32,9 ± 9,6 cd	28,8 ± 5,6 d	0,081
P	<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste de teste t (P<0,05).

A atividade enzimática da catalase (Tabela 5) apresentou diferença entre os grupos em dois momentos: os valores de G2 foi maior do que G1 no primeiro momento da gestação analisado (MG30); e a média do G1 foi maior que G2 24h pós-parto (MPP1). Ao longo dos momentos, notou-se diferença em ambos os grupos, sendo que os maiores valores foram no MPP1 no G1 e MG130 no G2. Tal fato mostrou que a atividade enzimática da catalase foi maior e, portanto, o sistema antioxidante do grupo de gestação gemelar foi mais eficaz no início da gestação do que no momento pós-parto, visto que no G2 os menores valores foram observados no MPP2.

Embora com diferenças estatísticas em ambos os grupos, de forma heterogênea, as médias de todas as ovelhas mostraram comportamento semelhante, sendo que a atividade da catalase aumentou de MG140 para MP,

e de MP para MPP1, e depois diminuiu de MPP1 para MPP2. Isso pode ser justificado novamente pela maior produção de EROs nas primeiras 24h do periparto (Rizzo et al. 2008) e, depois de 48h (MPP2), já tende à estabilização, quando se pode observar neste estudo menor atividade da catalase, assim como da GSH-Px.

CONCLUSÕES

O sistema antioxidante dos animais do grupo G2 foi eficaz para prevenir a peroxidação lipídica, demonstrado pelos maiores valores da SOD e das glutatonas (grupos tíóis e GSH-Px) principalmente no periparto. Portanto, não houve estresse oxidativo exacerbado nas ovelhas com gestação gemelar, visto que o sistema antioxidante foi capaz de manter o equilíbrio, apesar de existir a produção das EROs, que é fisiológica durante a gestação e periparto.

CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

À FMVZ/UNESP, Botucatu-SP e ao Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO) da FMB/UNESP-Botucatu pela estrutura física e equipamentos utilizados para a realização do experimento. À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo Auxílio Regular ao Projeto de pesquisa (Processo 2015/08714-8) concedido. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela Bolsa de Doutorado concedida. À Cabanha Araí & Zumbi, localizada em Pardinho-SP, pelo uso dos animais e auxílio nas colheitas das amostras.

REFERÊNCIAS

- Al-Gubory K.H., Fowler, P.A.; Garrel, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 42: 1634-1650, 2010.
- Al-Qudah, K.M. Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. Vet Clin Pathol. 40/1:60-65, 2011.

- Bicudo S.D., Sousa D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas. In: Mostra Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, 6, 2002, Botucatu, SP. Anais...Botucatu: FMVZ-UNESP. 2002. Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/sony/curtadur.pdf>, Acesso em: 05/11/14.
- Buonocore G.; Perrone S.; Tataranno M.L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 15: 186-190, 2010.
- Burton G.J.; Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 25: 287–299, 2011.
- Castillo C.; Hernandez J. et al. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet J*. 169: .286-292, 2005.
- Celi P. The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. *R. Bras. Zootec*. 39: 348-363, 2010.
- Celi P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. 33: 233–240, 2011.
- Celi P.; Di Trana A.; Quaranta A. Metabolic profile and oxidative status in goats during the peripartum period. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 1004-1008, 2008.
- Erisir M, Benzer F, Kandemir FM. Changes in the rate of lipid peroxidation in plasma and selected blood antioxidants before and during pregnancy in ewes. *Acta Vet Brno* 78: 237–242, 2009.
- Gür S, Türk G, Demirci E, Yuce A, Sonmez M, Özer S., Aksu EH. Effect of Pregnancy and Foetal number on Diameter of Corpus Luteum, Maternal Progesterone Concentration and Oxidant/Antioxidant Balance in Ewes. *Reprod Dom Anim* 46: 289–295, 2011.
- Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*. 1; 22(37): 5734-54, 2003.
- Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol*. 28;5:84, 2014.

- Mutinati M.; Piccinno M., Roncetti M., Campanile D., Rizzo A., Sciorsci R.L. Oxidative Stress During Pregnancy in the Sheep. *Reprod Dom Anim.* 48: 353–357, 2013.
- Nascimento P.M., Morgado A.A., Nunes G.R., Nikolaus J.P., Weigel R.A., Lima A. S., Storillo V.M., Mori C.S., Sucupira M.C.A. Metabolismo oxidativo e perfil bioquímico de ovelhas Santa Inês no período periparto: efeito da suplementação parenteral com vitamina E. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina.* 36(3): 1397-1408, 2015.
- Oztabak K, Civelek S, Ozpinar A, Burcak G, Esen F. The effects of energy restricted diet on the activities of plasma Cu-Zn SOD, GSH-Px, CAT and TBARS concentrations in late pregnant ewes. *Turk J Vet Anim Sci* 29: 1067–1071, 2005.
- Radin L., Šimpraga M., Vince S., Kostelić A., Milinković -Tur S. Metabolic and oxidative status of Saanen goats of different parity during the peripartum period. *Journal of Dairy Research.* 82: 426–433, 2015.
- Rizzo A., Mutinati M., Spedicato M., Minoia G., Trisolini C., Jirillo F., Sciorsci R.L. First demonstration of an increased serum level of reactive oxygen species during the peripartal period in the ewes. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 30: 741-746, 2008.
- Rizzo A., Roscino M.T., Binetti F., Sciorsci R.L. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. *Reprod Dom Anim.* 47: 344–352, 2012.
- Santos, M.H.B. et al. Diagnóstico de gestação por ultrassonografia de tempo real. In: SANTOS, M.H.B. et al. (Eds.) *Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha.* São Paulo: Varela, 2004. p.97-116.
- Sordillo, L.M.; Aitken, S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128: 104–109, 2009.

Trabalho a ser enviado para a revista ***Pesquisa Veterinária Brasileira***.

As normas estão disponíveis em:

http://www.pvb.com.br/instrucoes_aos_autores.pdf

Trabalho

Comparação dos equilíbrios ácido-básico e eletrolítico do sangue venoso entre gestação única e gemelar de ovelhas da raça Dorper durante a gestação, parto e pós-parto²

Bianca P. Santarosa^{2*}; Gabriela N. Dantas²; Danilo O. L. Ferreira³; Andreza A. da Silva⁴; Roberto C. Gonçalves²

ABSTRACT.- Santarosa B.P., Dantas G.N., Ferreira D.O.L., da Silva A.A. & Gonçalves R.C. 2018. **[Comparison of electrolyte and acid-base balances of Dorper breed ewes between single and twin pregnancies during gestation, lambing and postpartum.]** Comparação dos equilíbrios ácido-básico e eletrolítico do sangue venoso entre gestação única e gemelar de ovelhas da raça Dorper durante a gestação, parto e pós-parto. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. E-mail: biancasantarosavet@gmail.com.

During pregnancy there are modifications in the metabolic profile of sheep that may predispose to the occurrence of metabolic disorders, of which pregnancy toxemia (PT) is highlighted. Hemogasometry is an examination that detects changes in acid-base and electrolyte balance effectively. The objectives of this study were to study the acid-base and electrolyte balance of sheep during gestation and in the immediate peripartum (up to 48 hours postpartum), comparing single gestation with twins. Sixty sheep were raised in a semi-intensive, healthy, Dorper breed, two to five years old. Two experimental groups were formed: Group 1: 30 ewes, with ultrasonographic diagnosis of single fetus gestation; Group 2: 30 ewes, with ultrasonographic diagnosis of twin pregnancy. The experimental moments were defined as: MI-immediately after artificial insemination (control); MG30 - 30 days of gestation; MG90 - 90 days of gestation; MG120 - 120 days of gestation; MG130 - 130 days of gestation; MG140 - 140 days of gestation; MP - lambing; MPP1 - 24h postpartum; MPP2 - 48h postpartum. At all times 1mL of blood was collected per jugular vein puncture for blood gas evaluation in a portable equipment (I-Stat®). The pH, carbon dioxide pressure (PCO₂), bicarbonate (HCO₃⁻), carbon dioxide total pressure (TCO₂), base excess (BE), sodium (Na⁺), potassium (K⁺), chloride (Cl⁻), ionized calcium (Ca⁺²), lactate, anion gap (AG) and strong ion difference (SID) were measured. This work showed that there were changes in acid-base and electrolyte balance in pregnant ewes, due to the decrease in BE, HCO₃⁻, TCO₂ and increase of lactate and AG during gestation, but the pH remained normal and did not present any difference moments in both groups. Comparing the groups, single-gestation ewes presented higher alkaline expenditure at delivery than twin-gestation, evidenced by lower levels of BE, HCO₃⁻, TCO₂. Lower Na⁺ levels were observed in prepartum; drop in K⁺ values with advancing gestation; hyperchloremia and hypocalcemia during gestation according to the reference standards for

² Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Tese de Doutorado da primeira autora. Auxílio financeiro (Proc. 2015/08714-8) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Bolsa de Doutorado da CAPES

² Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. *Autora para correspondência: biancasantarosavet@gmail.com.

³ Secretaria da Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, Casa da Agricultura de Agudos. Rua Odom Pessoa de Albuquerque, 788, Centro. Agudos, SP 17120-000, Brasil.

⁴ Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, RJ 23890-000 Brasil.

species; decreased iCa^{+2} levels in the final third of gestation. From this, it was concluded that the ewes of this study presented compensated and hyperchloremic metabolic acidosis, which can be considered physiological due to the increase in energetic demand during gestation, and more exacerbated in the peripartum.

INDEX TERMS: Blood gas analysis, pregnancy, small ruminants, sheep.

RESUMO.- Durante a gestação ocorrem modificações no metabolismo de ovelhas que podem predispor a ocorrência de transtornos metabólicos, dos quais se destaca a toxemia da prenhez (TP). A hemogasometria é um exame que detecta alterações nos equilíbrios ácido-básico e eletrolítico de forma eficaz. Os objetivos deste estudo foram estudar os equilíbrios ácido-básico e eletrolítico de ovelhas durante a gestação e no periparto imediato (até 48 horas pós-parto), comparando-se gestação única com gemelar. Foram utilizadas 60 ovelhas criadas em manejo semi-intensivo, híbridas, da raça Dorper, com dois a cinco anos de idade. Foram constituídos dois grupos experimentais: Grupo 1: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação de feto único; Grupo 2: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação gemelar. Os momentos experimentais foram definidos como: MI – imediatamente após a inseminação artificial (controle); MG30 – 30 dias de gestação; MG90 – 90 dias de gestação; MG120 – 120 dias de gestação; MG130 – 130 dias de gestação; MG140 – 140 dias de gestação; MP – dia do parto; MPP1 – 24h pós-parto; MPP2 – 48h pós-parto. Em todos os momentos foi colhido 1mL de sangue por punção da veia jugular para avaliação hemogasométrica em aparelho portátil (I-Stat®). Foram analisados neste trabalho os parâmetros: pH, pressão de dióxido de carbono (PCO_2), bicarbonato (HCO_3^-), pressão total de dióxido de carbono (TCO_2), excesso de bases (EB), sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), cálcio ionizado (iCa^{+2}), lactato, ânion gap (AG) e diferença de íons fortes (SID). Este trabalho mostrou que houve mudanças nos equilíbrios ácido-básico e eletrolítico nas ovelhas prenhe, pela diminuição do EB, HCO_3^- , TCO_2 e aumento do lactato e AG no decorrer da gestação, porém o pH se manteve dentro da normalidade e não apresentou diferença ao longo dos momentos em ambos os grupos. Comparando os grupos, as ovelhas de gestação única apresentaram maior consumo da reserva alcalina no momento do parto do que as de gestação gemelar, evidenciado pelo menores níveis de EB, HCO_3^- , TCO_2 . Foram observados níveis mais baixos de Na^+ no pré-parto; queda dos valores de K^+ com o avanço da gestação; hiperclorêmia e hipocalcemia durante a gestação segundo os padrões de referência para espécie; diminuição dos níveis de iCa^{+2} no terço final da gestação. A partir disso, concluiu-se que as ovelhas deste estudo apresentaram acidose metabólica compensada e hiperclorêmica, que pode ser considerada fisiológica pela aumento da demanda energética durante a gestação, e mais exacerbada no periparto.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: hemogasometria, pequenos ruminantes, gestação, ovinos.

INTRODUÇÃO

O período gestacional é acompanhado de diversas alterações anatômicas, hormonais e metabólicas devido à preparação para o parto e início da lactação. Essas modificações no perfil metabólico de ovelhas podem predispor a ocorrência de transtornos metabólicos, dos quais se destaca a toxemia da prenhez (TP), que acomete ovelhas e cabras no terço final da gestação (Campos et al. 2010, Souto et al. 2013, Souza et al. 2016).

Santos et al. (2011) estudaram a ocorrência de TP em ovelhas e verificaram acidose metabólica, que foi justificada pela cetonemia, que é consequência do processo de oxidação exacerbada dos ácidos graxos livres, que gera a produção excessiva de corpos cetônicos (acetoacetato, acetona e betahidroxibutirato). Como estes compostos têm características ácidas, elevam o ânion Gap (AG) e reduzem a concentração de bicarbonato (HCO_3^-), cloreto (Cl^-), sódio (Na^+) e potássio (K^+). Além disso, ovelhas e cabras podem apresentar hipocalcemia, hipocalemia, hiponatremia e hipomagnesemia (Souto et al., 2013).

A hemogasometria é a prova laboratorial que permite analisar os gases sanguíneos e o equilíbrio ácido-básico, de forma rápida e prática. Muitos distúrbios do equilíbrio ácido-básico trazem poucos transtornos ao organismo, porque são transitórios ou devidamente compensados pelo animal. Porém, em determinadas situações a correção desse perfil metabólico é essencial para a sobrevivência do indivíduo. Para isso, o exame hemogasométrico fornece dados para o diagnóstico, auxilia no tratamento (por exemplo: valores de excesso de bases para cálculo de volume de bicarbonato a ser infundido em um animal com acidose metabólica) e estabelece

prognóstico de várias enfermidades dos ruminantes, como a TP (Ortolani, 2003). González et al. (2012) constataram diminuição do pH sanguíneo, HCO_3^- e excesso de bases (EB); além do aumento do ânion Gap $[(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{HCO}_3^- + \text{Cl}^-)]$ em cabras experimentalmente induzidas a TP, indicando que tais parâmetros podem identificar precocemente casos desta doença.

O status ácido-básico do fluido extracelular é diretamente afetado pela concentração dos cátions fortes (Na^+ e K^+) e ânions fortes (Cl^- , S^{2-} e lactato). A mensuração de eletrólitos, como Na^+ , K^+ e Cl^- , para o cálculo da diferença de íons fortes (*SID-Strong Ion Difference* = $[\text{Na}^+ + \text{K}^+] - \text{Cl}^-$) fornece informações sobre o equilíbrio ácido-básico evidenciando a influência que os eletrólitos exercem sobre o mesmo (Constable 1999, Constable 2003).

Embora existam muitos trabalhos discutindo os achados clínico-laboratoriais de ovelhas com TP, não há na literatura estudos que analisaram o perfil metabólico de ovelhas desde a concepção até o parto e pós-parto, afim de identificar os processos fisiológicos da gestação em relação ao equilíbrio ácido-básico e eletrolítico, e a partir disso reconhecer alterações que auxiliem no diagnóstico precoce da doença. O objetivo deste trabalho foi analisar os equilíbrios ácido-básico e eletrolítico em ovelhas Dorper durante toda a prenhez, parto e pós-parto imediato, comparando gestações única e gemelar.

MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos adotados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu (Protocolo 189/2014).

Foram selecionadas ovelhas vazias, híginas, da raça Dorper, com dois a cinco anos de idade, que participaram de protocolo de sincronização de estro. Foi empregado o protocolo de longa duração (12 dias), no qual o implante vaginal com 0,33g de progesterona (Cidr®, Zoetis) foi colocado no dia 0 e permaneceu por 12 dias (D0 a D12). Após esse período foi removido e, em seguida, administrado em cada animal 400 a 500UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon®, Zoetis) por via intramuscular (Bicudo & Sousa 2002). Após 48 horas (D14), foi feita a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com sêmen congelado por laparoscopia, e realizaram-se as colheitas do primeiro momento, considerado controle (MI). Depois de 30 dias (MG30), foi procedido o diagnóstico de gestação única ou gemelar (Santos et al., 2004) com o Ultrassom portátil (My LabTM30 Vet Gold Esaote®, Esaote Healthcare do Brasil, São Paulo-SP, Brasil), com o transdutor linear com frequência de 5,0MHz, para o exame transretal, quando se definiu o grupo experimental em que a ovelha foi incluída.

Foram delineados dois grupos experimentais: Grupo 1: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação de feto único; Grupo 2: 30 ovelhas, com diagnóstico ultrassonográfico de gestação gemelar. Os animais vazios foram excluídos do lote experimental. Para os demais momentos foi empregado o transdutor convexo com frequência de 3,5MHz (Santos et al., 2004), para avaliação da viabilidade fetal. Todos as ovelhas receberam vermífugo após o parto (Monepantel, Zolvix®, Novartis Saúde Animal), e vacina polivalente contra Clostridioses (Sintoxan-T Polivalente®, Merial) aos 30 e 60 dias antes do parto.

As ovelhas eram soltas pela manhã e ficavam a pasto durante o dia. A pastagem utilizada foi o capim Vaquero (cultivar *Cynodon dactylon*). No final da tarde, os animais eram presos em baias coletivas de 12m² em barracão de alvenaria, com cama de palha de arroz, onde eram alimentados com 0,5kg/animal de ração para manutenção e 1,0kg/animal de silagem de milho. No barracão havia disponibilidade *ad libitum* de sal mineral comercial para ovinos (Ovinofós com Monensina®, Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, Mairinque-SP, Brasil) em cochos de alvenaria cobertos. A água era proveniente de poço artesiano localizado na própria cabanha, disponível em cochos automáticos de forma *ad libitum*. A dieta total fornecida pela propriedade foi submetida à análise bromatológica (realizada pelo Laboratório de Bromatologia – Departamento de Nutrição e Melhoramento Animal FMVZ/UNESP-Botucatu) e dos minerais (realizada pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo – Campinas-SP) da ração, silagem de milho e pastagem, conforme descrito nos Quadros 1 e 2.

Os momentos experimentais foram definidos como: MI – imediatamente após a IATF (controle); MG30 – 30 dias de gestação; MG90 – 90 dias de gestação; MG120 – 120 dias de gestação; MG130 – 130 dias de gestação; MG140 – 140 dias de gestação; MP - dia do parto; MPP1 - 24 horas após o parto; MPP2 - 48 horas após o parto. Todas as amostras de sangue total foram colhidas por punção da veia jugular pela manhã, com os animais em jejum alimentar, dos dois grupos experimentais e nos nove momentos. Foi colhido 1mL de sangue, em seringa de polietileno

previamente heparinizada com heparina sódica (Hemofol®, Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda., São Paulo-SP), acoplada a uma agulha 30x8mm (BD®, BD Medical, Curitiba-PR, Brasil) e posteriormente vedada com borracha. Foi realizada, imediatamente após a colheita, a avaliação hemogasométrica em aparelho portátil analisador de pH, eletrólitos e gases sanguíneos (I-STAT®, Abbott Laboratories, Illinois, EUA). Foram utilizados os cartuchos CG4+ e CHEM8+ (I-STAT®, Abbott Laboratories, Illinois, EUA). O primeiro mensurou os valores de pH, pressão de dióxido de carbono (PCO_2), pressão de oxigênio (PO_2), Lactato, calculou os valores de HCO_3^- , TCO_2 , EB, e saturação de oxigênio (sO_2). O segundo mensurou sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), cálcio ionizado (iCa^{+2}), ureia, glicose, creatinina e hematócrito; e calculou hemoglobina e ânion gap (AG). Além disso, foram calculados os valores da diferença de íons fortes [$\text{SID} - \text{Strong Ion Difference} = (\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{Cl}^-$].

Para análise estatística foi utilizado o software SigmaStat 3.5. Para todos os parâmetros das análises de hemogasometria, exceto EB, foi realizada análise de medidas repetidas no tempo (One Way Repeated Measures Anova) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente. Quando houve significância ($P < 0,05$) foi realizado o Teste Tukey para comparação das médias ($P < 0,05$). Também em cada momento foi realizado o teste t de Student para comparação dos grupos em estudo ($P < 0,05$). Já os dados de EB, por não apresentarem distribuição normal, optou-se pela análise não paramétrica. Foi realizado o Teste de Friedman (Friedman Repeated Measures) para comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo individualmente. Quando houve significância ($P < 0,05$) foi realizado o Teste Tukey para comparação das medianas ($P < 0,05$). Também em cada momento foi realizado o Teste de Mann-Whitney para comparação dos grupos em estudo ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH do sangue venoso (Quadro 3) das ovelhas não mostrou diferença entre os momentos e grupos, além disso todas as médias se mantiveram dentro dos padrões de referência para a espécie. Isso mostrou que os animais permaneceram saudáveis durante toda a gestação, embora alterações tenham sido detectadas ao longo da gestação em outros parâmetros do equilíbrio ácido-básico. Diferentemente deste estudo, Khatun et al. (2011), encontraram pH alcalino do sangue de ovelhas em cinco estágios da prenhez, e ainda descreveram diferença entre o primeiro (14 a 57 dias) e último períodos (121 a 140 dias) analisados, no entanto não encontraram explicação para o fato.

Os valores médios de PCO_2 (Quadro 3) das ovelhas deste estudo permaneceram dentro da normalidade para a espécie em ambos os grupos e todos os momentos. Houve diferença em dois momentos, sendo a média do G1 maior que G2 no MG30 e MG120. Os maiores valores em ambos os grupos foram encontrados no MI, o que pode ser justificado pela maior agitação dos animais durante o manejo de IATF, fazendo hipercapnia em relação aos demais momentos, quando as ovelhas já estavam mais acostumadas com as colheitas. Enquanto que os menores níveis de PCO_2 foram no MP para o G1 e MG120 para o G2, no entanto, sem significado clínico.

Nas medianas do EB (Quadro 4) houve diferença entre os grupos somente no MP, onde o grupo de gestação gemelar apresentou menor excesso de bases comparado ao grupo gestação simples. Apenas a mediana do MP do G1 esteve abaixo da faixa de normalidade para a espécie segundo Ortolani (2003). Em ambos os grupos os maiores valores foram observados no MI, quando as ovelhas ainda estavam vazias, e os menores resultados foram encontrados no MP. Isso representou o consumo da reserva alcalina durante o momento do parto, quando os animais estavam em cetonemia e, portanto, com acidose metabólica compensada, devido ao caráter ácido dos corpos cetônicos circulantes, visto a menor ingestão alimentar diante do aumento do volume do útero gravídico (Santos et al. 2011). Porém, no G2 os momentos MG120, MG130 e MG140 foram iguais ao MP. Isso pode ser justificado pelo fato das ovelhas com gestação gemelar já estarem submetidas a maior demanda energética desde o último mês de gestação, pelo maior desenvolvimento de dois cordeiros, e portanto já se encontrarem com cetonemia e portanto com déficit de bases.

As médias do HCO_3^- e TCO_2 (Quadro 5) se comportaram de forma semelhante, visto que o primeiro corresponde a 95% do segundo (Ortolani, 2003). Em ambos os parâmetros, as médias de G1 foram maiores que G2 no MG120, e o inverso aconteceu no MP. Isso mostrou que as ovelhas do G1 tiveram maior déficit de bases comparadas as ovelhas do G2, coincidindo com os valores de EB. Nos dois grupos e parâmetros as maiores médias foram observadas no MI e menores no MP. No G1 houve maior variação entre os momentos, já no G2 apenas o MI diferiu dos demais. Embora tenha apresentado diferença ao longo dos momentos, todas as médias permaneceram dentro da

normalidade para a espécie, mostrando alteração no metabolismo durante a gestação, que pode ser considerada fisiológica.

As médias do Lactato (Quadro 6) foram diferentes entre os grupos nos momentos MI e MG130, sendo que as ovelhas do grupo G1 apresentaram maiores valores que G2. No MG30, primeiro momento de análise do período gestacional, foram encontrados os menores valores em ambos os grupos estudados, assim como foi o único momento que apresentou resultados dentro da faixa de normalidade para a espécie. Enquanto que no MP mostraram-se os valores médios de lactato maiores do que nos demais momentos analisados. Semelhante a outras espécies, como humanos, equinos e bovinos, essa elevação durante o parto em ovinos é fisiológica, e se deve à estimulação generalizada do sistema nervoso simpático com liberação de adrenalina e de cortisol, durante e após o nascimento, promovendo não somente o aumento de lactato como também do volume globular, da glicose, da frequência cardíaca e dos ácidos graxos livres (Comline & Silver 1972). Silva et al. (2013), assim como neste estudo, também relataram níveis mais elevados de lactato em ovelhas mestiças Suffolk no momento do parto eutócico ($3,0 \pm 0,5 \text{ mmol/L}$).

As ovelhas de ambos os grupos apresentaram hiperlactatemia durante o MI, quando houve estresse com o manejo da IATF, e durante toda a gestação e pós-parto, exceto no MG30. Santos et al. (2011) descreveram níveis elevados de lactato em casos naturais de TP em ovelhas e atribuíram a cetonemia que leva a acidose metabólica, além de associar o processo glicolítico (glicose anaeróbica), que produz lactato a partir da glicose, contribuindo para o quadro da hiperlactatemia (Kaneko et al. 2008). Neste estudo, na ausência de manifestação clínica de TP, os níveis elevados de lactato se relacionaram provavelmente à alta demanda energética, que promoveu a produção mais exacerbada deste componente, além da elevação fisiológica durante o parto.

Os valores médios de AG (Quadro 6) dos grupos se diferiram no MG120 apenas, sendo G1 maior que G2. De forma semelhante em ambos os grupos, os momentos MI e MG30 foram iguais e depois os resultados foram aumentando do MG90 até o momento do parto (MP), permanecendo iguais até 48h pós-parto. Neste período, do MG90 até MPP2, as médias do AG das ovelhas prenhes de ambos os grupos mostraram acidose metabólica, no entanto, de forma compensada, visto que não houve alteração no pH sanguíneo.

Os grupos se diferenciaram entre si no MG140 para a dosagem de Na^+ (Quadro 7), sendo o G2 maior que G1. Todas as médias se mantiveram dentro da faixa de normalidade para a espécie. De forma geral, em ambos os grupos, as médias foram iguais do MI ao MG90, elevaram-se no MG130 (maiores valores), decaíram no MG140 e voltaram a ficar mais altas no MP. Azab et al. (1999), em cabras, também notaram níveis mais baixos de Na^+ uma semana antes do parto, corroborando com este estudo. Este fato pode ser justificado pela menor ingestão de alimentos no periparto, e a grande perda de fluidos corpóreos no momento do parto. Além disso, a produção da fração aquosa do colostro é composta pelos íons Na^+ , K^+ e Cl^- principalmente, e ocorre sete dias pré-parto (Azab et al. 1999).

As médias de K^+ (Quadro 7) dos grupos nos momentos MG130, MG140 e MP foram diferentes entre si, sendo G1 maior que G2. Ao longo dos momentos, observou-se que as médias do potássio decaíram do momento em que as ovelhas estavam vazias (MI) para o primeiro momento da prenhez analisado (MG30), e continuaram caindo até nos momentos pós-parto. A mesma situação foi observada por Azab e colaboradores (1999), que analisaram o equilíbrio eletrolítico de cabras quatro semanas pré e pós-parto. Foi constatado que a diminuição da ingestão alimentar pelo aumento do volume útero gravídico pode levar à hipocalcemia. Em relação ao padrão de normalidade para ovinos, as ovelhas foram hipocalêmicas nos momentos MP a MPP2 no G1; e MG30, MG120 a MPP2 no G2.

Houve diferença estatística entre os momentos para a mensuração de Cl^- (Quadro 8) apenas no MG120, onde G2 foi maior que G1. Todas as médias de ambos os grupos mostraram hiperclorêmia nas ovelhas, segundo os padrões de normalidade. No MG130 foram encontrados os maiores valores e no MG90 os menores, em ambos os grupos. A hiperclorêmia presente neste estudo não necessariamente pode ser relacionada à gestação, visto que a média dos valores de Cl^- das ovelhas no MI, quando estavam vazias, também era acima da referência, portanto não pode ser atribuído significado clínico.

Para iCa^{+2} (Quadro 8) não houve diferença entre grupos em nenhum dos momentos analisados. E em relação aos momentos, houve comportamento similar em ambos os grupos, sendo os maiores valores vistos em MG90, os menores em MI, e semelhança entre os demais. No entanto, todas as médias estiveram abaixo da normalidade para a espécie, embora as ovelhas não tenham apresentado nenhum sinal clínico de hipocalcemia. De forma geral, as ovelhas apresentaram elevação dos níveis de cálcio entre o MI e MG30, assim como de MG30 para MG90, sendo que decaiu

de MG90 para MG120, permanecendo igual até o MPP2. A diminuição dos níveis de cálcio pode estar relacionada à maior demanda encontrada durante o último mês da gestação devido à mineralização fetal, e à produção do colostro materno que requer quantidade considerável dos níveis circulantes do elemento (Souto et al. 2013).

Em humanos, considera-se 42mEq/L como valor normal de SID (Constable 2003). Em ovinos, Ferreira et al. (2014) estudaram a influência da suplementação com cloreto de amônio e descreveram que os animais do grupo controle (não suplementados) apresentaram valores médios de $41,78 \pm 1,56$ a $44,46 \pm 1,69$ mEq/L. Neste presente estudo, a média dos resultados das ovelhas de ambos os grupos apresentaram os valores mais baixos, portanto relacionado à acidose metabólica, no primeiro momento de análise da gestação (MG30), e os maiores valores 48h pós-parto. Esse fato pode ser explicado inicialmente pela adaptação do organismo materno à gestação observado aos 30 dias. No momento MPP2 houve normalização metabólica em relação ao desequilíbrio ácido-básico visto no periparto (EB - Quadro 4), porém ocorrido de forma fisiológica. Foi visualizada diminuição dos valores da SID no pré-parto: de MG130 para MG140.

A hemogasometria, neste experimento, mostrou que a gestação provocou acidose metabólica devido à hiperclorêmia (Quadro 8), com consequente diminuição da SID (Quadro 9), porém de forma compensada, já que não houve acidemia (Quadro 3). Apoiando-se nos conceitos da teoria dos íons fortes para interpretar as alterações ácido-básicas, deve-se considerar que o desequilíbrio eletrolítico é o evento primário e que a acidose se instalou como consequência. A redução da SID plasmática é acompanhada obrigatoriamente por acidose metabólica porque, em obediência ao princípio da eletroneutralidade, a elevação do Cl^- provoca redução da concentração de HCO_3^- (Constable 1999, Constable 2003).

CONCLUSÕES

Concluiu-se que as ovelhas deste estudo apresentaram acidose metabólica compensada e hiperclorêmica, sendo esse distúrbio mais evidente nos animais de gestação única. Apesar disso, esse distúrbio pode ser considerado fisiológico e consequência do aumento da demanda energética durante a gestação, e mais exacerbada no periparto.

AGRADECIMENTOS

À FMVZ/UNESP, Botucatu-SP pela estrutura física e equipamentos utilizados para a realização do experimento. À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo Auxílio Regular ao Projeto de pesquisa (Processo 2015/08714-8) concedido. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela Bolsa de Doutorado concedida. À Cabanha Araí & Zumbi, localizada em Pardinho-SP, pelo uso dos animais e auxílio nas colheitas das amostras.

REFERÊNCIAS

- Azab M.E. & Abdel-Maksoud H.A. 1999. Changes in some hematological and biochemical parameters during prepartum and postpartum periods in female Baladi goats. *Small Ruminant Research*. 34: 77-85.
- Bicudo S.D. & Sousa D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas. In: Mostra Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, 6, 2002, Botucatu, SP. Anais...Botucatu: FMVZ-UNESP. 2002. Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/sony/curtadur.pdf>, Acesso em: 05/11/14.
- Campos A.G., Afonso, J.A.B., Santos R.A., Mendonça C.L. & Guimarães J.A. 2010. Estudo clínico-laboratorial da toxemia da prenhez em ovelhas: análise retrospectiva. *Ci. Anim. Bras.* 11(3): 623-628.
- Comline R.S. & Silver M. 1972. The composition of foetal and maternal blood during parturition in the ewe. *J. Physiol.*, 222: 233-256.
- Constable P.D. 1999. Clinical assessment of acid-base status: strong ion difference theory. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 15:447-471.
- Constable P.D. 2003. Hyperchloremic acidosis: the classic example of strong ion acidosis. *Anesth. Analg.* 96:919-922.

- Ferreira D.O.L., Santarosa B.P., Sacco S.R., Dias A., Amorim R.M., Chiacchio S.B., Lisboa J.A.N. & Gonçalves R.C. 2014. Efeito da suplementação de cloreto de amônio sobre o equilíbrio ácido-básico e o pH urinário de ovinos confinados. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(8):797-804.
- González F.H.D., Hernández F., Madrid J., Martínez-Subiela S., Cerón J.J. & Tecles F. 2012. Acid-base and electrolyte status during early induced pregnancy toxemia in goats. *The Veterinary Journal*. 193: 598-599.
- Kaneko J.J., Harvey J. W. & Bruss M. L. 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6.ed. San Diego: Academic. 916p.
- Khatun A., Wani G.M., Bhat J.I.A., Choudhury A.R. & Khan M.Z. 2011. Biochemical Indices in sheep during different stages of pregnancy. *Asian J. An. Vet. Advances*. 6 (2): 175-181.
- Ortolani, E.L. 2003. Diagnóstico e tratamento de alterações ácido-básicas em ruminantes. In: *Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária do Rio Grande do Sul*, p.15-29.
- Santos M.H.B., Oliveira M.A.L., Moraes E.P.B.X., Chalhoub M. & Bicudo S.D. 2004. Diagnóstico de gestação por ultrassonografia de tempo real. In: Santos M.H.B., Oliveira M.A.L. & Lima P.F. (Eds.) *Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha*. São Paulo: Varela. p.97-116.
- Santos F.C.O., Mendonça C.L., Silva Filho A.P., Carvalho C.C.D., Soares P.C. & Afonso J.A.B. 2011. Indicadores bioquímicos e hormonais de casos naturais de toxemia da prenhez em ovelhas. *Pesq. Vet. Bras.* 31(11): 974-980.
- Silva L.P., Lourenço M.L.G., Grandi M.C., Vela Ulian C.M., Sudano M.J. & Chiacchio S.B. 2013. Concentração de lactato sérico em ovelhas e cordeiros mestiços (1/2 Suffolk) nascidos em eutocia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65(4): 989-994.
- Souto R.J.C., Afonso J.A.B., Mendonça C.L., Carvalho C.C.D., Silva Filho A.P., Cajueiro J.F.P., Lima E.H.F. & Soares P.C. 2013. Achados bioquímicos, eletrolíticos e hormonais de cabras acometidas com toxemia da prenhez. *Pesq. Vet. Bras.* 33(10): 1174-1182.
- Souza B.C., Sena L.S., Loureiro D., Raynal J.T, Sousa T.J., Bastos B.L., Meyer R. & Portela R.W. Determinação de valores de referência séricos para os eletrólitos magnésio, cloretos, cálcio e fósforo em ovinos das raças Dorper e Santa Inês. *Pesq. Vet. Bras.* 36(3):167-173, 2016.

Quadros

Quadro 1. Análise bromatológica da ração, silagem de milho e capim Vaquero utilizados no experimento. Resultados expressos em 100% de matéria seca.

Amostra	% MS	% PB	% EE	% MINERAIS	% FDN	% FDA	% Hemicelulose	pH	Energia cal/g	Celulose	Lignina
Ração	88.45	20.85	9.10	6.27	14.58	5.05	9.53	-	3871	-	-
Silagem de Milho	27.83	8.28	3.20	3.84	50.55	29.51	21.04	3.53	-	-	-
Capim Vaquero	26.19	13.48	5.94	6.59	76.39	33.75	42.64	-	-	23.89	7.46

MS- Matéria seca; PB - Proteína bruta; EE - Extrato etéreo; FB - Fibra bruta; FDN - fibra em detergente neutro; FDA - fibra em detergente ácido

Quadro 2. Análise dos minerais de da ração, silagem de milho e capim Vaquero utilizados no experimento. Resultados expressos em matéria seca (ppm).

Amostra	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Cu	Zn	Na	B	Co	Mo	Al
Ração*	-	7290	6250	10920	2260	3370	250	120	35	200	5230	190	1	12	130
Silagem de Milho	14160	1670	13410	2960	2520	1350	271,5	46,5	6	20	74,5	2,6	<0,3	<0,3	413
Capim Vaquero	17430	2290	14140	4350	1850	2800	270,5	42,5	7,2	27,5	82,2	2	<0,3	<0,3	254,1

*Umidade 85º: 11,40%; Umidade 110º: 11,77%; Matéria Orgânica: 92,11%; Cinzas: 7,89%

Quadro 3. Concentração do pH e PCO₂ (mmHg) do sangue venoso das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	pH		P	PCO ₂		P
	G1	G2		G1	G2	
MI	7,38 ± 0,08	7,40 ± 0,05	0,439	41,4 ± 5,3 a	42,2 ± 3,9 a	0,580
MG30	7,38 ± 0,03	7,39 ± 0,04	0,292	38,2 ± 2,9 abcA	36,4 ± 2,7 bcB	0,025
MG90	7,37 ± 0,07	7,40 ± 0,04	0,109	40,6 ± 7,0 ab	37,8 ± 4,0 bc	0,105
MG120	7,39 ± 0,06	7,40 ± 0,04	0,402	38,6 ± 5,4 abcA	34,8 ± 3,7 cB	0,007
MG130	7,37 ± 0,05	7,39 ± 0,03	0,285	37,1 ± 4,4 bc	35,7 ± 3,8 bc	0,251
MG140	7,39 ± 0,08	7,39 ± 0,04	0,831	37,3 ± 5,7 bc	36,5 ± 4,5 bc	0,566
MP	7,35 ± 0,08	7,38 ± 0,05	0,094	36,2 ± 4,6 c	37,1 ± 4,1 bc	0,441
MPP1	7,37 ± 0,07	7,38 ± 0,06	0,418	37,8 ± 5,4 abc	37,9 ± 5,3 bc	0,931
MPP2	7,38 ± 0,08	7,37 ± 0,07	0,610	37,8 ± 4,0 abc	38,5 ± 3,1 b	0,515
P	0,195	0,651		<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t (P<0,05).

pH sanguíneo: 7,32 a 7,54 (Kaneko et al. 2008); 7,28 a 7,42 (Ortolani, 2003); PCO₂: 34 a 45mmol/L (Ortolani, 2003)

Quadro 4. Concentração de EB (mmol/L) do sangue venoso das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	EB		P
	G1	G2	
MI	1,0 [-3,0 - 2,2] a	1,0 [-2,0 - 3,0] a	0,467
MG30	-2,0 [-3,0 - -1,0] ab	-3,0 [-5,0 - 1,0] ab	0,300
MG90	-2,0 [-2,0 - -4,0] abc	-2,0 [-3,0 - 0,0] ab	0,495
MG120	-1,0 [-1,0 - -5,0] ab	-4,0 [-5,0 - -1,0] b	0,174
MG130	-4,0 [-4,0 - -5,0] bc	-4,0 [-5,0 - -2,0] b	0,908
MG140	-3,0 [-3,0 - -5,0] abc	-3,5 [-5,0 - 0,0] b	0,834
MP	-5,0 [-5,0 - -7,0] cB	-4,0 [-5,0 - -2,0] bA	0,046
MPP1	-3,0 [-3,0 - -6,0] bc	-2,5 [-6,0 - 0,0] ab	0,480
MPP2	-2,0 [-2,0 - -5,0] abc	-2,0 [-5,0 - 1,0] ab	0,939
P	<0,001	<0,001	

Dados apresentados como medianas, primeiro e terceiro percentis.

^{a,b}Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B}Medianas seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo Teste de Mann-Whitney (P<0,05).

EB: -4 a 2mmol/L (Ortolani, 2003).

Quadro 5. Concentrações de HCO_3^- e TCO_2 (mmol/L) do sangue venoso das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	HCO_3^-			TCO_2		
	G1	G2	P	G1	G2	P
MI	24,4 ± 3,5 a	25,6 ± 2,6 a	0,196	25,6 ± 3,5 a	29,6 ± 2,6 a	0,149
MG30	22,4 ± 1,8 ab	21,9 ± 2,2 b	0,348	23,4 ± 1,8 ab	23,0 ± 2,2 b	0,421
MG90	22,7 ± 2,1 ab	22,7 ± 2,0 b	0,980	23,9 ± 2,1 ab	23,8 ± 2,0 b	0,895
MG120	22,7 ± 2,3 abA	21,2 ± 2,7 bB	0,035	23,8 ± 2,4 abA	22,3 ± 2,8 bB	0,043
MG130	21,2 ± 2,0 bc	21,2 ± 2,5 b	0,940	22,3 ± 2,2 bc	22,1 ± 2,6 b	0,795
MG140	21,9 ± 2,9 b	21,8 ± 2,8 b	0,862	23,0 ± 3,0 b	22,6 ± 3,0 b	0,699
MP	19,4 ± 3,2 cB	21,6 ± 3,0 bA	0,016	20,5 ± 3,4 cB	22,4 ± 3,4 bA	0,049
MPP1	21,2 ± 3,2 bc	22,1 ± 2,9 b	0,345	22,3 ± 3,3 bc	23,0 ± 3,0 b	0,396
MPP2	22,2 ± 3,2 b	22,2 ± 3,7 b	0,980	23,0 ± 3,5 b	23,3 ± 3,5 b	0,767
P	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t ($P<0,05$).

HCO_3^- : 20 a 25mmol/L; TCO_2 : 21 a 28mmol/L (Kaneko et al. 2008); HCO_3^- : 19 a 25mmol/L; TCO_2 : 19 a 26mmol/L (Ortolani, 2003)

Quadro 6. Concentrações de Lactato (mmol/L) e AG (mEq/L) do sangue venoso de ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos (M) de colheita.

M	Lactato			AG		
	G1	G2	P	G1	G2	P
MI	3,1 ± 2,9 bcA	1,7 ± 1,1 cdB	0,033	18,3 ± 3,5 e	18,0 ± 2,0 e	0,789
MG30	1,0 ± 0,7 d	0,8 ± 0,5 d	0,208	18,9 ± 1,3 e	19,1 ± 1,6 de	0,640
MG90	2,3 ± 1,9 bcd	1,8 ± 1,5 bcd	0,393	21,6 ± 3,7 bcd	21,3 ± 2,1 bc	0,712
MG120	1,9 ± 1,7 cd	1,5 ± 1,0 cd	0,396	20,9 ± 2,3 dA	19,3 ± 1,8 deB	0,009
MG130	2,1 ± 1,4 bcdA	1,4 ± 0,6 cdB	0,045	22,9 ± 1,9 bcd	22,3 ± 2,4 abc	0,373
MG140	2,2 ± 2,8 bcd	1,4 ± 0,9 cd	0,185	21,1 ± 1,8 cd	20,5 ± 1,4 cd	0,267
MP	5,3 ± 4,2 a	3,3 ± 2,5 a	0,060	24,1 ± 2,8 a	23,3 ± 2,9 a	0,317
MPP1	3,9 ± 2,8 ab	3,0 ± 2,0 ab	0,214	23,0 ± 2,1 abc	22,6 ± 1,9 ab	0,571
MPP2	2,4 ± 1,6 bcd	2,5 ± 1,7 abc	0,841	23,0 ± 3,1 ab	23,3 ± 1,5 a	0,966
P	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t ($P<0,05$).

Lactato: 1 a 1,33mmol/L; AG: 10 a 20mmol/L (Kaneko et al. 2008)

Quadro 7. Concentrações de Na⁺ e K⁺ (mmol/L) do sangue venoso das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita.

M	Na ⁺			K ⁺		
	G1	G2	P	G1	G2	P
MI	143,6 ± 2,8 e	144,7 ± 1,5 d	0,088	5,0 ± 1,9 a	4,5 ± 0,9 a	0,269
MG30	146,1 ± 2,0 d	146,1 ± 1,8 d	0,967	4,0 ± 0,4 bc	3,8 ± 0,3 bc	0,106
MG90	145,1 ± 1,8 de	145,3 ± 1,5 d	0,597	4,4 ± 1,0 ab	4,1 ± 0,3 b	0,175
MG120	147,7 ± 1,5 c	147,9 ± 1,5 c	0,667	3,9 ± 0,4 bc	3,8 ± 0,3 bc	0,281
MG130	150,5 ± 2,1 a	150,5 ± 2,3 a	0,918	4,0 ± 0,5 bcA	3,7 ± 0,3 cB	0,003
MG140	147,7 ± 1,1 cB	148,7 ± 2,0 cA	0,039	3,9 ± 0,4 bcA	3,7 ± 0,3 cB	0,012
MP	149,2 ± 2,2 abc	150,4 ± 2,6 ab	0,077	3,8 ± 0,3 bcA	3,6 ± 0,4 cB	0,035
MPP1	149,6 ± 1,7 ab	149,0 ± 2,1 bc	0,219	3,6 ± 0,4 c	3,8 ± 0,4 bc	0,106
MPP2	148,8 ± 1,7 bc	149,0 ± 1,3 abc	0,699	3,6 ± 0,3 c	3,7 ± 0,4 c	0,687
P	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t (P<0,05).

Na: 139 a 152mmol/L; K: 3,9 a 5,4mmol/L (Kaneko et al. 2008).

Quadro 8. Concentrações de Cl⁻ e iCa⁺² (mmol/L) do sangue venoso das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita.

M	Cl ⁻			iCa ⁺²		
	G1	G2	P	G1	G2	P
MI	109,2 ± 3,2 cd	108,8 ± 2,7 cd	0,612	0,72 ± 0,10 c	0,76 ± 0,11 c	0,202
MG30	111,4 ± 2,2 abc	111,7 ± 2,6 ab	0,652	0,91 ± 0,10 b	0,91 ± 0,10 b	0,928
MG90	107,3 ± 2,4 d	108,1 ± 2,5 d	0,268	1,04 ± 0,13 a	1,05 ± 0,16 a	0,869
MG120	110,5 ± 2,6 bcB	112,6 ± 3,0 abA	0,009	0,90 ± 0,13 b	0,86 ± 0,11 bc	0,291
MG130	113,0 ± 2,6 a	113,4 ± 2,4 a	0,529	0,91 ± 0,15 b	0,85 ± 0,14 bc	0,117
MG140	111,2 ± 2,7 abc	112,8 ± 3,4 b	0,067	0,87 ± 0,09 b	0,88 ± 0,18 b	0,849
MP	112,5 ± 2,9 ab	112,3 ± 3,7 ab	0,792	0,91 ± 0,12 b	0,88 ± 0,14 b	0,424
MPP1	112,1 ± 2,9 ab	111,2 ± 3,1 ab	0,263	0,85 ± 0,15 b	0,89 ± 0,11 b	0,350
MPP2	110,4 ± 4,5 c	110,5 ± 2,7 bcd	0,904	0,90 ± 0,13 b	0,93 ± 0,11 ab	0,346
P	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t (P<0,05).

Cl: 95 a 103mmol/L; iCa: 1,4 a 1,6mmol/L (Kaneko et al. 2008).

Quadro 9. Concentrações da SID (mmol/L) do sangue venoso das ovelhas dos dois grupos experimentais (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita.

Momentos	SID		P
	G1	G2	
MI	39,4 ± 3,4 bc	40,4 ± 3,1 abcd	0,254
MG30	38,7 ± 2,2 c	38,2 ± 2,2 d	0,467
MG90	42,2 ± 2,6 a	41,4 ± 2,8 abc	0,278
MG120	41,1 ± 2,7 abA	39,0 ± 2,9 cdB	0,011
MG130	41,5 ± 2,8 b	40,8 ± 3,4 abc	0,392
MG140	40,5 ± 2,9 abc	39,6 ± 3,1 bcd	0,301
MP	40,5 ± 1,8 abc	41,8 ± 2,7 ab	0,056
MPP1	41,1 ± 2,8 ab	41,6 ± 1,9 abc	0,488
MPP2	42,1 ± 4,1 a	42,2 ± 2,5 a	0,932
P	<0,001	<0,001	

Dados apresentados como média ± desvio-padrão.

^{a,b}Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey (P>0,05).

^{A,B} Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferiram estatisticamente pelo teste t (P<0,05).

SID: 42mEq/L - humanos (Constable, 2003).

1. Discussão geral

- o peso vivo das ovelhas do G2 foram maiores que G1 desde a IATF, o que provavelmente influenciou na taxa de prolificidade desses animais, devido à maior taxa de ovulação;
- a partir do MG120, o perfil proteico se modificou em ambos os grupos, com menores níveis de ureia, PT, albumina e globulina, mostrando que a demanda metabólica realmente se intensificou no último mês da gestação. Porém, o aporte nutricional foi suficiente para as exigências, mantendo-se dentro da faixa de normalidade;
- para colesterol e triglicérides a mudança ocorreu de MG140 para MP, quando os níveis diminuíram em ambos os grupos;
- o G1 apresentou elevação de AST no MPP1 em relação ao G2 e ao padrão de referência, porém se normalizou no MPP2;
- o G1 apresentou valores maiores de triglicérides em relação ao G2 devido à maior demanda de produção de colostro para dois cordeiros;
- glicemia não diferiu durante a gestação (MG30 a MG140), mas foi elevada no MP, que coincidiu com o aumento de cortisol, insulina e HOMA IR;
- o glucagon não foi um bom marcador neste estudo, devido à dificuldade laboratorial de execução. Também não apresentou comportamento inverso da insulina, conforme era esperado;
- T3 apresentou queda nos níveis no pós-parto imediato (MPP1) e os valores de T4 diminuíram no parto em ambos os grupos;
- o HOMA IR pode ser aplicado para avaliar a resistência à insulina em ovinos, porém mais estudos devem ser feitos para estabelecer um padrão de normalidade;
- esperava-se encontrar nas ovelhas com gestação gemelar (G2) níveis mais elevados de TBARS e ainda mais pronunciado no periparto. No entanto, o sistema antioxidante desse grupo de animais foi eficaz para prevenir a peroxidação lipídica, demonstrado pelos maiores valores da SOD e das glutatonas (grupos tíóis e GSH-Px) principalmente no periparto. Portanto, não houve estresse oxidativo exacerbado nas ovelhas com gestação gemelar de forma geral, visto que o sistema antioxidante foi capaz de manter o equilíbrio

apesar de existir a produção das EROs, que é fisiológica durante a gestação e periparto;

- houve mudanças no equilíbrio ácido-básico e eletrolítico nas ovelhas prenhes, pela diminuição do EB, HCO_3^- , TCO_2 e aumento do lactato e AG no decorrer da gestação, porém o pH se manteve dentro da normalidade e não apresentou diferença ao longo dos momentos em ambos os grupos;
- comparando os grupos, as ovelhas de gestação única apresentaram maior gasto alcalino no momento do parto do que as de gestação gemelar, evidenciado pelo menores níveis de EB, HCO_3^- , TCO_2 ;
- em ambos os grupos, foram observados níveis mais baixos de Na^+ no pré-parto e queda dos valores de K^+ com o avanço da gestação; hiperclorêmia e hipocalcemia durante a gestação segundo os padrões de referência para espécie; diminuição dos níveis de iCa^{+2} no terço final da gestação;
- as ovelhas apresentaram acidose metabólica compensada e hiperclorêmica, que pode ser considerada fisiológica pelo aumento da demanda energética durante a gestação e mais exacerbada no periparto.

2. Conclusões gerais

Não houve manifestação de TP no presente estudo, provavelmente pelo manejo geral adequado da propriedade, no que se diz respeito ao plano nutricional, boas instalações e sanidade do rebanho. Portanto, não foi possível prever a ocorrência da doença a partir das análises laboratoriais realizadas. No entanto, estabeleceu-se panorama geral metabólico da ovelha prenhe da raça Dorper em condições de criação semi-intensiva, além de ter a comparação entre gestação única e gemelar.

Foi possível também concluir que o metabolismo da ovelha com gestação gemelar não apresenta maior predisposição aos transtornos metabólicos e ao desenvolvimento da TP em relação à ovelha com gestação simples. Isso porque o metabolismo depende muito mais da condição nutricional e escore corporal do que simplesmente pelo tamanho ou número de fetos. Neste trabalho, as ovelhas com gestação gemelar tiveram melhor adaptação às mudanças fisiológicas provocadas pela prenhez, visto os resultados do sistema antioxidante frente aos agentes oxidantes, bem como para manter o equilíbrio ácido-básico.

Os novos conhecimentos proporcionaram melhor entendimento do organismo da fêmea ovina prenhe e suas alterações metabólicas, o que auxiliará no diagnóstico mais precoce de desordens que possam comprometer a produção animal. Além disso, esses dados serão benéficos para realização de novos estudos na área, pois podem ser utilizados como referência em animais hípidos nesta condição produtiva.

3. Bibliografia

- AL-GUBORY, K.H.; FOWLER, P.A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v. 42, p.1634–1650, 2010
- AL-QUDAH, K.M. Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. *Vet Clin Pathol*. v.40/1, p.60-65, 2011.
- ANDREWS, A.H. Pregnancy toxemia in ewe. *Practice*. v.19, p. 306–312, 1997.
- ARAÚJO, C.A.S.C. *Estudo comparativo do perfil metabólico e hormonal de ovelhas com gestação única, gemelar e não gestantes alimentadas com dieta de alta densidade energética*. 212p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ARAÚJO, C.A.S.C.; NIKOLAUS, J.P.; MORGADO, A.A.; MONTEIRO B.M.; RODRIGUES, F.A.M.L.; VECHIATO, T.A.F.; SOARES, P.C.; SUCUPIRA, M.C.A. Perfil energético e hormonal de ovelhas Santa Inês do terço médio da gestação ao pós-parto. *Pesq. Vet. Bras*. 34(12):1249-1255, 2014.
- ARCO (Associação Brasileira de Criadores de Ovinos). Disponível em: <http://www.arcoovinos.com.br/index.php/mn-srgo/mn-padroesraciais/55-dorper>. Acesso em 17/03/2018.
- BALIKCI, E.; YILDIZ, A.; GURDOGAN F. Investigation on some biochemical and clinical parameters for pregnancy toxemia in Akkaraman ewes. *J. Anim. Vet. Adv*. v.8, n.7, p.1268-1273, 2009.

- BANI ISMAIL, Z.; AL-MAJALI, A.M. et al. Metabolic profiles in goat does in late pregnancy with and without subclinical pregnancy toxemia. *Vet Clin Pathol* v.37, p.434–437, 2008.
- BELLMANN, O.; WEGNER, J. et al. Beef versus dairy cattle: a comparison of metabolically relevant hormones, enzymes, and metabolites. *Livestock Production Science*. v.89, p.41–54, 2004.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. *Fisiologia*. 5ed., Ed. Elsevier: Rio de Janeiro-RJ. 1082p, 2004.
- BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M.L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. v.15, p. 186-190, 2010.
- BURTON, G.J.; JAUNIAUX E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. v.25, p. 287–299, 2011.
- CALDEIRA, R.M. Monitoração da adequação do plano alimentar e do estado nutricional em ovelhas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. v.100, p. 125-139, 2005.
- CALDEIRA, R.M.; BELO, A.T. et al. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rum. Res*. v.68, p.233–241, 2007a.
- CALDEIRA, R.M.; BELO, A.T. et al. The effect of long-term feed restriction and over-nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rum. Res*. v.68, p.242–255, 2007b.
- CAMPOS, A.G.; AFONSO, J.A.B. et al. Estudo clínico-laboratorial da toxemia da prenhez em ovelhas: análise retrospectiva. *Ci. Anim. Bras*. v. 11, n. 3, p. 623-628, 2010.

- CASTILLO C.; HERNANDEZ J. et al. Oxidative *status* during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet J.* v.169, p.286-292, 2005.
- DUEHLMEIER, R.; FLUEGGE, I. et al. Insulin Sensitivity during Late Gestation in Ewes Affected by Pregnancy Toxemia and in Ewes with High and Low Susceptibility to this Disorder. *J Vet Intern Med.* v.27, p. 359–366, 2013.
- FERREIRA A.L.A., MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil;* 43(1): 61-8, 1997.
- FIRAT, A.; ÖZPINAR, A. Metabolic Profile of Pre-Pregnancy, Pregnancy and Early Lactation in Multiple Lambing Sakız Ewes 1. Changes in Plasma Glucose, 3-Hydroxybutyrate and Cortisol Levels. *Ann Nutr Metab.* v. 46, p.57–61, 2002.
- FORD, E.J.; EVANS, J.; ROBINSON, I. Cortisol in pregnancy toxemia of sheep. *Brit. Vet. J.* v.146, n.6, p. 539-542, 1990.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; HERNÁNDEZ, F. et al. Acid-base and electrolyte status during early induced pregnancy toxemia in goats. *Vet. Journal.* v.193, p.598-599, 2012.
- HENZE, P.; BLICKHARDT, K. et al. Spontaneous pregnancy toxemia (ketosis) in sheep and the role of insulin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.45, p. 225-226, 1998.
- HERDT, T.H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* v.16, n.2, p.215-30, 2000.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Comunicação social. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013->

agencia-de-noticias/releases/9802-ppm-rebanho-bovino-alcanca-a-marca-recorde-de-215-2-milhoes-de-cabecas-mas-producao-de-leite-cai-0-4.html
Acesso em: 06/12/2017.

- JAIN, S.K.; McVIE, R.; BOCCHINI JR., J.A. Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiology*. v.13, p. 163-170, 2006.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6.ed. San Diego: Academic, 2008. 916p.
- KULCSÁR, M.; DANKÓ, G. et al. Endocrine characteristics of late pregnant hyperketonaemic ewes and their reproductive performance following the induction of ovarian cyclicity out of the breeding season *Acta Veterinaria Hungarica*. v. 54, n. 2, p. 235–249, 2006.
- LACETERA, N.; BERNABUCCI, U. et al. Effects of subclinical pregnancy toxemia on immune response in sheep. *Am J Vet Res*. v.62, p.1020–1024, 2001.
- LEAL, M.L.R.; SOARES, P.C. et al. Efeito da refrigeração sobre o exame hemogasométrico em sangue venoso de ovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. v.43(suplemento), p.80-85, 2006.
- LISBÔA, J.A.N.; BENESI, F.J. et al. Tempo de viabilidade de amostras de sangue venoso bovino destinadas ao exame hemogasométrico, quando mantidas em sob conservação em água gelada. *Ciência Rural*, v. 31, p.271-276, 2001.
- MAVROGIANNI, V.S.; BROZOS, C. Reflections on the causes and diagnosis of peri-parturient losses of ewes. *Small Rum. Res*. v. 76, p. 77-82, 2008.
- MUTINATI, M.; PICCINNO, M. et al. Oxidative Stress During Pregnancy in the Sheep. *Reprod Dom Anim*. v.48, p.353–357, 2013.

- OLIVEIRA, R.P.M.; MADURO, A.H.P. et al. Perfil metabólico de ovelhas Santa Inês em diferentes fases de gestação criadas em sistema semi-intensivo no estado do Amazonas. *Ciência Animal Brasileira*. v. 15, n. 1, p.81-86, 2014.
- ORTOLANI, E.L.; BENESI, F. J. Ocorrência de toxemia da prenhez em cabras (*Capra hircus*, L) e ovelhas (*Ovis Aries*, L) criadas no estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP*, São Paulo, v.26, n.2, p. 229-234, 1989.
- ORTOLANI, E.L. Diagnóstico e tratamento de alterações ácido-básicas em ruminantes. In: *Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária do Rio Grande do Sul*, p.15-29, 2003.
- ORTOLANI, E.L. *Intoxicações e doenças metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica, urolitíase e toxemia da prenhez*. In: SOBRINHO, A.G.; BATISTA, A.M.V. et al. *Nutrição de ovinos*. Jaboticabal: Funep, 1996. p. 241-58.
- PAYNE, J.M.; PAYNE, S. *The metabolic profile*. 1ed. Oxford: Oxford University Press. 1987. 179p.
- PEIRÓ, J.R.; MENDES, L.C.N. et al. Use of i-stat to determine blood gas, electrolytes, and hematocrit in whole-blood samples from cattle, horses and sheep. *Am.J. Vet. Res.*, v.71, p.515-521, 2010.
- RAOOFI, A.; JAFARIAN, M. et al. Fluctuations in energy-related metabolites during the peri-parturition period in Lori-Bakhtiari ewes. *Small Rum. Res.* v.109, p.64-68, 2013.
- ROOK, J.S. Pregnancy toxemia of ewes, does and beef cows. *Vet. Clin. North Am.. Food Anim. Pract.* v.16, n.2, p.293-317, 2000.
- RUSSEL, A.J.F. Body condition scoring of sheep. *In Practice*. v.6, n.3, p.91-93, 1984.

- SAHOO, S.S.; PARTA, R.C. et al. Oxidative stress indices in the erythrocytes from lactating cows after treatment for subclinical ketosis with antioxidant incorporated in the therapeutic regime. *Vet Res Commun.* v.33, p.281–290, 2009.
- SANTOS, F.C.O.; MENDONÇA, C.L. et al. Indicadores bioquímicos e hormonais de casos naturais de toxemia da prenhez em ovelhas. *Pesq. Vet. Bras.* v.31, n.11, p.974-980, 2011.
- SANTOS R.A., CAMPOS A.G.S.S., AFONSO J.A.B., SOARES P.C. & MENDONÇA C.L. 2012. Efeito da administração de propileno glicol e cobalto associado à vitamina B12 sobre o perfil metabólico e a atividade enzimática de ovelhas da raça Santa Inês no periparto. *Pesq. Vet. Bras.* 32(Supl.1):60-66.
- SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Hyperketonemia impairs glucose metabolism in pregnant and nonpregnant ewes. *J. Dairy Sci.* v. 87, p. 350–358, 2004.
- SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Twin-pregnancy increases susceptibility of ewes to hypoglycaemic stress and pregnancy toxemia. *Res.Vet. Sci.* v.84, p. 286-299, 2008.
- SCOTT, P.R.; SARGISSON, N.D. et al. Cerebrospinal fluid and plasma glucose concentrations of ovine pregnancy toxemia cases, inappetant ewes and normal ewes during late gestation. *Brit. Vet. J.* v.151, p.39-44, 1995.
- SILVA, A.A., GONÇALVES, R.C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural.* v.40, n.4, p.994-1002, 2010.

- SILVA, A.A.; FERREIRA, D.O.L.; SANTAROSA, B.P.; DIAS, A.; DAMASCENO, D.C.; GONCALVES, R.C. Effect of percutaneous transthoracic lung biopsy on oxidative metabolism in sheep. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 83, p. 1-5, 2012.
- SOARES F.A.P.; BORBA NETO A.V. et al. Metabolismo de indicadores preditivos da toxemia da prenhez em ovelhas Dorper no terço final da gestação, parto e pós-parto. *Ci. Anim. Bras. Goiânia – Suplemento 1, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria*. p. 197-203, 2009.
- SORDILLO, L.M.; AITKEN, S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.128, p.104–109, 2009.
- SOUTO R.J.C.; AFONSO, J.A.B.; et al. Achados bioquímicos, eletrolíticos e hormonais de cabras acometidas com toxemia da prenhez. *Pesq. Vet. Bras.* v.33, n.10, p.1174-1182, 2013.
- SOUZA B.C., SENA L.S., LOUREIRO D., RAYNAL J.T, SOUSA T.J., BASTOS B.L., MEYER R., PORTELA R.W. Determinação de valores de referência séricos para os eletrólitos magnésio, cloretos, cálcio e fósforo em ovinos das raças Dorper e Santa Inês. *Pesq. Vet. Bras.* 36(3):167-173, 2016.
- VAN SAUN, R.J. Pregnancy toxemia in a flock of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.217, p. 1536-1539, 2000.

ANEXOS

Anexo 1. Níveis de garantia da composição do sal mineral fornecido aos animais dos dois grupos (G1 e G2) durante o período experimental (Ovinofós com Monensina®, Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, Mairinque-SP, Brasil), segundo informações do fabricante.

Constituintes	Valores (ppm)
Cálcio	120.000
Fósforo	87.000
Enxofre	18.000
Ferro	1.800
Manganês	1.300
Cobre	590
Zinco	3.800
Sódio	147.000
Molibdênio	300
Flúor	870
Selênio	15
Cromo	20
Iodo	80
Cobalto	40
Monensina	1.300