

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRESSE OXIDATIVO E EXPRESSÃO DAS  
METALOPROTEINASES 2 E 9 E SEUS INIBIDORES EM OVINOS  
COM ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA**

**Amanda Festa Sabes**

Médica Veterinária

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRESSE OXIDATIVO E EXPRESSÃO DAS  
METALOPROTEINASES 2 E 9 E SEUS INIBIDORES EM OVINOS  
COM ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA**

**Amanda Festa Sabes**

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

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

**2019**

S115e Sabes, Amanda Festa  
Estresse oxidativo e expressão dos metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores em ovinos com acidose ruminal subaguda / Amanda Festa Sabes. -- Jaboticabal, 2019  
99 p.

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

Orientador: Luiz Carlos Marques

1. Ovinos. 2. Acidose. 3. Estresse oxidativo. 4. Metaloproteinases de matriz. 5. Termografia. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal




**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

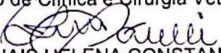
TÍTULO DA TESE: ESTRESSE OXIDATIVO E EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 E SEUS INIBIDORES EM OVINOS COM ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA

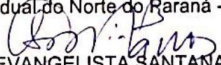
**AUTORA: AMANDA FESTA SABES**

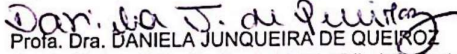
**ORIENTADOR: LUIZ CARLOS MARQUES**


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. LUIZ CARLOS MARQUES  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Profa. Dra. THAIS HELENA CONSTANTINO PATELLI  
Universidade Estadual do Norte do Paraná - Bandeirantes/PR

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

  
Profa. Dra. DANIELA JUNQUEIRA DE QUEIROZ  
Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP

  
Dra. DANIELA GOMES DA SILVA  
Médica Veterinária Autônoma / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 12 de agosto de 2019

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Amanda Festa Sabes** – nascida em Marília, São Paulo, em 15 de Agosto de 1989, filha de Adalberto Carlos Sabes e Silvana Festa. Realizou sua graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, concluindo-a em fevereiro de 2013. Fez duas Iniciações Científicas na área de Clínica e Cirurgia de Equinos, nos anos de 2010, 2011 e 2012 (Processo nº 2010/07824-0); sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Realizou parte de seu estágio curricular no Hospital Veterinário Central localizado em Portugal. No ano de 2013, foi Bolsista de Treinamento Técnico Nível III da FAPESP, durante 11 meses (Processo 2013/05015-6). Em março de 2014, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica Veterinária, sendo aprovada em primeiro lugar do processo seletivo e novamente bolsista FAPESP (2014/00417-1). Em Novembro de 2015 recebeu o título de Mestre em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica Veterinária, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Carlos Marques. Em março de 2016 iniciou o Doutorado pelo programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela mesma instituição de ensino, sendo bolsista da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Durante o período de fevereiro a agosto de 2018 realizou doutorado sanduíche na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Zagreb (Croácia) sob a supervisão do Prof. Dr. Peter David Eckersall.

*When I find myself in times of trouble  
Mother Mary comes to me  
Speaking words of wisdom  
Let it be*

*And in my hour of darkness  
She is standing right in front of me  
Speaking words of wisdom  
Let it be*

*Let it be, let it be  
Let it be, let it be  
Whisper words of wisdom  
Let it be*

*And when the broken hearted people  
Living in the world agree  
There will be an answer  
Let it be*

*For though they may be parted  
There is still a chance that they will see  
There will be an answer  
Let it be*

***Let It Be – The Beatles***

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Adalberto Carlos Sabes e Silvana Festa, minha tia Simone Festa e minha avó de coração Maria Antônia Lopes, por todos os ensinamentos, paciência e em especial à minha mãe por sempre me apoiar em todas as minhas escolhas e meus caminhos em todos esses anos;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Também agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio regular aprovado para a realização desse estudo (Processo nº 2016/16631-8);

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Marques, por todos os anos de orientação ao longo da pós graduação, todos os conselhos, apoio e pela confiança depositada;

À minha irmã científica mais velha Annita Morais Girardi, muito obrigada por todos os conselhos, puxões de orelha, incontáveis conversas, risadas intermináveis além de ser minha companheira de todas as horas;

Ao Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha pela autorização no uso das dependências e dos equipamentos do Laboratório de Biologia Molecular da UNIP (Universidade Paulista); além de ter me ensinado a técnica de zimografia. Também agradeço às novas amizades feitas na UNIP e em especial à Ronalda Araujo, Fabiana Toshie Kono, Anuska Alvares Saraiva, Juan Justino, Profa Dra Maria Anete Lallo e Profa Dra Elizabeth Cristina Pérez. Muito obrigada por toda a ajuda e amizade durante minhas análises na UNIP;

Ao Prof. Dr. Paulo César Ciarlini pela autorização no uso das dependências e nos equipamentos do seu Laboratório e em especial as pós graduandas Anelise Bosco e Ariana Ferreira pelo auxílio nas análises de estresse oxidativo.

A todos os membros do projeto VetMedZg e em especial aos professores Peter David Eckersall e Vladimir Mrljak pelo aceite na realização de meu estágio na Faculdade de Medicina Veterinária de Zagreb. Sem dúvidas foi uma experiência muito importante para meu crescimento pessoal e profissional;

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

A todas as amigas de Jaboticabal e em especial à Nara Saraiva Bernardi, Daniela Junqueira de Queiroz, Gabriela Noronha de Toledo, Mayara Fonseca, Mariana Cipro, Carolina Martins, Jéssica Lage, Ana Paula Judice Maria e Kamila Gravena por todos os momentos compartilhados, risadas e histórias sem fim! Adoro todas vocês!!!

A todos os amigos que a pós-graduação pode me proporcionar e em especial aos amigos da graduação que perto (ou mesmo longe) me apoiaram durante todos esses anos em especial ao Bruno Christian Rodrigues, Pâmela Bongiovanni Catandi, Ricardo Della Matta Júnior e Bruna Maria Arssuffi;

Aos meus queridos amigos de Jaboticabal Maisa Casteleti Beraldo Vizentim e Leandro Vizentim por todos os anos de amizade e todo o carinho;

A todos que realizaram e auxiliaram nos procedimentos cirúrgicos dos animais em especial ao Darcio Zangirolami Filho, Yuri Bonacin, Monica Midon, Lucas Mendonça, Tiago Caparica Módulo e a Gabriela Marchiori Bueno pela participação nesse projeto;

À Dra. Daniela Gomes da Silva pelo auxílio na realização dos testes de ELISA e também nas análises estatísticas desse estudo;

Aos membros das Comissões Examinadoras Profa. Dra. Annelise Carla Camplesi dos Santos, Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, Profa. Dra.

Daniela Junqueira de Queiroz, Profa. Dra. Daniela Gomes da Silva, Profa. Dra. Thais Helena Constantino Patelli e Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana pelas correções e sugestões pertinentes que melhoraram muito a qualidade deste trabalho;

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

À minha grande amiga e também funcionária da Seção Técnica de Pós Graduação Branca Rochidali, por todas as conversas, conselhos e ajuda durante os anos;

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

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

A todos, muito obrigada!!

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
1.0 Introdução .....	1
2.0 Revisão de literatura .....	2
2.1 Ovinocultura no Brasil .....	2
2.2 Aspectos gerais sobre fisiologia e acidose ruminal .....	2
2.3 Fisiopatogenia da acidose ruminal subaguda .....	4
2.4 Sinais clínicos .....	6
2.5 Laminite .....	7
2.6 Termografia podal infravermelha .....	8
2.7 Estresse oxidativo .....	10
2.8 Metaloproteinases e seus inibidores teciduais .....	12
3.0 Referências .....	15
CAPÍTULO 2 – TERMOGRAFIA INFRAVERMELHA PODAL NO DIAGNÓSTICO DE LAMINITE EM OVINOS COM ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA	
Resumo.....	25
1. Introdução .....	26
2. Material e Métodos .....	28
2.1 Animais .....	28
2.2 Avaliação clínica e termográfica .....	29
2.3 Análise estatística .....	31
3. Resultados .....	31
3.1 Avaliação clínica de laminite .....	31
3.2 Avaliação termográfica podal .....	32
4. Discussão .....	36
5. Conclusões .....	41

6. Referências .....	42
----------------------	----

### CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM OVINOS COM ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA E LAMINITE

Resumo .....	52
1. Introdução .....	53
2. Material e Métodos .....	55
2.1 Animais .....	55
2.2 Estresse oxidativo .....	56
2.3 Análise estatística .....	57
3. Resultados .....	58
4. Discussão .....	59
5. Conclusões .....	66
6. Referências .....	66

### CAPÍTULO 4 – METALOPROTEINASES 2 E 9 E SEUS INIBIDORES TECIDUAIS EM OVINOS SUBMETIDOS À ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA

Resumo .....	78
1. Introdução .....	79
2. Material e Métodos .....	81
2.1 Animais .....	81
2.2 Análise zimográfica .....	83
2.3 Inibidores teciduais das MMPs .....	84
2.4 Análise estatística .....	85
3. Resultados .....	85
4. Discussão .....	87
5. Conclusões .....	91
6. Referências .....	92


## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Resposta inflamatória sistêmica, estresse oxidativo e avaliação do fluxo sanguíneo digital em ovinos com acidose ruminal subaguda**", protocolo nº 5758/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Carlos Marques, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de novembro de 2016.

Vigência do Projeto	01/02/2017 a 01/12/2018
Espécie / Linhagem	Ovina
Nº de animais	08
Peso / Idade	45 kg / 2 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda com criação de ovinos Santa Inês.

Jaboticabal, 04 de novembro de 2016.

  
**Profª Drª Lizandra Amoroso**  
Coordenadora – CEUA

## **ESTRESSE OXIDATIVO E EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 E SEUS INIBIDORES EM OVINOS COM ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA**

**RESUMO** - A produção de ovinos no Brasil está em constante ascensão e tal fato leva ao aumento do número de animais confinados, visando maior ganho de peso em curto período de tempo. Essa situação predispõe os animais a desordens como acidose ruminal subaguda (ARS) e, conseqüentemente, laminite, gerando perdas econômicas pela diminuição da produtividade do rebanho e, em casos graves, descarte de animais. Com o objetivo de avaliar a ocorrência de estresse oxidativo, a expressão das metaloproteinases (MMPs) 2 e 9 e seus inibidores (TIMPs) 1 e 2 e também a termografia infravermelha podal (TIV) oito ovelhas adultas foram utilizadas, sendo as mesmas divididas entre os grupos controle (GC) contendo três animais e o grupo indução (GI) contendo cinco animais. Para indução da ARS os animais do GI receberam dieta com alto teor de alimento concentrado durante 30 dias. Todos os animais do GI apresentaram diminuição do pH ruminal, indicando a ocorrência de ARS, e também sinais clínicos de laminite em diversos momentos ao longo do período. Somente foi expressa a forma pró ativa da MMP 2, com valores aumentados nos dias 6 e 11, além da detecção dos TIMPs 1 e 2 ao longo de todo o período. Com relação ao estresse oxidativo, as variáveis relacionadas com a liberação de fatores oxidantes como a capacidade oxidante total (TOC), a peroxidação lipídica (LPO) e o índice de estresse oxidativo (IEO) encontram-se elevadas nos animais do GI, notadamente a partir do dia 20. A região da banda coronária e pele adjacente foram avaliadas através da TIV. Todos os animais do GI apresentaram alterações nos termogramas ao longo do período, e a laminite foi diagnosticada clinicamente entre os dias 11 e 17, sendo os membros torácicos mais acometidos. Em 11 momentos distintos, os dois dígitos dos quatros membros de todos os animais do GI apresentaram alterações, com temperaturas superiores à 27°C. Através do uso da TIV foi possível detectar aumentos na temperatura do casco antes da ocorrência de sinais clínicos de laminite. O estresse oxidativo foi detectado nos animais com ARS e laminite. Os elevados teores dos TIMPs 1 e 2 possivelmente bloquearam a ativação das MMPs 2 e 9, a despeito da ocorrência de laminite clínica, sugerindo a avaliação de outras proteases relacionadas à danos laminares.

**Palavras chave:** acidemia, inflamação, laminite, ovelhas, temperatura

## **OXIDATIVE STRESS AND EXPRESSION OF METALLOPROTEINASES 2 AND 9 AND THEIR INHIBITORS IN SHEEP WITH SUBACUTE RUMINAL ACIDOSIS**

**ABSTRACT** - The production of sheep in Brazil is constantly rising and this fact leads to an increase in the number of confined animals, aiming to have a greater weight gain in a short period of time. This situation predisposes the animals to disorders such as subacute ruminal acidosis (SARA) and, consequently, laminitis, generating economic losses by decreasing the productivity of the herd and, in severe cases, disposal of animals. With the objective of evaluating the occurrence of oxidative stress, the expression of metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 and their inhibitors (TIMPs) 1 and 2 and also the infrared thermography (IT) eight adult ewes were used, divided among control group (CG) containing three animals and the induction group (IG) with five animals. For the induction of SARA, IG animals received a diet with high content of concentrated food during 30 days. All animals from IG group showed a decrease in ruminal pH, indicating the occurrence of SARA, as well as clinical signs of laminitis at various times during the period. Only the pro-active form of MMP 2 was expressed, with values increased on days 6 and 11, besides the detection of TIMPs 1 and 2 all long the period. Regarding oxidative stress, the variables related to the release of oxidant factors such as total oxidant capacity (TOC), lipid peroxidation (LPO) and oxidative stress index (OSI) are high in IG animals, mainly from day 20. The region of the coronary band and adjacent skin was evaluated through the IT. All IG animals presented alterations on the thermograms over the period, and the laminitis was clinically diagnosed between days 11 and 17, and the thoracic limbs were more affected. In 11 distinct moments, the two digits of the four members of all IG animals presented alterations, with temperatures higher than 27 °C. With the use of the IT was possible to detect increases on the hoof temperature before the occurrence of clinical signs of laminitis. Oxidative stress indicated this presence in animals with SARA and laminitis. The high levels of TIMPs 1 and 2 may have blocked the activation of MMPs 2 and 9, despite the occurrence of clinical laminitis, suggesting the presence of other proteases related to laminar damage.

**Keywords:** acidemia, inflammation, laminitis, sheep, temperature

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AGCC – ácidos graxos de cadeia curta  
ALRA – acidose láctica ruminal aguda  
ARS – acidose ruminal subaguda  
CAT – catalase  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
ELISA – Enzyme Linked Immunonorbent Assay  
EROs – espécies reativas de oxigênio  
FGF – fator de crescimento derivado de fibroblastos  
GC – grupo controle  
GI – grupo indução  
GPx – glutathiona peroxidase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
IEO – índice de estresse oxidativo  
IL 1, 4, 6 – interleucinas 1, 4, 6  
IV – infravermelho  
LPO – peroxidação lipídica  
MDA – malondialdeído  
MEC – matriz extracelular  
MMP 2 – metaloproteinase 2  
MMP 9 – metaloproteinase 9  
MMPs – metaloproteinases  
MPD – membro pélvico direito  
MPE – membro pélvico esquerdo  
MS – matéria seca  
MTD – membro torácico direito  
MTE – membro torácico esquerdo  
NADPH oxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - ânion superóxido  
OH<sup>·</sup> - radical hidroxila  
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

pró MMP – pró metaloproteinase

SDS – dodecil sulfato de sódio

SOD – superóxido dismutase

TAC – capacidade antioxidante total

TBARS - tiobarbitúrico

TEMED - N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina

TIMP 1 – inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 1

TIMP 2 – inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 2

TIMPs – inibidores teciduais de metaloproteinases

TIV – termografia infravermelha

TNF  $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

TOC – capacidade oxidante total

**LISTA DE TABELAS****Capítulo 2 – Termografia infravermelha podal no diagnóstico de laminite em ovinos com acidose ruminal subaguda**

<b>Tabela 1.</b> Médias gerais obtidas das três temperaturas avaliadas (máxima, mínima e média) dos animais pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI) ao longo do período experimental .....	33
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2 – Termografia infravermelha podal no diagnóstico de laminite em ovinos com acidose ruminal subaguda

**Fig. 1.** Gráficos resultantes das médias das temperaturas máximas obtidas após realização da análise de termografia infravermelha (TIV) do membro torácico esquerdo (MTE) dos ovinos pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI) após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS). Jaboticabal, 2019.....34

**Fig. 2.** Gráficos resultantes das médias das temperaturas máximas obtidas após realização da análise de termografia infravermelha (TIV) do membro torácico direito (MTD) dos animais pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI) após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS). Jaboticabal, 2019.....34

**Fig. 3.** Gráficos resultantes das médias das temperaturas máximas obtidas após realização da análise de termografia infravermelha (TIV) do membro pélvico esquerdo (MPE) dos animais pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI) após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS). Jaboticabal, 2019 .....35

**Fig. 4.** Gráficos resultantes das médias das temperaturas máximas obtidas após realização da análise de termografia infravermelha (TIV) do membro pélvico direito (MPD) dos animais pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI) após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS). Jaboticabal, 2019 .....35

**Fig. 5.** Imagens termográficas podais realizadas durante o período experimental. Imagem A: animal do grupo controle (GC); Imagem B: animal do grupo indução (GI) após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS): momento número 15; Imagem C: animal GI, momento número 33; Imagem D: animal GI: momento número 51. – Jaboticabal, 2019 .....36

### **Capítulo 3 – Avaliação do estresse oxidativo em ovinos com acidose ruminal subaguda e laminite**

**Fig. 1.** Gráficos resultantes das médias obtidas das variáveis oxidativas e antioxidativas de ovinos pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI), submetidos à indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS) Capacidade antioxidante total (TAC - mmol/L); Concentração de oxidantes total (TOC -  $\mu\text{mol/L}$ ); Malondialdeído (MDA -  $\mu\text{mol/L}$ ) e Índice de estresse oxidativo (IEO - %) O \* presente no eixo x de cada gráfico indica os momentos em que ocorreu diferença significativa entre o GC e GI pelo Teste F. Jaboticabal, 2019.....59

### **Capítulo 4 – Metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores teciduais em ovinos submetidos à acidose ruminal subaguda**

**Fig. 1.** Gráficos resultantes das médias obtidas dos grupos controle (GC) e indução (GI) em relação aos dias experimentais em unidades arbitrárias (UA) da pró-metaloproteinase 2 (pró - MMP2), inibidores teciduais das metaloproteinases 1 e 2 (TIMPs 1 e 2 - ng/mL) em ovinos submetidos à indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS). O \*presente no eixo x indica a ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos. Jaboticabal, 2019 .....86

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais**

### **1.0 Introdução**

O Brasil vem se destacando nos últimos anos no mercado mundial pecuário, tanto na produção de proteína animal como também na produção leiteira. A criação de ovinos no país vem aumentando nos últimos anos, com maior representatividade nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Bahia, Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí, sendo a criação voltada principalmente à produção de carne, com importância do uso da raça Santa Inês no país. Os animais são conhecidos por apresentarem rusticidade, alto valor adaptativo e reprodutivo, carne com baixo teor de gordura, boa resistência à parasitas gastrointestinais além de boa habilidade materna.

Na busca de maior produtividade, os sistemas de produção animal têm empregado altas quantidades de concentrados na dieta a fim de obter melhor desempenho dos animais. Entretanto, tais alterações na dieta podem modificar o ambiente ruminal a partir do aumento da disponibilidade de glicose, estímulo no crescimento de bactérias, aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta e ácido láctico, ou até acarretar distúrbios metabólicos, como acidose ruminal subaguda ou aguda, além de outros problemas digestivos e alterações locomotoras, com importância para a laminite tanto aguda quanto crônica.

A ocorrência de laminite após quadro de acidose ruminal subaguda apresenta importante efeito sob a produção animal, além de influenciar no bem-estar dos mesmos. Os exatos mecanismos de seu desenvolvimento não foram completamente evidenciados, existindo teorias acerca dos fatores de risco, mediadores químicos e/ou inflamatórios, além do uso de tecnologias no diagnóstico precoce com fins de tratamento rápido e eficaz para os animais acometidos. No presente trabalho objetivou-se estudar e avaliar as alterações da termografia podal infravermelha, os teores séricos das metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores, além da ocorrência ou não de estresse oxidativo em ovinos submetidos à indução experimental de acidose ruminal subaguda após sobrecarga de carboidratos dietéticos.

## **2.0 Revisão de literatura**

### **2.1 Ovinocultura no Brasil**

O Brasil é considerado um dos principais países responsáveis pela produção e comércio de proteína animal no mundo, graças ao desenvolvimento da pecuária nacional, o que levou ao aumento da produção e qualidade do produto, melhorando a competição e distribuição no mercado internacional (Embrapa, 2017). A produção de ovinos no país tem se destacado ao longo dos anos, registrando no ano de 2018 17,9 milhões de cabeças, das quais 11,5 milhões encontram-se na região Nordeste e 4,3 milhões na região Sul (Ibge 2018). O rebanho mundial de ovinos era da ordem de 1,2 bilhão de cabeças ano de 2014, distribuído em todos os continentes, sendo os dez maiores rebanhos presentes em países considerados desenvolvidos e em desenvolvimento. O Brasil possui o 18º maior rebanho do mundo, e a ovinocultura mundial apresentou taxa de crescimento de 1,5% nos últimos cinco anos (Fao, 2016). Os preços pagos ao produtor elevaram-se, tornando a atividade atraente e rentável, principalmente a produção de proteína animal, com estímulos para a produção de cordeiros, resultando no aumento do número de animais abatidos no país (Viana, 2008).

Em qualquer sistema de criação animal, a alimentação exerce influência direta sob a produção, além de influenciar fatores como sanidade e capacidade reprodutiva dos mesmos. Os custos alimentares podem chegar a 80% do custo total da produção, sendo a média brasileira entre 50 e 60% (Ribeiro, 2008). Os sistemas intensivos de produção tem como principal objetivo aumentar a qualidade de seu produto final, desenvolvendo programas de incremento à produção como melhoramento genético, manejo dietético além de técnicas reprodutivas que asseguram melhor desempenho (Caldeira, 2005).

### **2.2 Aspectos gerais sobre fisiologia e acidose ruminal**

O rúmen é considerado um ecossistema único e diverso, povoado por microrganismos. Dentre os microrganismos presentes, as bactérias representam 60 a

90% da biomassa, com cerca de 200 espécies conhecidas (Kozloski, 2002). Os microrganismos ruminais fermentam os componentes alimentares, transformando-os em subprodutos como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), proteína microbiana além de vitaminas do complexo B e K. A proporção e quantidade dos subprodutos produzidos dependem do tipo e da forma como o alimento é fornecido, além de fatores relacionados ao ambiente ruminal como temperatura, anaerobiose e pH (Kozloski, 2002).

A dieta fornecida influencia diretamente os parâmetros ruminais, podendo levar a modificações na atividade metabólica dos microrganismos, alterando os produtos oriundos da fermentação (Costa et al., 2008). De acordo com Manella et al. (2003), o tipo de alimento consumido é capaz de modificar os produtos da fermentação pela especificidade dos microrganismos em digerir determinados nutrientes. Dietas ricas em forragens levam à maior atividade de bactérias celulolíticas e sacarolíticas, produzindo mais ácido acético. Já dietas ricas em amido e/ou proteína, aumentam a ação das bactérias amilolíticas e/ou proteolíticas, aumentando a produção de ácido propiônico (Church, 1993).

Os AGCC são os principais subprodutos da fermentação dos carboidratos, sendo utilizados como fonte de energia para o metabolismo dos ruminantes (Olsson et al., 1998; Berchielli et al., 2006). Van Soest (1994) relatou que os AGCC produzidos suprem cerca de 85% da exigência energética dos ruminantes. Predominam no fluido ruminal os ácidos acético, propiônico e butírico, além da presença em menores quantidades do isobutírico, valérico, isovalérico e 2-metilbutírico (Dijkstra et al., 1993). A concentração e as proporções relativas dos AGCC estão relacionadas à natureza do alimento consumido (Bergman, 1990).

Os valores de pH ruminal necessitam encontrar-se em uma faixa de valor ideal para que ocorra o desenvolvimento adequado dos microrganismos, sendo que a variação do pH ocorre em função da dieta e do tempo após a alimentação (Silveira et al., 2009). Bactérias fibrolíticas e protozoários necessitam de pH variando entre 6,2 e 6,8. Segundo Van Soest (1994), valores de pH abaixo de 6,2 aumentam o tempo de colonização da fibra, inibindo sua degradação. No entanto, as bactérias amilolíticas atuam adequadamente em pH mais ácido (5,8), demonstrando que o pH ruminal afeta

a degradação dos alimentos de maneira diferenciada, apresentando o intervalo entre 5,5 e 7,0 como faixa ideal (Furlan et al., 2006).

A capacidade de agentes tamponantes, como sais a base de carbonatos, além da remoção dos AGCC são também responsáveis pela manutenção do pH na faixa de normalidade (Van Soest et al., 1992). A manutenção de níveis adequados de pH nos ruminantes ocorre pela produção salivar, rica em bicarbonato de sódio e com valor de pH em torno de 8,1. A secreção salivar depende do tipo de dieta empregada, pois dietas com alto teor de umidade diminuem a produção salivar, no entanto alimentos ricos em fibra induzem sua maior secreção (Berchielli et al., 2006). Segundo Valadares Filho e Pina (2006), dietas com menos de 40% de forragem, reduzem a produção salivar, alterando a população microbiana. A fermentação de amido e açúcares altera a produção de AGCC, aumentando os teores de propionato, diminuindo o pH, e por consequência a digestão de fibra (Van Soest, 1994). Valores de pH abaixo de 6,0 resultam em perda de atividade fibrolítica, com completa cessação da digestão da fibra em pH entre 4,5 e 5,0 (Hoover, 1986). Orskov (1988) afirmou que o valor de 6,2 constitui o limite mínimo para adequada fermentação da fibra.

A acidose ruminal pode ser definida como um distúrbio fermentativo do rúmen associado à ingestão de carboidratos não estruturados rapidamente fermentáveis e em grande quantidade. As principais formas clínicas são a acidose láctica ruminal aguda (ALRA), com valores de pH abaixo de 5,0; e a acidose ruminal subaguda (ARS) caracterizada por episódios transitórios de redução do pH, com valores permanecendo entre 5,0 e 5,5 (Nagaraja e Titgemeyer, 2007).

### **2.3 Fisiopatogenia da acidose ruminal subaguda**

A ALRA apresenta alguns fatores desencadeantes, entre os quais o fornecimento de alimento concentrado a animais não adaptados a dieta, ingestão de grandes quantidades de alimentos ricos em carboidratos e reintrodução de concentrado após período de jejum. Mudanças bruscas na dieta e a alimentação conjunta de animais de diferentes faixas etárias também são fatores importantes no desencadeamento da enfermidade (Afonso e Mendonça, 2007; Radostits et al., 2007). Os carboidratos ingeridos são rapidamente fermentados no rúmen, levando à

produção de grandes quantidades de ácido láctico e AGCC, principalmente o propionato. Esta condição favorece a multiplicação de *Streptococcus bovis*, aumentando a produção de ácido láctico e, por consequente a diminuição do pH a valores abaixo de 5,5; levando à morte das bactérias Gram (-) e protozoários. Quando o valor de pH é inferior a 5,0; o *S. bovis* é inibido, ocorrendo multiplicação de *Lactobacillus sp* e aumento da concentração de ácido láctico no interior do órgão, aumentando a pressão osmótica com consequente sequestro de líquido para a luz do órgão (Dunlop, 1972; Radostits et al., 2007; Garay e García, 2009).

Embora a definição de ARS seja baseada no conceito de que a redução do pH ruminal seja cause esse transtorno, sob o ponto de vista da maioria dos autores que discorrem sobre o tema, Calsamiglia et al. (2012) apresentaram um conceito diferente e sugeriram rebatizar este transtorno como “Síndrome do alto concentrado”. Estes autores argumentam que o consumo de grande quantidade de carboidratos altamente fermentáveis e a redução do pH ruminal são eventos simultâneos, levando à confusão entre eles. Questiona-se se os efeitos reportados são devidos à redução do pH ou ao tipo de dieta empregada. Oetzel et al. (2017) consideram que o baixo pH ruminal é de fato o que define a ARS, sendo que a queda do pH ruminal pode ocorrer devido a um destes três fatores:

- aumento da produção de AGCC no rúmen pelo aumento do consumo de carboidratos fermentáveis no rúmen,
- tamponamento insuficiente dos ácidos orgânicos, o que está relacionado à ingestão de fibra efetiva,
- menor absorção de ácidos orgânicos pela parede ruminal, assim como a passagem destes pelo rúmen, que são prejudicadas pela ruminite (Oetzel et al., (2017).

Pesquisas tem demonstrado que a concentração total dos AGCC é mais significativa na acidose subaguda e do lactato na acidose aguda (Krause e Oetzel, 2006; Meyer e Bryant, 2017). Felizmente, os AGCC possuem uma constante de dissociação ao redor de 4,9 e rapidamente retornam a sua forma não dissociada quando o pH ruminal cai para valores menores do que 5,6; facilitando sua absorção pelo epitélio ruminal (Krause e Oetzel, 2006; Oetzel, 2017). Entretanto, o aumento da concentração de carboidratos fermentáveis no rúmen é seguido de marcada mudança

na população microbiana, processo que ocorre de 2 a 6 horas após a ingestão dos carboidratos. Dietas com pouca fibra ou com partículas pequenas aumentam a produção de AGCC, levando à diminuição do pH ruminal, desfavorecendo o desenvolvimento de algumas espécies de microrganismos celulolíticos e metanogênicos, que não toleram essas condições (Slyter, 1976).

A partir do momento em que o pH cai para 5,5 há a proliferação de *Streptococcus bovis* que utilizam os carboidratos para produção de ácido láctico. Como resultado da alta concentração de ácidos, a osmolaridade do rúmen excede a do sangue resultando no influxo de água para dentro do órgão, podendo causar diarreia e, nos casos mais graves desidratação, assim como a ruminite em decorrência dos danos ao epitélio (Constable et al., 2017). Durante o processo inflamatório, a parede ruminal pode se tornar espessa, resultando em paraqueratose das papilas. Este processo inflamatório e a injúria dele resultante podem aumentar a permeabilidade da parede ruminal tanto à absorção de nutrientes quanto de toxinas (Meyer e Bryant, 2017).

Em pesquisas realizadas com bovinos leiteiros observou-se que a morbidade da ARS é muito variável no rebanho, sendo mais frequente entre o 80º e o 140ª dia de lactação, momento em que a ingestão de matéria seca é máxima. Porém, em vacas primíparas, a morbidade é maior no terço médio da lactação. Essa situação provavelmente ocorre pelo fato de as novilhas terem menor controle na ingestão de alimentos concentrados e, quando mantidas em conjunto com as múltíparas, as primeiras reduzem o número de visitas ao cocho, o que as faz comer em maior quantidade em cada visita (Ortolani, 2018). Os animais resistentes controlam mais a ingestão de concentrados após um quadro prévio de ARS. As susceptíveis desenvolvem com maior frequência o quadro de ruminite, levando à menor absorção de AGCC, tornando as recorrências frequentes, com maior intensidade e recuperação mais lenta (Krauze e Oetzel, 2006).

## **2.4 Sinais clínicos**

Os animais acometidos pela ARS apresentam sinais inespecíficos, como episódios de inapetência e diarreia, sem evidente causa, além de perda de peso e

menor desempenho zootécnico, esse último notado a longo prazo. Ocorre diminuição dos movimentos ruminais, porém não se encontram inteiramente ausentes (González e Silva, 2006). Em rebanhos leiteiros observa-se diminuição na produção de leite e piora na condição corporal (Krauze e Oetzel, 2006). As lesões da parede ruminal, com conseqüente rumenite e posterior paraqueratose também são observadas, além de abscessos hepáticos (Penner et al., 2010; Bicalho e Oikonomou, 2013; Lean et al., 2013). De acordo com Krauze e Oetzel (2006), a rumenite é considerada a lesão fundamental nos quadros de ARS.

Devido às dificuldades de evidenciação de sinais clínicos na ARS, as alterações comportamentais dos animais têm sido estudadas. Ortolani (2018) verificou a diminuição em 63% na ingestão de matéria seca no primeiro dia da enfermidade, sendo o consumo de alimento restabelecido apenas no terceiro dia. Além de alterações na ingestão, o tempo destinado às atividades básicas também se altera com diminuição de cerca 50% na ruminação e aumento de 35% no tempo de ócio e de permanência em decúbito esternal.

## **2.5 Laminite**

A laminite é uma condição amplamente estudada na Medicina Veterinária, principalmente na espécie equina. Em ruminantes trata-se de uma importante enfermidade, responsável por perdas na produção principalmente relacionadas ao descarte de animais (Sagliyan e Unsaldi, 2002; Albuquerque et al., 2009; Silva et al., 2009). Considera-se a laminite um processo sistêmico, com alterações vasculares no tecido laminar dos dígitos, podendo alterar a mobilidade da falange distal (Greenough, 2007).

Animais que receberam dietas ricas em concentrado e que apresentaram quadro de ARS podem desenvolver laminite subsequente. Alterações podais, como crescimento excessivo dos cascos e alterações na sola, podem ocorrer semanas ou meses após a ocorrência da ARS (Greenough et al., 1990). A exata fisiopatogenia desse processo não está completamente elucidada, tanto para os casos de laminite após ALRA quanto nos casos de ARS. Acredita-se que alterações na osmolaridade

do trato gastrointestinal, liberação de fatores inflamatórios e alterações vasculares podais levam à ocorrência da laminite (Nocek, 1997).

Em estudos anteriores realizados em animais com ALRA, a laminite está relacionada à endotoxemia presente, além da liberação de outros fatores como histamina, toxinas termolábeis e adesinas fimbriais, que participam de processos inflamatórios (Andersen, 2003). As endotoxinas são raramente detectadas em animais com quadro de ARS, portando, a atribuição da ocorrência de laminite como consequência da liberação de endotoxinas na corrente sanguínea é pouco aceita e, quando essa ocorre, as endotoxinas são captadas pelas células de Kupffer no fígado (Constable et al., 2017).

O manejo nutricional é identificado como componente chave para o desenvolvimento da laminite, além da associação de outros fatores como: mudanças hormonais; doenças infecciosas como metrite, mastite e podridão dos cascos (foot rot); danos mecânicos ocasionados por piso excessivamente duro e outras condições inadequadas; além de outros fatores como condição e peso corporal além da estrutura dos membros (Nocek, 1997).

## **2.6 Termografia podal infravermelha**

No ano de 1934, Hardy demonstrou que a pele tem a capacidade de emitir radiação infravermelha (IV). Essa radiação é emitida e refletida por todos os corpos, transportando energia sob a forma de calor (Speakman e Ward, 1998). A termografia por radiação infravermelha (TIV) é a representação pictórica da temperatura à superfície de um corpo. É um dos métodos mais modernos de diagnóstico por imagem digital, sendo capaz de detectar inúmeras alterações, em sua grande maioria não perceptíveis por outros métodos e de maneira precoce (Roberto e Souza, 2014). O termógrafo é o único instrumento conhecido capaz de captar a radiação IV, realizando sua leitura e convertendo a radiação em imagem térmica (Eddy et al., 2001), permitindo a avaliação quantitativa e qualitativa de mudanças de temperatura à superfície.

Nos animais, a temperatura da superfície corpórea é regulada pelo fluxo sanguíneo e taxa metabólica dos tecidos subjacentes. Dessa maneira, o estado

fisiológico desses pode ser avaliado aferindo-se a temperatura da pele pela TIV (Nikkhah et al., 2005). Em processos inflamatórios ou infecciosos locais, ocorre ativação de mecanismos de defesa marcada por intensa atividade tecidual, consumo de energia e aumento do fluxo sanguíneo, ocasionando aumento de temperatura da pele e tecidos adjacentes (Alves et al., 2007). Com o uso da técnica de TIV, áreas quentes e frias são consideradas como padrões sugestivos de lesões. Processos inflamatórios levam ao aumento da temperatura local e, em algumas lesões dolorosas, ocorre estimulação simpática, com consequente vasoconstrição reflexa e isquemia (Turner, 2001; Alves et al., 2007).

Na medicina veterinária o uso da TIV é amplo, sendo aplicada como auxiliar no diagnóstico, prognóstico, prevenção (Roberto e Souza, 2014), reabilitação (Simon et al., 2006), avaliações de bem-estar térmico em recintos de zoológicos e instalações de animais de produção (Roberto e Souza, 2014). Como ferramenta auxiliar no diagnóstico de condições inflamatórias, a TIV já foi empregada em diversas situações como nas claudicações em equinos (Çetinkaya e Demirutku, 2012), mastite subclínica em bovinos (Digiovani et al., 2016) e clínica em ovinos (Nogueira et al., 2013), diarreia viral bovina em bezerras (Nikkhah et al., 2005; Hovinen et al., 2008), febre aftosa (Dunbar et al., 2009; Rainwater-lovett et al., 2009), laminite em vacas leiteiras (Alsaad e Buscher, 2012), avaliação do plexo pampiniforme e escroto de touros (Portugal, 2014) e laminite aguda em bovinos (Souza, 2017). Por meio da TIV, um processo inflamatório pode ser detectado de uma a duas semanas antes da sua detecção clínica, favorecendo o diagnóstico precoce de lesões (Purohit e McGoy, 1980; Mogg e Pollitt, 1992; Soroko et al., 2013), permitindo intervenções terapêuticas prévias, melhorando o bem-estar aos animais e minimizando perdas econômicas decorrentes das afecções (Wood et al., 2015).

Está bem estabelecido que as regiões mais quentes do membro distal de um animal sadio estão adjacentes ao plexo arteriovenoso coronário e ao cório lamelar. A temperatura da região da banda coronária geralmente é 1°C ou 2°C mais elevada em comparação ao casco em si. A laminite é detectada pelo aumento da diferença de temperatura entre a banda coronária e a parede do casco (Turner, 2001; Çetinkaya e Demirutku, 2011).

Diferenças de temperatura acima de  $1,25^{\circ}\text{C}$  é indicativo de processo inflamatório subclínico, quando ocorre comparação da mesma área em membros diferentes. Nos casos em que ambas as superfícies se encontram inflamadas, é necessária a comparação da região afetada com a região sadia do mesmo membro (Soroko et al., 2013). A detecção precoce da laminite é essencial para a melhoria do bem estar dos animais, dos rendimentos da criação e das taxas de recuperação (Zecconi et al., 2011) e a TIV, combinada ao exame clínico é uma excelente ferramenta para a investigação precoce desta afecção (Turner, 1998), pois detecta o calor antes que seja perceptível no exame físico de rotina (Turner, 2001), além de permitir o monitoramento de pacientes com alto risco de se tornarem laminíticos (Turner, 1991).

## **2.7 Estresse oxidativo**

O termo radical livre é definido como uma espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados, conferindo instabilidade e reatividade bioquímica (Thomas, 2000). São produzidos em processos fisiológicos durante a redução oxidativa, metabolismo celular e em diversas condições patológicas (Hatheril et al., 1991). Em pequena quantidade são benéficos, como em situações em que há a necessidade de ativação do sistema imune, como nos casos em que os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruição de bactérias e outros patógenos (Schneider e Oliveira, 2004), na desintoxicação de drogas e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, além do óxido nítrico, importante em processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (Moncada, 2001). Em altas concentrações podem ser tóxicos, principalmente ao oxidarem moléculas biológicas alterando suas características e provocando transtornos no metabolismo celular (Chihuailaf et al., 2002). Todos os metabólitos reativos derivados do oxigênio ( $\text{O}_2$ ) sejam radicais livres ou não, são coletivamente designados como espécies reativas de oxigênio (EROs) (Chihuailaf et al., 2002).

A geração de EROs é resultante do metabolismo de  $\text{O}_2$ , sendo a mitocôndria a principal fonte geradora (Barbosa et al., 2010). As mais importantes EROs incluem: o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^-$ )

(Barbosa et al., 2010). O  $O_2^-$  é produzido por diversos processos celulares, como na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, por enzimas como a xantina oxidase e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), ou pela redução monoelétrica de  $O_2$ . O  $H_2O_2$  é formado pela reação da dismutação de  $O_2^-$  catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O  $OH^-$  é o radical mais lesivo conhecido e, uma vez formado, leva a modificações no DNA, danos proteicos e inativação enzimática com consequente peroxidação lipídica (Vasconcelos et al., 2007).

Frente a ação lesiva das EROs, o organismo lança mão do sistema antioxidante, sendo mesmo dividido em enzimático e não enzimático. No primeiro, estão inclusas as enzimas SOD, catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação das EROs, envolvidos com a iniciação das reações que culminam com a propagação e amplificação do processo, e com a ocorrência de danos oxidativos (Vasconcelos et al., 2007). Alguns compostos de origem dietética são classificados como antioxidantes não enzimáticos, entre eles: vitaminas (ácido ascórbico - vitamina C,  $\alpha$ -tocoferol - precursor da vitamina E,  $\beta$ -caroteno - precursor da vitamina A), minerais (zinco, cobre, selênio, magnésio), além de compostos fenólicos (Barbosa et al., 2010). Diferentes mecanismos de ação antioxidativa podem ser utilizados como: inibição da formação das EROs, impedimento de sua ação, favorecimento do reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (Barbosa et al., 2010).

O termo estresse oxidativo é utilizado quando a produção de EROs resulta em dano tecidual ou em compostos tóxicos danosos aos tecidos. Considera-se que um organismo está sob estresse oxidativo quando ocorre desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (Schneider e Oliveira, 2004). O estresse oxidativo favorece a ocorrência de ataques das EROs a componentes celulares, especialmente lipídeos, levando ao dano tecidual (Grotto et al., 2008). A produção de EROs está elevada em lesões teciduais causadas por traumas, infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos, devido a um conjunto de processos como aumento de enzimas envolvidas na formação de radicais, a ativação da fagocitose, liberação de ferro e cobre ou interrupção da cadeia transportadora de elétrons (Rock et al., 1996).

Perante a situação em que é constatado estresse oxidativo, o organismo pode reagir de duas formas: adaptando-se ou sofrendo injúria celular. Em casos de estresse oxidativo brando, as células suportam e respondem a essa situação com aumento na produção de defesas antioxidantes, na tentativa de reestabelecer o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante. Porém, em casos severos há ocorrência de injúria celular e, quando essa é intensa, os danos tornam-se irreversíveis, culminando com morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2001).

## **2.8 Metaloproteinases e seus inibidores teciduais**

A composição estrutural da matriz extracelular (MEC) apresenta-se ativa e dinâmica, sendo composta por proteínas estruturais (colágeno e elastina), moléculas adesivas (fibronectina, laminina e fibrilina), proteínas da matriz e moléculas de superfícies de células. A habilidade das células em detectarem pequenas alterações na combinação, concentração e componentes da MEC sugere que perturbações em sua homeostase possam permitir a remodelagem da parede vascular e outros componentes (Coats et al., 1997).

Existem cerca de trinta metaloproteinases (MMPs) descritas. São divididas em diferentes grupos de acordo com seus substratos, chamados estromelinas, colagenases e gelatinases (Kupai et al., 2010). Essas enzimas participam em processos fisiológicos como no desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, reabsorção e remodelação tecidual; além de processos patológicos como destruição de cartilagens em casos de artrite, ruptura de placa aterosclerótica, reestenose miocárdica, desenvolvimento de aneurismas, metástase tumoral entre outros (Corbel et al., 1999).

São produzidas por vários tipos celulares (fibroblastos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células sinoviais e epiteliais), regulam processos biológicos e são controladas pela síntese, secreção, ativação de pró-enzimas e inibição de enzimas ativas. Sua atividade é regulada tanto positiva como negativamente por citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado de fibroblastos (FGF), interleucinas (IL-1, IL-4

e IL-6), membros da família do fator transformador de crescimento ou pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Spinale, 2002; Cawston e Wilson, 2006).

As MMPs são classificadas de acordo com o substrato que degradam, sendo divididas em colagenases (compreendidas pelas MMPs 1, 8, 13 e 18); gelatinases (MMP-2 e 9); estromelinas (MMPs 3, 7, 10, 11, 19 e 20); matrilisinas (MMPs 7 e 16) e as de tipo membrana MT-MMPs (MMPs 14, 15, 16, 17, 24 e 25) (Loftus e Thompson, 2002; Visse e Nagase, 2003). A maioria é secretada livremente no espaço extracelular, porém algumas são intracelulares, como a MMP-9 situada nos grânulos dos neutrófilos (Corbel et al., 1999; Nagase et al., 2006). A MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B) degradam a elastina, fibronectina e colágenos tipo IV, V e VII presentes na MEC de vários tecidos. Sistemicamente, as células fonte dessas enzimas são macrófagos, neutrófilos e linfócitos (Rosenberg, 2002). A forma latente da MMP-2 (pró MMP-2) está normalmente presente em tecidos de humanos e animais saudáveis, enquanto que a MMP-9 (forma ativa) está presente apenas em processos patológicos, embora a MMP-2 também possa estar presente em sua forma ativa em tais processos (Mun-Bryce e Rosenberg, 1998).

Todas MMPs possuem zinco presente no centro catalítico e são produzidas em forma de pró-enzima. A latência da pró-MMP é mantida pela interação entre o resíduo de cisteína presente no domínio pró-peptídico com o zinco presente no domínio catalítico, bloqueando o acesso deste ao substrato. São ativadas no tecido por clivagem do domínio pró-peptídico, deixando o sítio catalítico livre para interação com o substrato (Visse e Nagase, 2003). A exposição do sítio catalítico permite a lise de substrato das pró-MMPs, e é o fundamento para a detecção de ambas as formas, na presença do dodecil-sulfato de sódio (SDS) pela técnica da zimografia (Galis et al., 1995).

De acordo com Birkedal-Hansen et al. (1993), a atividade das MMPs no substrato da matriz extracelular é regulada por quatro vias:

- transcrição nos genes das MMPs,
- ativação de precursores,
- diferenças de especificidade de substrato,
- inibidores teciduais de MMPs (TIMPs)

Os TIMPs são proteínas que regulam as funções das MMPs, o nível de sua ativação e a habilidade de hidrolisar um determinado substrato (Murphy et al., 1999). A regulação inibitória da atividade das MMPs é realizada por um inibidor não específico ( $\alpha$ 2-macroglobulina) ou por inibidores específicos (TIMPs), que compreendem quatro proteínas: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4; os quais apresentam a capacidade de inibir a atividade das MMPs por ligação não covalente ao domínio catalítico das mesmas. Dessa forma, formam-se complexos de alta afinidade 1:1 (Sang, 1998; Kranzhofter et al., 1999).

A partir do momento que ocorre desequilíbrio entre os níveis de MMPs e TIMPs, o processo fisiológico passa a ser patológico, desencadeando diversas doenças como câncer, artrites, inflamação, diabetes e doenças cardiovasculares (Kupai et al., 2010). Sabe-se que níveis aumentados ou desregulados de MMPs são observados em qualquer doença que tem por característica a inflamação (Parks et al. 2004). As MMPs são essenciais para o tráfego de leucócitos pelos tecidos, a partir da digestão de moléculas da matriz extracelular (Parks et al., 2004). As MMP-2 e MMP-9 clivam quimiocinas e citocinas promovendo um mecanismo indireto de regulação de fluxo de células para o foco inflamatório (Deschamps e Spinale, 2006). Apesar das MMPs serem cruciais para resposta inflamatória, a atividade descontrolada dessas proteases pode provocar dano tecidual grave (Geurts et al., 2012).

As MMPs de tecido laminar de equinos foram isoladas pela primeira vez em casos clínicos de laminite, descobrindo que o tecido laminítico contém atividade aumentada de MMP-2 e MMP-9 em comparação a tecidos saudáveis (Pollitt et al., 1998). Sabe-se que quatro fatores podem desencadear a ativação de MMPs em equinos com laminite, sendo eles a liberação de aminas pela descarboxilação bacteriana dos aminoácidos, liberação de endotoxinas oriundas da lise de bactérias, liberação de exotoxinas por bactérias gram-positivas e fatores relacionados à obesidade (Bailey et al., 2004). A degradação laminar podal causada pelas MMPs tem sido associada à resposta inflamatória, devido à liberação de fatores de ativação de MMPs da corrente sanguínea para os dígitos, contribuindo com o processo degenerativo (Clutterbuck et al., 2010). Pelo exposto, nota-se que o assunto em tela é complexo, com vértices ainda não totalmente esclarecidos, justificando plenamente este estudo.

### 3.0 Referências

Afonso JAB, Mendonça CL (2007) Acidose Lática Ruminal. P. 313-319. In: **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3rd. Ed. Editores: Riet-Correa F, Schield AL, Mendez MDC, Lemos RAA. Rio Grande do Sul. 574p.

Albuquerque PI, Ximenes FHB, Moscardini ACR, Gouvêa LV, Mota ALAA, Godoy RF, Borges JRJ (2009). Caracterização das afecções podais em rebanho de gado holandês confinado. **Ciência Animal Brasileira** 1:46-52.

Alsaad M, Büscher W (2012) Detection of hoof lesions using digital infrared thermography in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 95:735-742.

Alves ALG, Fonseca BPA, Thomassian A, Nicoletti JLM, Hussni CA, Silveira AB (2007) Lombalgia em equinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 44:191-199.

Andersen PH (2003). Bovine Endotoxemia – some aspects relevant to production diseases. A review. **Acta Veterinaria Scandinavica** 98:141-155.

Bailey SR, Marr CM, Elliott J (2004) Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. **The Veterinary Journal** 167:129-142.

Barbosa KBR, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J (2010) Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição** 23:629-643.

Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG (2006) **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep. 616p.

Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review** 10:567-589.

Bicalho RC, Oikonomou G (2013) Control and prevention of lameness associated with claw lesions in dairy cattle. **Livestock Science** 156:96-105.

Birkedal-Hansen, Moore WGI, Bodden MK, Windson LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JÁ (1993) Matrix metalloproteinases: a review. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine** 4:197-250.

Caldeira RM (2005) Monitoração da adequação do plano alimentar e do estado nutricional de ovelhas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** 100:125-139.

Calsamiglia S, Blanch M, Ferret A, Moya D (2012) Is subacute ruminal acidosis pH related a problem? Causes and tools for its control. **Animal Feed Science and Technology** 172:42-50.

Cawston TE, Wilson AJ (2006) Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology** 20:983-1002.

Çetinkaya MA, Demirutku A (2012) Thermography in the assessment of equine lameness. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** 36:43-48.

Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG (2002). Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. **Veterinary Mexico** 33: 265-283.

Church DC (1993) **Ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 511-531p.

Clutterbuck AL, Harris P, Allaway D, Mobasheri A (2010). Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **The Veterinary Journal** 183:27-38.

Coats WD, Whittaker P, Cheung DT, Currier JW, Han B, Faxon DP (1997) Collagen content is significantly lower in restenotic versus nonrestenotic vessels after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit model. **Circulation** 95:1293-1300.

Constable PD, Hinchkliff KW, Done SH, Grunberg W (2017) Diseases of the alimentary tract-ruminant. In: **Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats**. 11ed. St. Louis, Elsevier, Missouri. p. 436-621.

Corbel M, Caulet-Maugendre S, Germain N (1999) Increase activity of matrix metalloproteinase and collagen deposition after chronic administration of antigen in sensitized BP2 mouse. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine** 159:189-198.

Costa SF, Pereira MN, Melo LQ, Caliani MV, Chaves ML (2008) Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e

epiderme de bezerros. II. Aspectos ultraestruturais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 60:10-18.

Deschamps AM, Spinale FG (2006) Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: Bioactive molecules and transcriptional regulation **Cardiovascular Research** 69:666-676.

Digiovani DB, Borges MHF, Galdioli VHC, Matias BF, Bernardo GM, Silva TR, Fávaro P, Barca Junior, FA, Lopes FG, Koetz Junior C, Ribeiro ELA (2016) Infrared thermography as a diagnostic tool for bovine subclinical mastitis detection. **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity** 10:685-692.

Dijkstra J, Boer H, Van Bruchem J, Bruining M, Tamminga S (1993) Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. **British Journal of Nutrition**. 69:385-396.

Dunbar MR, Johnson SR, Rhyan JC, McCollum M (2009) Use of Infrared Thermography to Detect Thermographic Changes in Mule Deer (*Odocoileus hemionus*) Experimentally Infected with Foot-and-Mouth Disease. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 40:296-301.

Dunlop RH (1972) Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine** 16:259-302.

Eddy AL, Van Hoogmoed LM, Snyder JR (2001) The role of thermography in the management of equine lameness. **The Veterinary Journal** 162:172-181.

Embrapa (2017) Novo Censo Agropecuário mostra crescimento de efetivo de caprinos e ovinos no Nordeste. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/busca-de-noticias//noticia/36365362/novo-censo-agropecuario-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>

Fao (2016) Disponível em: <http://www.fao.org/statistics/en/>.

Furlan RL, Macari M, Faria Filho DE (2006) Anatomia e Fisiologia do Trato Gastrointestinal. In: Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 616p.

Galis ZS, Sukhova GK, Libby P (1995) Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. **FASEB Journal** 9:974-980.

Garay EB, García JA (2009) Acidosis ruminal y sus consecuencias. Disponível em: <https://docplayer.es/2393716-Acidosis-ruminal-y-sus-consecuencias.html>

Geurts N, Becker-Pauly C, Martens E, Proost P, Van den Steen PE, Stocker W, Opdenakker G (2012) Mepriins process matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)/gelatinase B and enhance the activation kinetics by MMP-3. **FEBS Lett** 586:4264-4269.

González FHD, Silva SC (2006) **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Editoria UFRGS. 30p.

Greenough PR, Vermunt JJ, McKinnon JJ, Fathy FA, Berg PA, Cohen RDH (1990) Laminitis-like changes in the claws of feedlot cattle. **Canadian Veterinary Journal** 31:202-208.

Greenough P (2007) **Bovine Laminitis and Lameness**. Philadelphia: W. B. Saunders, 319p.

Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC (2008) Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification **Quimica Nova** 32:169-174.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2001) **Free Radicals in Biology and Medicine** Oxford University Press, Oxford.

Hatherill JR, Till GO, Ward PA (1991) Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents and Actions** 32:351-358.

Hoover WH (1986) Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science** 69:2755-2766.

Hovinen M, Siivonen J, Taponen S, Hanninen L, Pastell M, Aisla AM, Pyorala S (2008) Detection of clinical mastites with the help of a thermal camera. **Journal of Dairy Science** 91:4592-4598.

Instituto brasileiro de geografia e estatística – IBGE (2018). **Produção da Pecuária Municipal**. v. 45. Rio de Janeiro: IBGE. 9p.

Kozloski G (2002) **Bioquímica dos Ruminantes**. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Brazil. 212p.

Kranzhoffer A, Baker AH, George SJ, Newby AC (1999) Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1, -2, and -3 During Neointima Formation in Organ Cultures of Human Saphenous Vein. **Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology** 19:255-265.

Krause KM, Oetzel GR (2006) Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. **Animal Feed Science and Technology** 126:215-236.

Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P (2010) Matrix metalloproteinase activity assays: importance of zymography. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, 61:205-209.

Lean IJ, Van Saun R, De Garis P (2013) Energy and protein nutrition management of transition dairy cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 29:337-366.

Loftus IM, Thompson MM (2002) The Role of Matrix Metalloproteinases in vascular disease. **Vascular Medicine** 7:117-133.

Manella MQ, Lourenço AJ, Leme PR (2003) Recria de bovinos Nelore em pastos de *Brachiaria brizantha* com suplementação protéica ou com acesso a banco de proteína de *Leucaena leucocephala*: características de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia** 32: 1002 – 1012.

Meyer NF, Bryant TC (2017) Diagnosis and management of rumen acidosis and bloat in feedlots. **Veterinary Clinics Food and Animal** 33:481-498.

Mogg KC, Pollitt CC (1992) Hoof and distal limb surface temperature in the normal pony under constant and changing ambient temperatures. **Equine Veterinary Journal** 24:134-139.

Moncada S (2001). Nitric oxide: role in human disease. **Encyclopedia of Life Sciences**.

Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998) Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. **Journal of cerebral blood flow & metabolism** 18:1163-1172.

Murphy G, Stanton H, Cowell S. (1999) Mechanisms for pro-matrix metalloproteinases activation. **APMIS** 107:38-44.

Nagaraja TG, Titgemeyer EC (2007) Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science** 90:E17-E38.

Nikkhah A, Plaizier JC, Einarson MS, Berry RJ, Scott SL, Kennedy AD (2005) Infrared thermography and visual examination of hooves of dairy cows in two stages of lactation. **Journal of Dairy Science** 88:2749-2753.

Nocek JE (1997) Bovine Acidosis: Implications on Laminitis. **Journal of Dairy Science** 80:1005-1028.

Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**. 69:562-573.

Nogueira FRB, Souza BB, De Carvalho MGX, Garino Junior F, Marques AVMS, Leite RF (2013) Termografia infravermelha: uma ferramenta para auxiliar no diagnóstico e prognóstico de mastite em ovelha. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 35:289-297.

Oetzel GR (2017) Diagnosis and Manegement of Subacute Ruminal Acidosis in Dairy Herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 33:463-480.

Olsson GC, Bergsten C, Wiktorsson H (1998) The influence of diet before and after calving on the food intake, production and health of primiparous cows, with speccial reference to sole haemorrhages. **Journal of Animal Science** 66:75-86.

Orskov ER (1988) Supplement strategies for ruminants and management of feeding to maximize utilization of roughages. **Preventive Veterinary Medicine** 38:179-185.

Ortolani EL (2018) Prevenção das acidoses ruminais em rebanhos leiteiros: novos conceitos. In: V SIMPÓSIO NACIONAL DA VACA LEITEIRA. **Anais...** Faculdade de Veterinária – UFRGS.

Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology** 4:617-629.

Penner GB, Steele, MA, Aschenbach JR, McBride BW (2010) Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. **Journal of Animal Science** 89:1108-1119.

Pollitt CC, Pass MA, Pollitt S (1998) Batimastat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. **The Equine Veterinary Journal**, 26:119-124.

Portugal ES (2014) **Termografia e ultrassonografia Doppler do plexo pampiniforme e termografia do escroto de Touros: correlação com a qualidade do sêmen** (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal. 80p.

Purohit RC, McGoy MD (1980) Thermography in the diagnosis of inflammatory process in the horse. **American Journal of Veterinary Research** 41: 167-1174.

Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW.; Constable, PD (2007) **Veterinary Medicine**. London: Saunder Elsevier 2065p.

Rainwater-Lovett K, Pacheco JM, Packer C, Rodriguez LL (2009) Detection of foot-and-mouth disease virus infected cattle using infrared thermography **The Veterinary Journal** 180:317-324.

Ribeiro MO (2008) Thyroid Economy – Regulation, Cell Biology, Thyroid Hormone Metabolism and Action: The Special Edition: Metabolic effects of Thyroid Hormones. **Thyroid**, 8:197-203.

Roberto JVB, Souza BB (2014) Utilização da termografia de infravermelho na medicina veterinária e na produção animal. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology** 2, 3:73-84.

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg A (1996) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class 1 molecules. **Cell** 78:761-771.

Rosenberg GA (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **Glia** 39:279-291.  
Sagliyan A, Unsaldi E (2002). Observation on the Incidence of Foot Diseases of Cattle in Tunceli Region. **Journal of Health Sciences** 16:47-56.

Sang QXA (1998) Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. **Cell Research** 8:171-177.

Schneider CD, Oliveira AR (2004) Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** 10:308-313.

Slyter LL (1976) Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science** 43:910- 929.

Silva NS, Silveira JAS, Campos KF, Sousa MGS, Lopes CTA, Oliveira CMC, Duarte MD, Barbosa J (2009). Acidose ruminal em ovinos, diagnosticada pela central de diagnóstico veterinário (CEDIVET) da universidade Federal do Pará, no período de 2000 a 2008. **Ciência Animal Brasileira** 1:191-196.

Silveira RN, Berchielli TT, Canesin RC, Messana JD, Fernandes JJR, Pires AV (2009) Influência do nitrogênio degradável no rúmen sobre a degradabilidade in situ, os parâmetros ruminais e a eficiência de síntese microbiana em novilhos alimentados com cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de zootecnia** 38:570-579.

Simon EL, Gaughan EM, Epp T, Spire M (2006) Influence of exercise on thermographically determined surface temperatures of thoracic and pelvic limbs in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 229:1940-1944.

Soroko M, Henklewski R, Filipowski H, Jodkowska E (2013) The effectiveness of thermographic analysis in equine orthopedics. **Journal of Equine Veterinary Science** 33:760-762.

Souza RS (2017) **Avaliação de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento da laminite asséptica aguda decorrente de acidose ruminal por oligofrutose em bovinos**. 114 p. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Speakman JR, Ward S (1998) Infrared thermography: principles and applications **Zoology** 101:224-232.

Spinale FG (2002) Matrix metalloproteinase: regulation and dysregulation in the failing heart. **Circulation Research** 90:520-530.

Thomas, M.J. (2000). The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition, London** 16:716-718.

Turner TA (1991) Thermography as an aid to the clinical lameness evaluation. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice** 7:311-338.

Turner TA (1998) Use of Thermography in Lameness Evaluation. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, Baltimore. **Proceedings...** Lexington: American Association of Equine Practitioners, p. 224-226.

Turner TA (2001) Diagnostic thermography. **The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice** 17:95-113.

Valadares Filho SC, Pina DS (2006) Fermentação ruminal. In: Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG. **Nutrição de Ruminantes**. 2ed. Jaboticabal: FUNEP, cap.6, p.161-192.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1992) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science** 74:3583-3597.

Van Soest PJ (1994) **Nutritional ecology of the ruminant**. New York: Cornell University Press. 476pp.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Benfato VM, Kubota LT (2007) Espécies reativas do oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores do dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quimica Nova** 30:1323-1338.

Viana JGA (2008) Panorama geral da ovinocultura no Brasil e no Mundo. **Revista Ovinos**. 4:12.

Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research** 92:827-839.

Wood S, Lin Y, Knowles TG, Main DCJ (2015) Infrared thermography for lesion monitoring in cattle lameness. **Veterinary Record** 176:308-312.

Zecconi A, Redaelli V, Tarantino S, Luzi F, VERGA M (2011) Infrared thermography as a non invasive technique to assess lameness in dairy cows. In: SYMPOSIUM AND 8<sup>TH</sup> CONFERENCE LAMENESS - A GLOBAL PERSPECTIVE, Rotorua. **Lameness in ruminants**, p. 183.

## **Capítulo 2 - Termografia infravermelha podal no diagnóstico de laminite em ovinos com acidose ruminal subaguda<sup>1</sup>**

Amanda Festa Sabes<sup>1\*</sup>, Annita Morais Girardi<sup>1</sup>, Gabriela Marchiori Bueno<sup>1</sup>, Daniela Gomes da Silva<sup>1</sup>, Luiz Carlos Marques<sup>1</sup>

1 – Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP/Jaboticabal.

\*autor para correspondência: [amanda.festa@hotmail.com](mailto:amanda.festa@hotmail.com)

Resumo: a ocorrência de laminite após quadro inicial de acidose ruminal subaguda (ARS) é considerada a principal sequela nos animais acometidos por essa afecção. O exato mecanismo responsável pela instalação da laminite não foi completamente elucidado, porém a inflamação local é importante, além da dor ocasionada nos animais. A termografia infravermelha (TIV) é uma ferramenta utilizada na avaliação de diversos processos inflamatórios, principalmente nos casos de laminite na espécie equina. O presente estudo avaliou a temperatura podal em ovinos após indução experimental de ARS, com auxílio da TIV, objetivando diagnosticar a laminite precocemente. Foram utilizadas oito ovelhas adultas, sendo três animais alocados no grupo controle (GC) e cinco no grupo indução (GI), o qual recebeu dieta com alta proporção de alimento concentrado durante 30 dias. As regiões da banda coronária e pele adjacente foram avaliadas a cada 12 horas durante o período experimental, por meio de exame físico e termográfico em ambiente com temperatura controlada. Todos os animais do GI apresentaram alterações nos termogramas em diversos momentos ao longo do período, e a laminite foi diagnosticada clinicamente entre os dias 11 e 17. Os membros torácicos foram mais acometidos quando comparados com os

---

<sup>1</sup> O presente capítulo foi redigido conforme as normas da revista "Research in Veterinary Science" e será enviado para publicação.

membros pélvicos, diferindo dos estudos realizados com bovinos. Em 11 momentos distintos os dois dígitos dos quatro membros de todos os animais pertencentes ao GI apresentaram temperaturas superiores a 27°C, com valores chegando a 35°C. Em diversos momentos ocorreu a mudança no termograma previamente à manifestação clínica de laminite pelos animais do GI. Podemos concluir a TIV é uma importante ferramenta para o diagnóstico precoce de laminite em ovinos após indução experimental de ARS.

Palavras-chave: afecção podal, inflamação, temperatura.

## **1. Introdução**

A termografia infravermelha (TIV) é definida como a representação pictórica da temperatura da superfície de qualquer objeto, captando a emissão de calor (Valdés-Martínez e Park, 2011). A TIV não provoca dor ao paciente, é realizada à distância, reduzindo os riscos de lesão e estresse associados à manipulação e contato com os animais, além de não envolver a exposição a qualquer tipo de radiação nociva para o paciente ou operador, permitindo a repetição do exame quando necessário e sem restrições (Roberto e Souza, 2014).

A técnica permite visualizar fenômenos anátomo-patológicos, evidenciando afecções que apresentam alterações da perfusão sanguínea, tais como processos inflamatórios, oncológicos, alterações musculoesqueléticas, fibroses, neuropatias e isquemias (Yang e Yang, 1992; Walsh e Gaynor, 2001; Berry et al., 2003; Schaefer et al., 2007; McCafferty, 2007; Polat et al., 2010). Pode ser aplicada no diagnóstico precoce de alterações subclínicas, além de

prevenir o agravamento de lesões, pois detecta alterações teciduais antes da ocorrência de sintomatologia clínica (Garcia et al., 2016).

Utilizando-se a técnica de TIV, as afecções do casco podem ser avaliadas satisfatoriamente e rapidamente (Merriam, 2003), além de fornecer informações sobre laminite, abscessos, hematomas ou outras condições inflamatórias, especialmente quando os resultados da exploração clínica e radiológica são inconclusivos (Purohit e McCoy, 1980; Turner et al., 1983). A detecção precoce de laminite é essencial para a melhoria do bem-estar dos animais, aumento das variáveis produtivas e das taxas de recuperação, sendo a mesma detectada na TIV pela diferença de temperatura entre a banda coronária e a parede do casco (Zecconi et al., 2011).

A acidose ruminal subaguda (ARS) ocorre quando dietas ricas em energia e altamente palatáveis são empregadas em ruminantes não adaptados a esse tipo de substrato. O aumento da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta, resulta em diminuições transitórias do pH ruminal a valores abaixo de 5,5 (Klein et al., 2003). A alta incidência de laminite e outros problemas locomotores é relatada após episódios de ARS (Klein et al., 2003), sendo a laminite a seqüela mais significativa encontrada (Nordlund et al., 1995). A exata fisiopatogenia desse processo não foi completamente elucidada. Acredita-se que alterações na osmolaridade do trato gastrointestinal, liberação de fatores inflamatórios e alterações vasculares podais levam à ocorrência da laminite (Nocek, 1997). Alterações podais como crescimento excessivo dos cascos e alterações na sola podem ocorrer semanas ou meses após a ocorrência da ARS (Greenough et al., 1990).

O manejo nutricional é identificado como componente chave para o desenvolvimento da laminite, além da associação de outros fatores como: mudanças hormonais; doenças infecciosas, podridão dos cascos (foot rot); danos mecânicos ocasionados por piso excessivamente duro e outras condições inadequadas; além de outros fatores como condição e peso corporal além da estrutura dos membros (Nocek, 1997). O presente trabalho objetivou avaliar a termografia infravermelha como ferramenta auxiliar no diagnóstico precoce de laminite em ovinos com ARS induzida experimentalmente, uma vez que a literatura é escassa sobre esse tema na espécie ovina.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Animais**

O presente trabalho está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) recebendo aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp Campus Jaboticabal, sob Protocolo nº 5758/16. Foram utilizadas oito ovelhas adultas, mestiças da raça Santa Inês, híbridas e criadas a campo. Os animais foram mantidos em baias providas de piso de borracha, comedouros e bebedouros, sob as devidas condições de higiene, junto ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Unesp Câmpus de Jaboticabal. Os animais foram alimentados durante 60 dias, antes da indução da ARS, com feno de *Cynodon dactylon* à vontade, dieta nutricionalmente adequada para ovinos em manutenção (Sobrinho et al., 1996), com livre acesso à água potável e mistura mineral.

Os animais foram divididos em dois grupos sendo o grupo controle (GC) composto por três animais e o grupo indução (GI) com cinco animais. Para indução da ARS, o GI recebeu dieta, baseada no consumo de matéria seca (MS) do período de adaptação, na qual foram incluídos, diariamente, 10% de alimento concentrado farelado (76,8% de milho moído, 18,2% de farelo de soja e 5% de núcleo mineral e vitamínico), até completar 80% da MS (Brossard et al., 2003; Girardi, 2016), porcentagem mantida até o final dos 30 dias experimentais.

O alimento concentrado e o volumoso foram fornecidos separadamente e à vontade, de uma vez, às 6h30. Na manhã seguinte, as sobras foram pesadas para cálculo do consumo médio diário (kg de matéria orgânica por animal, posteriormente convertido para kg de MS por animal, com base nos resultados das análises bromatológicas), de cada grupo, para cada tipo de alimento. Tal procedimento teve por objetivo garantir a manutenção da ingestão de MS/kg de peso corporal obtido durante o período de adaptação (0,019601643 kg MS/kg de peso corporal para os animais do GC e 0,023506968 kg MS/kg de peso corporal para o GI), ajustando semanalmente o fornecimento do alimento à variação do peso corpóreo dos animais. Os valores basais das temperaturas dos animais dos dois grupos foram as médias das análises termográficas realizadas 15 dias, sete dias e imediatamente antes do início do período experimental.

## 2.2 Avaliação clínica e termográfica

Previamente à obtenção dos termogramas, os cascos foram inspecionados para detecção de sinais e lesões relacionados à laminite (Riet-Correa et al., 2001). Além da inspeção dos cascos também se realizou a observação dos animais claudicantes, o apoio dos membros, avaliação de

aspectos da muralha, espaço interdigital e quaisquer outras alterações da locomoção dos animais pertencentes do GI. As imagens termográficas podais foram obtidas com os animais contidos em posição quadrupedal, sem utilização de fármacos, após aclimatação mínima de 20 minutos (Purohit et al., 2008), sendo as áreas avaliadas previamente limpas, utilizando-se compressa seca, na ausência de luz solar direta e corrente de ar (Turner, 2001; Knížková et al., 2007), por meio de aparelho termovisor (FLIR T300). A câmera termográfica foi posicionada perpendicularmente à parede do casco, no espaço interdigital do membro avaliado, a cerca de 30 cm do mesmo, na posição anteroposterior. A emissividade automática adotada pelo aparelho foi de 0,98 e a resolução termográfica foi calibrada baseada na temperatura ambiente conforme recomendações do fabricante.

A temperatura ambiente foi controlada durante toda a avaliação e aferida por termômetro digital modelo 7665 (Incoterm Indústria de Termômetros LTDA., Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). A avaliação termográfica foi realizada às 08:00 e 20:00 horas, diariamente em todos os animais e pelo mesmo operador, evitando-se as variações provocadas pelo ciclo circadiano na temperatura do casco (D'Alterio et al., 2011). As regiões da parede do casco e pele adjacente foram escolhidas para a avaliação termográfica e, após a obtenção dos termogramas, os mesmos foram avaliados utilizando software específico (FLIR Tools Version 5.1.15036.1001, FLIR Systems Inc., Portland, Oregon, USA), obtendo as temperaturas máximas, mínimas e médias das regiões avaliadas.

### 2.3 Análise estatística

Foi utilizado o software de análise estatística SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) para análise das variáveis, o método escolhido foi a análise de variância com medidas repetidas, além de comparações de médias aos pares. Através do teste F foi realizado o desdobramento dos grupos através dos tempos, com nível de significância adotado de 5%. Foi realizada a análise do Coeficiente de correlação de Pearson entre as temperaturas obtidas pela análise do software (máxima, média e mínima) e a temperatura ambiente. Além disso, o Teste de T de Student foi realizado, a nível de 5%, para comparação entre as médias gerais das três temperaturas entre os dois grupos.

## 3. Resultados

### 3.1 Avaliação clínica de laminite

As médias do pH ruminal dos animais do GI, durante vinte e quatro horas ( $6,11 \pm 0,20$ ), apresentaram diferença significativa quando comparado com as médias do pH ruminal das ovelhas do GC ( $6,57 \pm 0,16$ ). Os dias experimentais que diferiram do GC foram segundo, quarto, quinto, sexto e do oitavo ao 30º dia de fornecimento de dieta concentrada. Os menores valores de pH ruminal do GI se concentraram do oitavo até o 17º dia após a indução da doença, ou seja, desde o início da dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de alimento volumoso, mostrando que o método de indução de ARS foi eficaz nos animais do GI.

Os sinais clínicos relacionados à laminite como a alternância de apoio principalmente dos membros torácicos, claudicação leve, aumento do tempo de decúbito esternal e úngulas sensíveis à palpação iniciaram-se no momento 22

(11º dia), estendendo-se até o momento 34 (17º dia); sendo as manifestações clínicas de dor mais evidentes nos membros torácicos de todos os animais pertencentes ao GI.

### 3.2 Avaliação termográfica podal

A temperatura ambiental na sala de avaliação foi controlada e manteve-se praticamente sem alteração durante o período de avaliação, apresentando valor médio de  $25,09 \pm 0,57^{\circ}\text{C}$ . Os aumentos de temperatura da parede do casco ocorreram entre 10 e 5 dias antes da manifestação dos sinais de dor, durante todo o período experimental foram obtidos 61 momentos de avaliações termográficas de todos os animais. As médias gerais das temperaturas máximas, mínimas e médias e, o resultado do Teste de T de Student dos animais pertencentes aos grupos controle e indução encontram-se na Tabela 1. Através do Teste de T de Student, as seguintes temperaturas mínimas não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ): o dígito medial do membro pélvico esquerdo e os dígitos lateral e medial do membro pélvico direito. As demais temperaturas apresentaram diferença significativa na comparação dos grupos pelo referido Teste ( $p < 0,05$ ). Após análise de correlação entre as três temperaturas obtidas pelo software termográfico e a temperatura ambiente, a temperatura máxima foi a que menos apresentou influência em comparação com temperatura ambiental ( $r^2 = 0,33$ ), sendo a escolhida para discussão. Nas figuras 1 à 4 estão as representações gráficas das médias das temperaturas máximas dos dois grupos experimentais ao longo do tempo. Nota-se que nos dois dígitos dos quatro membros as temperaturas dos animais do GI foram superiores aos animais do

GC em praticamente todos os momentos avaliados, estando os momentos que apresentaram diferenças significativas listados a seguir.

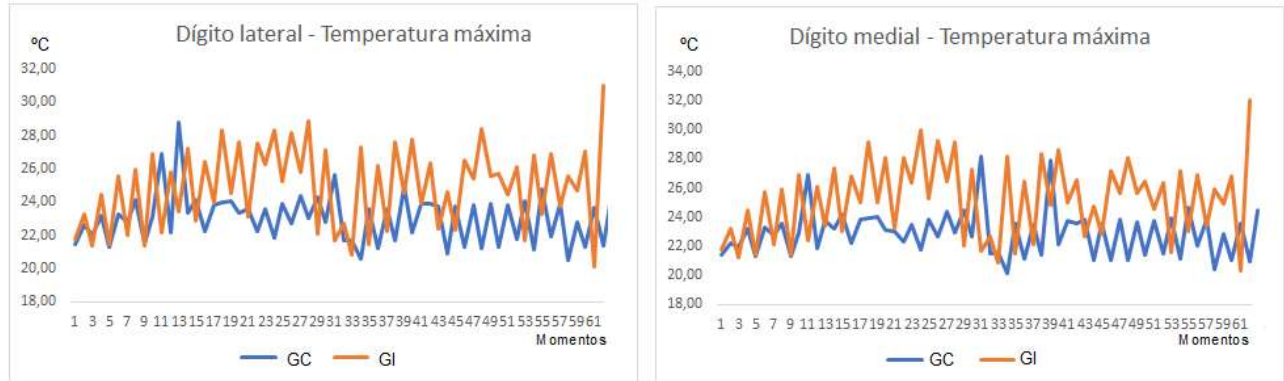
**Tabela 1:** Médias gerais obtidas das três temperaturas avaliadas (máxima, mínima e média) dos animais pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI) ao longo do período experimental.

	Dígito	Grupo		
	Lateral	GC	GI	
<b>Membro torácico esquerdo</b>	<b>Lateral</b>	Temp máxima	22,95°C a	24,89°C b
		Temp mínima	21,80°C a	22,67°C b
		Temp média	22,37°C a	23,87°C b
	<b>Medial</b>	Temp máxima	22,85°C a	25,16°C b
		Temp mínima	21,77°C a	22,71°C b
		Temp média	22,37°C a	24,05°C b
<b>Membro torácico direito</b>	<b>Lateral</b>	Temp máxima	22,80°C a	25,63°C b
		Temp mínima	21,91°C a	22,83°C b
		Temp média	22,40°C a	24,36°C b
	<b>Medial</b>	Temp máxima	22,79°C a	25,54°C b
		Temp mínima	21,88°C a	22,80°C b
		Temp média	22,40°C a	23,32°C b
<b>Membro pélvico esquerdo</b>	<b>Lateral</b>	Temp máxima	23,05°C a	25,50°C b
		Temp mínima	21,89°C a	22,41°C b
		Temp média	22,54°C a	24,11°C b
	<b>Medial</b>	Temp máxima	23,11°C a	25,52°C b
		Temp mínima	21,90°C a	22,29°C a
		Temp média	22,58°C a	23,98°C b
<b>Membro pélvico direito</b>	<b>Lateral</b>	Temp máxima	23,08°C a	25,15°C b
		Temp mínima	21,89°C a	22,09°C a
		Temp média	22,58°C a	23,77°C b
	<b>Medial</b>	Temp máxima	22,94°C a	25,11°C b
		Temp mínima	21,87°C a	22,12°C a
		Temp média	22,46°C a	23,74°C b

\*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de T de Student a 5%  
Temp: temperatura

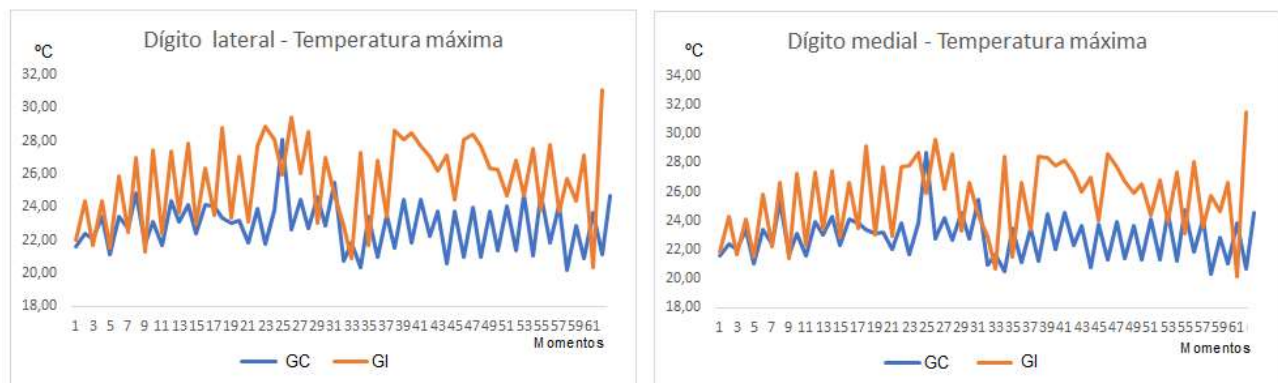
Em todos os momentos em que as temperaturas avaliadas apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), as médias do GI foram superiores as médias do GC para todos os dígitos dos quatro membros. As médias das temperaturas máximas dos dígitos lateral e medial do MTE (Figura 1) apresentaram diferença

significativa ( $p < 0,05$ ) nos momentos 9, 17, 19, 21, 22, 23, 25, 27, 33, 39, 46, 47, 48 e 61 na comparação entre os animais do GC e do GI.



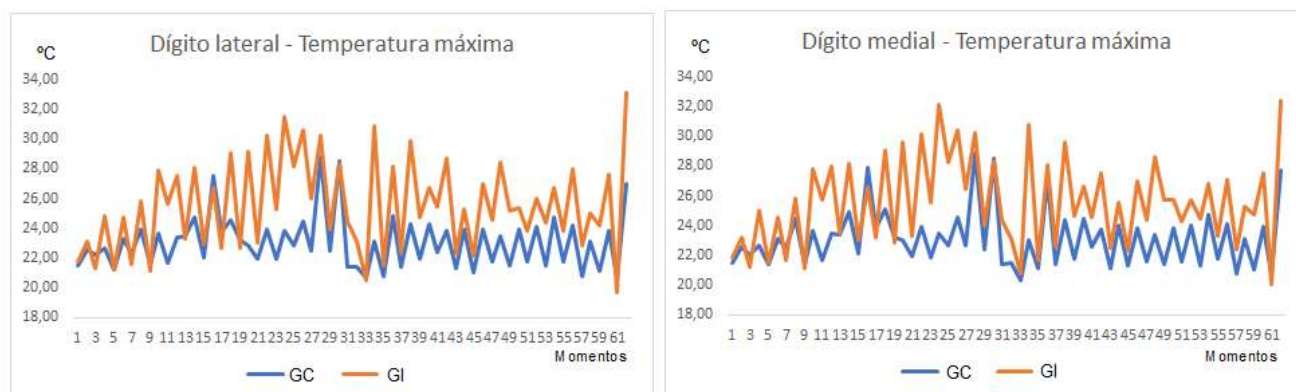
**Fig 1:** gráficos resultantes das médias das temperaturas máximas obtidas após realização da análise de termografia infravermelha (TIV) do membro torácico esquerdo (MTE) dos ovinos pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI) após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS). Jaboticabal, 2019.

As médias das temperaturas máximas dos dígitos medial e lateral do MTD (Figura 2) apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos nos momentos 9, 17, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 33, 37, 38, 40, 42, 45, 46, 47, 48, 55 e 61.



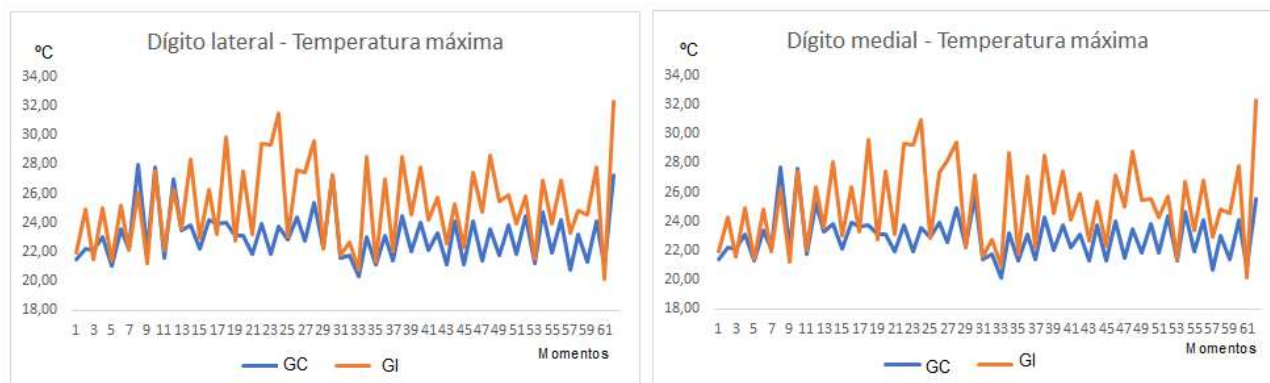
**Fig 2:** gráficos resultantes das médias das temperaturas máximas obtidas após realização da análise de termografia infravermelha (TIV) do membro torácico direito (MTD) dos animais pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI) após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS). Jaboticabal, 2019.

As médias das temperaturas máximas dos dígitos medial e lateral do MPE (Figura 3) apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos momentos 11, 19, 17, 21, 23, 24, 25, 33, 37, 47 e 61 na comparação entre os grupos GC e GI.



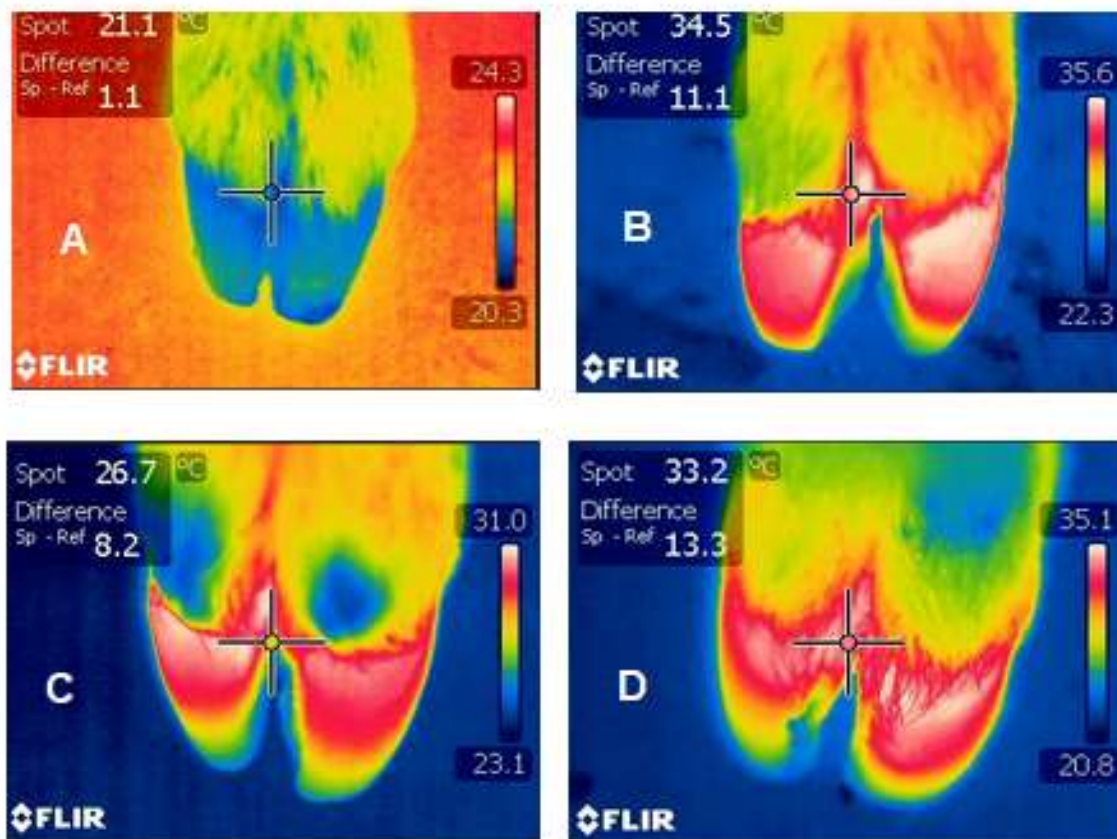
**Fig 3:** gráficos resultantes das médias das temperaturas máximas obtidas após realização da análise de termografia infravermelha (TIV) do membro pélvico esquerdo (MPE) dos animais pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI) após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS). Jaboticabal, 2019.

As médias das temperaturas máximas dos dígitos medial e lateral do MPD (Figura 4) apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos momentos 13, 17, 19, 21, 22, 23, 26, 33, 37, 47 e 61 na comparação entre os grupos.



**Fig 4:** gráficos resultantes das médias das temperaturas máximas obtidas após realização da análise de termografia infravermelha (TIV) do membro pélvico direito (MPD) dos animais pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI) após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS). Jaboticabal, 2019.

A Figura 5 ilustra a diferença entre a TIV de um animal pertencente ao GC em relação a um dos animais do GI ao longo do período experimental.



**Fig 5:** imagens termográficas podais realizadas durante o período experimental. Imagem A: animal do grupo controle (GC); Imagem B: animal do grupo indução (GI) após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS): momento número 15; Imagem C: animal GI, momento número 33; Imagem D: animal GI: momento número 51. – Jaboticabal, 2019.

#### 4. Discussão

A laminite é considerada uma doença sistêmica com manifestações nos dígitos, ocorrendo alterações vasculares e degenerativas do cório laminar, que podem afetar o posicionamento e a mobilidade da falange distal dentro do estojo córneo (Greenough, 2007). Os principais sinais clínicos encontrados são claudicação em diferentes graus, relutância em se locomover, diminuição do

apoio no membro afetado, cifose, e no local pode-se observar inchaço, além de aumento de temperatura (Nocek, 1997; Jackson e Cockcroft, 2002).

Durante o período foram obtidas 1732 imagens termográficas totais. A área escolhida para avaliação termográfica foi a banda coronária e pele adjacente, pois essa região possui maior vascularização, refletindo a circulação sanguínea local. Dessa forma, lesões ou alterações inflamatórias podem ser identificadas por meio do aumento da temperatura local (Nikkhah et al., 2005; Gloster et al., 2011; Alsaad e Büscher, 2012).

Nenhum animal pertencente ao GC apresentou alterações termográficas e tampouco, sinais clínicos de laminite durante o período de estudo. O modelo experimental de indução de laminite após quadro de ARS mostrou-se efetivo para análise dessa patologia, conforme foi relatado por Girardi (2016). Trabalhos realizados com bovinos (Gloster et al., 2011; Alsaad e Büscher, 2012; Stokes et al., 2012; Alsaad et al., 2014; Wood et al., 2014; Souza, 2017) relataram a influência da temperatura ambiente sobre a temperatura podal dos animais, ocorrendo vasoconstrição nos membros como mecanismo de conservação de calor, principalmente nos países de clima temperado a frio. Além da importância da temperatura ambiental, a limpeza da área a ser avaliada também é relevante, pois sujidades e umidade no local alteram os resultados (Turner, 2001); ressaltando a importância da manutenção da temperatura ambiente controlada no presente estudo, além da limpeza prévia das áreas avaliadas.

A TIV apresenta diversos pontos positivos como ferramenta de avaliação de afecções podais, porém um dos grandes desafios é estabelecer qual valor utilizar como temperatura discriminatória entre higidez e morbidade. Wood et al. (2014) desenvolveram equações para definir a variação da temperatura podal de

vacas leiteiras com ou sem lesões em diversas temperaturas ambientes, visando a comparação entre rebanhos e o acompanhamento ao longo do tempo. Trabalhos europeus utilizando bovinos leiteiros citam a temperatura de 27°C como linha de corte para classificação, sem distinção dos membros e dígitos (Stokes et al., 2012; Renn et al., 2014). Souza (2017) ao avaliar laminite aguda em novilhas nelore após indução experimental de acidose láctica ruminal aguda sem controle de temperatura ambiental, utilizou 30°C como temperatura discriminatória entre higidez e morbidade. No presente trabalho, as médias gerais das temperaturas máximas do GI dos dígitos laterais e mediais dos quatro membros avaliados (Tabela 1) foram inferiores as notas de corte discriminadas pela literatura compilada, porém todas as médias do GI foram superiores as médias do GC durante o período, evidenciando as variações térmicas dos animais com laminite após indução de ARS.

Ao utilizarmos a temperatura de 27°C como linha discriminatória entre higidez e morbidade, a mesma foi comparada com as temperaturas máximas obtidas de cada avaliação termográfica dos animais experimentais, pois foi a que menos apresentou influência ambiental. Não foi encontrada na literatura compilada trabalhos realizados com ovinos, portanto a comparação foi realizada com a espécie bovina. Os animais pertencentes ao GC apresentaram temperaturas máximas inferiores à 27°C, sendo todos classificados como hígidos. Durante o período, todos os dígitos dos quatro membros dos animais do GI apresentaram diversos momentos em que os valores das temperaturas máximas foram superiores à 27°C, sendo que o MTD (28,44%) foi o que mais apresentou temperaturas superiores à temperatura de corte, seguido pelo MPE (27,29%), MPD (23,27%) e, por último, MTE (20,97%). Em 11 momentos

distintos (9, 13, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 33, 37 e momento 61) todos os dígitos dos quatro membros apresentaram temperaturas superiores à 27°C, sendo a mesma apresentando valores superiores à 30°C em animais com laminite, chegando até valores de 35,5°C. Os resultados obtidos no presente trabalho diferem do relatado por Sousa (2017), ao avaliar a temperatura média do termograma em bovinos submetidos à indução de laminite aguda, pois os membros pélvicos foram os que apresentaram as maiores temperaturas.

A identificação da laminite pela TIV torna-se relativamente fácil, principalmente quando o aumento de temperatura não ocorre em todos os membros de maneira simultânea, permitindo comparações pareadas entre os diferentes dígitos. Os aumentos de temperatura da parede do casco ocorreram entre 10 e 5 dias antes da manifestação dos sinais de dor, semelhante ao descrito para equinos com laminite (Turner, 1991), tornando a TIV uma importante técnica para o diagnóstico precoce de laminite, além de proporcionar mais rapidamente o início do tratamento. Todos os animais do G1 apresentaram sinais clínicos de laminite, além de variações marcantes nos termogramas durante todo o período experimental. Os sinais de sensibilidade dolorosa e/ou claudicação dos animais ocorreram em 19 momentos ao longo do período, sendo que em 90% dos casos o acometimento se deu nos membros torácicos. A maior ocorrência de alterações nos membros torácicos pode ser devido à conformidade dos ovinos, se assemelhando ao que ocorre em equinos, pois na espécie equina os membros torácicos são responsáveis por suportarem até 60% do peso corporal (Hood, 1999).

A ocorrência da laminite não discrimina a frequência de quais dígitos ou membros são acometidos (Nocek, 1997; Thoefner et al., 2004; Van Amstel e

Shearer, 2006; Greenough, 2007; Radostits et al., 2007, Danscher et al., 2009) portanto, o presente estudo prima-se pelo pioneirismo. Em bovinos leiteiros, acredita-se que a maior ocorrência de afecções podais nos membros pélvicos se dá em decorrência das alterações conformacionais, principalmente pelo posicionamento e volume do úbere, causando maior pressão sobre os dígitos laterais dos membros pélvicos, aumentando a predisposição às lesões (Silva et al., 2006, Machado et al., 2008; Cunha, 2010; Rodrigues, 2013). Aspectos relacionados a laminite, claudicação dos animais e a variação nos padrões térmicos são frequentemente relatados principalmente em bovinos leiteiros (Alsaad e Büscher, 2012; Main et al., 2012; Stokes et al., 2012; Alsaad et al. 2014; Talukder et al., 2015), porém os trabalhos não especificam quais afecções podais são responsáveis pela manifestação clínica e variação térmica.

Outro importante fator em relação à laminite é o reconhecimento da dor. Alguns parâmetros fisiológicos de resposta a dor e métodos de avaliação foram investigados na tentativa de estabelecer qual é o mais adequado (Murrell et al., 2008). Mudanças comportamentais podem ser avaliadas caso ocorra suspeita de dor nos animais, entre elas redução da atividade, aumento do tempo de decúbito, afastamento do rebanho entre outros (Clark, 2009), sinais esses que ocorreram nos animais do presente estudo. Os ovinos são classificados como animais estoicos, portanto é possível que os mesmos não manifestem sinais óbvios de dor ou incômodo. Como são animais predados, é possível que por consequência da evolução, seja vantajoso não mostrar sinais de dor, pois seriam alvos mais fáceis de seus predadores (Fitzpatrick et al., 2006). Os aumentos das temperaturas dos dígitos dos animais do GI foram marcantes ao longo do período de observação, entretanto, apenas em 19 momentos foram observados

sinais de dor podal e/ou desconforto, possivelmente, devido à natureza estóica dos ovinos. Tal fato mostra a importância da realização do exame termográfico como ferramenta para diagnóstico de laminite subclínica, antes mesmo da manifestação clínica dos sinais, possibilitando a adoção de tratamentos e/ou medidas de controle numa fase de evolução precoce, minimizando o desconforto para os animais.

## **5. Conclusões**

Por meio da avaliação termográfica podal de ovinos com laminite após indução experimental de ARS podemos concluir que a TIV apresentou alterações nos padrões térmicos podais anteriormente à manifestação dos sinais clínicos de laminite, além da ocorrência de alterações térmicas em momentos que os animais não tiveram sintomatologia clínica, sendo o aumento da temperatura notado entre 10 e 5 dias antes ao diagnóstico clínico. Os animais com laminite apresentaram temperaturas podais superiores à 27°C, com maior acometimento dos membros torácicos. A TIV torna-se uma importante ferramenta no diagnóstico precoce de doenças inflamatórias podais, além de possibilitar um exame rápido e indolor.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio regular (Processo: 2016/16631-8).

## **Declaração de conflitos de interesses**

Os autores declaram que não ocorreram conflitos de interesses.

## **6. Referências**

Alsaad, M., Buscher, W. 2012. Detection of hoof lesions using digital infrared thermography in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 95, 2, 735-742. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4762>.

Alsaad, M., Syring, C., Dietrich, J., Doherr, M.G., Gujan, T., Steiner, A., 2014. A field trial of infrared thermography as a non-invasive diagnostic tool for early detection of digital dermatitis in dairy cows. *Vet. J.* 199, 281–285. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.11.028>.

Berry, R. J., Kennedy, A. D., Scott, S. L., Kyle, B. L., Schaefer, A. L. 2003. Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: Potential for mastitis detection. *Can. J. Anim. Sci.*, 83, 687-693. <http://dx.doi.org/10.4141/A03-012>.

Brossard, L., Martin, C., Michalet-Doreau, B. 2003. Ruminal fermentative parameters and blood acid-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. *An. Res.*, 52, 513-530. <http://dx.doi.org/10.1051/animres:2003036>.

Clark, J. 2009. Acute pain in dogs: how to identify it? International SCIVAC Congress.

Cunha, C. S. T. 2010. Prevalência das afecções podais em explorações de bovinos leiteiros com pavimento de cimento liso versus ripado. 2010. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

Dansch, A.M., Enemark, J.M.D., Telezhenko, E., Capion, N., Ekstrom, C.T, Thoefner, M.B. 2009. Oligofructose overload induces lameness in cattle. *J. Dairy Sci.*, 92, 607-616. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1271>.

D'Iterio, G., Casella, S., Gatto, M., Ganesella, M., Piccione, G., Morgante, M. 2011. Circadian rhythm of foot temperature assessed using infrared thermography in sheep. *Czech J. An. Sci.*, 56,7, 293-300. <http://dx.doi.org/10.17221/1294-CJAS>.

Fitzpatrick, J., Scott, M., Nolan, A. 2006. Assessment of pain and welfare in sheep. *Small Rum. Res*, 62, 1-2, 55-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.028>.

Garcia, E.M., Crowley, J., Hagan, C., Atkinson, L.L. 2016. Evolution of Imaging in Breast Cancer. *Clinic Obstetrics and Gynecology*, 59, 2, 322-35. <http://dx.doi.org/10.1097/GRF.000000000000193>.

Girardi, A.M. 2016. Acidose ruminal subaguda em ovinos santa inês: estudo clínico, laboratorial e avaliação da laminite por termografia infravermelha e radiologia digital (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal.

Gloster, J., Ebert, K., Gubbins, S., Bashiruddin, J., Paton, D.J. 2011. Normal variation in thermal radiated temperature in cattle: Implications for foot-and-mouth disease detection. *BMC Vet. Res.*, 7, 73-82. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-7-73>.

Greenough, P.R., Vermunt, J.J., McKinnon, J.J., Fathy, F.A., Berg, P.A., Cohen, R.D.H. 1990. Laminitis-like changes in the claws of feedlot cattle. *Canad. Vet. J.*, 31, 202- 208.

Greenough, P. 2007. *Bovine Laminitis and Lameness*. Philadelphia. W. B. Saunders, USA, 319p.

Hood, D.M. 1999. The pathophysiology of developmental and acute laminitis. *The Vet Clinic North Amer*, 15, 321-343.

Jackson, P.G.G., Cockcroft, P.D. 2002. *Clinical examination of farm animals*. Malden: Blackwell Science, 313 p.

Klein, J. L., Hooijer, G. A., Rehage, J., Noordhuizen, J. P. T. M. 2003. Subacute

ruminal acidosis (SARA): a review. *J. Vet. Med. Series A*, 50, 8, 406-414.

Knížková, I., Kunc, P., GürdL, G. A. K., Pinar, Y., Selv, K. Ç. 2007. Applications of infrared themography in animal production. *J. Faculty Agric.*, 22, 3, 329-336.

Machado, P. P., Morais, P. H., Santos, H. P., Oliveira, R. A., Guerra, P. C.; Teixeira, W. C. 2008. Prevalência e classificação de afecções podais em fêmeas bovinas destinadas à produção de leite na bacia leiteira do município de Itapecuru Mirim-MA. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, 9, 4, 777-786.

Main, D.C.J., Stokes, J.E., Reader, J.D., Whay, H.R., 2012. Detecting hoof lesions in dairy cattle using a hand-held thermometer. *Vet. Rec.* 171, 504-507. <http://dx.doi.org/> DOI: 10.1136/vr.100533.

McCafferty, D. J. 2007. The value of infrared thermography for research on mammals: previous applications and future directions. *Mammal Review*, 37, 3, 207-223, 2007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2907.2007.00111.x>.

Merrian, J.G. 2003. The role and importance of farriery in equine veterinary practice. *Vet Clic North Am Equine Pract*, 19, 2 273-283. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(03\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(03)00022-1).

Murrell D.F., Dick, S., Ahmed, A.R., Amagai, M., Barnadas, M.A., Borradori, L., Bystry, J.C., Cianchini, G., Diaz, L., Fivenson, D., Hall, R., Harman, K.E., Hashimoto, T., Hertl, M., Hunzelmann, N., Iranzo, P., Joly, P., Jonkman, M.F.,

Kitajima, Y., Korman, N.J., Martin, L.K., Mimouni, D., Pandya, A.G., Payne, A.S.; Rubenstein, D., Shimizu, H., Sinha, A.A., Sirois, D., Zillikens, D., Werth, V.P. 2008. Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 58, 6, 1043-1046. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2008.01.012>

Nikkhah, A., Plaizier, J.C., Einarson, M.S., Berry, R.J., Scott, S.L., Kennedy, A.D. 2005. Short communication: Infrared thermography and visual examination of hooves of dairy cows in two stages of lactation. *J. Dairy Sci*, 88, 2749–2753. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72954-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72954-4).

Nocek, J.E. 1997. Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80, 1005-1028. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76026-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76026-0).

Nordlund, K. V., Garrett, E. F., Oetzel, G. R. 1995. Herd-based rumenocentesis: a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis. *Comp. Cont. Ed. Prac. Vet.*, 17, S48-S56.

Polat, B., Colak, A., Cengiz, M., Yanmaz, L. E., Oral, H., Bastan, A., Kaya, S.; Hayirli, A. 2010. Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci*, 93, 8, 3525-3532. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2807>.

Purohit, R.C., McCoy, M.D. 1980. Thermography in the diagnosis of inflammatory processes in the horse. *Amer J Vet Res*, 41, 1167 – 1174.

Purohit, R. C., Turner, T. A., Pascoe, D. D. 2008. Use of Infrared Imaging in Veterinary Medicine. In: Diakides, N. A.; Bronzino, J. D. Medical Infrared Imaging. Boca Raton: Crc Press. p. 21/1-21/8. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420008340.ch21>.

Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., Constable, P. D. 2007. Veterinary Medicine. 10th ed. London: Elsevier Saunders, 2156p.

Renn, N., Onyango, J., McCormick, W. 2014. Digital infrared thermal imaging and manual lameness scoring as a means for lameness detection in cattle. Vet. Clin. Sci., 2, 16–23.

Riet-Correa, F., Schild, A. L., Mendez, M. C., Lemos, R. A. A. 2001. Doenças de ruminantes e equinos. 2ed. São Paulo: Livraria Varela, 574 p.

Roberto, J. V. B., Souza, B. B. 2014. Utilização da termografia de infravermelho na medicina veterinária e na produção animal. J. Anim. Behav. Biometeorol. 2, 3, 73-84. <http://dx.doi.org/10.14269/2318-1265/jabb.v2n3p73-84>.

Rodrigues, M. 2013. Avaliação das características do líquido ruminal associada à termografia digital e atividade pedométrica em vacas holandesas. 2013. 22 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

Schaefer, A.L., Cook, N.J., Church, J.S., Basarab, J., Perry, B.J., Miller, C., Tong, A.K.W. 2007. The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. *Res. Vet. Sci.*, 83, 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.01.008>.

Silva, F. F., Alves, C. G. T.; Silva Júnior, F. F. 2006. Pododermatite Solar Circunscrita, Úlcera de Husterholz ou Úlcera da Sola. *Ciê. Vet. Trópicos*, 9, 2/3, 102-105.

Sobrinho, A. G. S., Batista, A. M. V., Siqueira, E. R., Ortolani, E. L., Susin, I.; Silva, J. F. C., Teixeira, J. C., Borba, M. F. S. 1996. *Nutrição de ovinos*. Jaboticabal: FUNEP, 258p.

Sousa, R. S. 2017. *Avaliação de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento da laminite asséptica aguda decorrente de acidose ruminal por oligofrutose em bovinos*. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Stokes, J.E., Leach, K.A., Main, D.C.J., Whay, H.R., 2012. An investigation into the use of infrared thermography (IRT) as a rapid diagnostic tool for foot lesions in dairy cattle. *Vet. J.* 193, 674–678. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.052>.

Talukder, S., Gabai, G., Celi, P. 2015. The use of digital infrared thermography and measurement of oxidative stress biomarkers as tools to diagnose foot lesions

in sheep. *Small Rum Res.*, 127, 80-85.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.04.006>.

Thoefner, M, B., Pollitt, C.C., Van Eps, A.W., Milinovich, G.J, Trott, D.J, Wattle, O., Andersen, P.H. 2004. Acute bovine laminitis: A new induction model using alimentary oligofructose overload. *J. Dairy Sci*, 87, 2932-2940.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73424-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73424-4).

Turner, T.A., Fessler, J.F., Lamp, M., Pearce, J.A., Geddes, L.A. 1983. Thermographic evaluation of horses with podotrochlosis. *Amer. J. Vet. Res.*, 44, 535-539.

Turner, T. A. 2001. Diagnostic thermography. *The Vet. Clin. North Amer. Eq. Pract.* 17, 1, 95-113. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30077-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30077-9).

Valdés-Martínez, A., Park, R.D. 2011. Diagnostic Procedures. In: Baxter GM, editor. *Adams and Stashak's lameness in horses*. 6<sup>th</sup> ed.: Wiley-Blackwell. 1272p.

Van Amstel, S.R., Shearer, J.K. 2006. *Manual for the treatment and control of lameness in cattle*. Ames (IA): Blackwell Publishing Professional.  
<https://doi.org/10.1002/9780470344576>.

Walsh, M.T., Gaynor, E.V. 2001. Thermal imaging of marine mammals. In: Dierauf, L.; Gulland, F.M.D. (Ed.), *CRC Handbook of marine mammal medicine*. 2nd ed (643–652). Florida: CRC Press.

Wood, S., Lin, Y., Knowles, T.G., Main, D.C. 2014. Infrared thermometry for lesion monitoring in cattle lameness. *Vet. Rec.*, 176, 308–311. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.102571>.

Yang, W., Yang, P.P.T. 1992. Literature survey on biomedical applications of thermography. *Biomedical Materials and Engineering*, 2, 7 – 18. <http://doi.org/10.3233/BE-1992-2102>.

Zecconi, A., Redaelli, V., Tarantino, S., Luzi, F. Verga, M. 2011. Infrared thermography as a non invasive technique to assess lameness in dairy cows. In: *Symposium and 8th Conference lameness - a global perspective*, 16, 2011, Rotorua. *Lameness in ruminants*, Rotorua, 183.

## Highlights

- uso da termografia infravermelha em afecções podais de ovinos.
- temperatura aumentada em animais com laminite após acidose ruminal subaguda.
- diagnóstico precoce da laminite antes mesmo das manifestações clínicas.

### **Capítulo 3 – Avaliação do estresse oxidativo em ovinos com acidose ruminal subaguda e laminite<sup>2</sup>**

Amanda Festa Sabes<sup>1\*</sup>, Anelise Maria Bosco<sup>2</sup>, Annita Morais Girardi<sup>1</sup>, Ariana Aparecida Ferreira Pereira<sup>2</sup>, Gabriela Marchiori Bueno<sup>1</sup>, Tiago José Caparica Módulo<sup>1</sup>, Daniela Gomes da Silva<sup>1</sup>, Paulo César Ciarlini<sup>2</sup>, Luiz Carlos Marques<sup>1</sup>

1 - Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP/Jaboticabal.

\*Autor para correspondência: [amanda.festa@hotmail.com](mailto:amanda.festa@hotmail.com)

2 - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal. Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) – UNESP/Araçatuba.

Resumo: o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência ou não de estresse oxidativo em ovinos após indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS) e posterior desenvolvimento de laminite. Para tal, foram utilizadas oito ovelhas adultas, sendo as mesmas divididas entre os grupos controle (GC) contendo três animais e o grupo indução (GI) contendo cinco animais. Para indução da ARS os animais do GI receberam dieta com alto teor de alimento concentrado durante 30 dias, sendo as coletas de sangue venoso para avaliação do estresse oxidativo realizadas diariamente. Foram avaliadas a TAC (capacidade antioxidante total), TOC (capacidade oxidante total), LPO (peroxidação lipídica) e o IEO (índice de estresse oxidativo). Todos os animais do GI apresentaram alterações de pH ruminal compatíveis com ARS e também laminite em diversos momentos ao longo do período. A TAC dos animais do GI foi inferior em comparação ao GC, e as variáveis relacionadas a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (TOC, LPO e IEO) e, com consequente ocorrência de estresse oxidativo, encontraram-se aumentadas, principalmente a

---

<sup>2</sup> O presente capítulo foi redigido conforme as normas da revista "Research in Veterinary Science" e será enviado para publicação.

partir do dia 20. A dúvida que nos cerca a respeito dos resultados obtidos é se o estresse oxidativo se instalou em decorrência da ARS, da laminite ou das duas patologias em conjunto. Esse é provavelmente um dos primeiros relatos de ocorrência de estresse oxidativo em ovinos com ARS e laminite, condição que leva desde à danos celulares até alterações sistêmicas, podendo culminar em perdas de índices produtivos, ou até mesmo a perda do animal acometido.

Palavras-chave: biomarcadores, inflamação, metabolismo oxidativo.

## **1. Introdução**

O termo estresse oxidativo é utilizado em circunstâncias na qual a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), também chamadas de radicais livres, resulta em dano tecidual ou em compostos tóxicos aos tecidos. A geração de radicais livres não é somente patológica, mas sim constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo com funções biológicas relevantes (Ferreira e Matsubara, 1997). As EROs atuam como mediadores na transferência de elétrons em várias reações bioquímicas de processos metabólicos. Em proporções adequadas, sua produção possibilita a geração de energia, fertilização do óvulo, ativação de genes, além da participação em mecanismos de defesa durante o processo infecciosos. Porém, em situações onde a produção torna-se excessiva, danos oxidativos podem ocorrer (Sham e Moreira, 2004).

A instalação do processo de estresse oxidativo se dá em função da ocorrência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em diminuição da velocidade de

remoção desses. Tal processo leva à oxidação de biomoléculas, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Haliwell e Whiteman, 2004).

Estudos sobre estresse comprovaram que o aumento na atividade metabólica favorece a ocorrência de lesões oxidativas em biomoléculas (Souza Junior et al., 2005). Algumas patologias associadas ao aumento dos radicais livres já foram pesquisadas, dentre essas câncer, catarata, diabetes, doenças inflamatórias, periodontais, neurológicas, cardiovasculares e renais (Nemec et al., 2000). Em ruminantes as doenças respiratórias e articulares, septicemia, mastite, acidose, cetose e enterite parecem estar associadas ao estresse oxidativo, o que implica em alterações nos índices produtivos e na saúde dos mesmos (Celi, 2011a). Trabalhos realizados na espécie ovina que investigaram o estresse oxidativo em patologias como intoxicação por cobre (Weigel et al., 2010), toxemia da prenhez (Al-Qudah, 2011), lesões hepáticas (Heidarpour et al., 2013), dentre outros, são raros. Em trabalhos realizados com equinos sabe-se que algumas enfermidades são relacionadas ao estresse oxidativo entre elas a obstrução recorrente das vias aéreas, hemorragia pulmonar induzida pelo exercício, laminite, doença do neurônio motor, artrites, enfermidades reprodutivas e miopatias (Dias et al., 2009).

A acidose ruminal subaguda (ARS) ocorre principalmente em animais mantidos em regime de confinamento, com alto consumo de matéria seca e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no rúmen, levando à proliferação das papilas ruminais, absorvendo menos AGCC e aumentando a ocorrência de traumatismos e inflamações ruminais. Os efeitos dessa

enfermidade são crônicos, e a contínua carga ácida pode reduzir a eficiência metabólica e o desempenho geral (Smith, 2006). Trabalhos anteriores relacionam doenças metabólicas, como também processos inflamatórios sistêmicos, (Sordillo e Aiken, 2009; Celi, 2010; Celi 2011b) à ocorrência de estresse oxidativo, diante desse fato o presente estudo teve como objetivo analisar a ocorrência ou não de estresse oxidativo em ovinos submetidos à ARS induzida experimentalmente.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Animais**

O presente trabalho está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) tendo recebido aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp, Câmpus Jaboticabal, sob Protocolo nº 5758/16. Foram utilizadas oito ovelhas adultas, mestiças da raça Santa Inês, híbridas e criadas a campo. Os animais foram mantidos em baias providas de piso de borracha, comedouros e bebedouros, sob as devidas condições de higiene, junto ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Os animais foram alimentados durante 60 dias, antes da indução da ARS, com feno de *Cynodon dactylon* à vontade, dieta nutricionalmente adequada para ovinos em manutenção (Sobrinho et al., 1996), com livre acesso à água potável e mistura mineral.

Os animais foram divididos em dois grupos sendo o grupo controle (GC) com três animais e o grupo indução (GI) com cinco animais. Para indução da

ARS, o GI recebeu dieta, baseada no consumo de matéria seca (MS) do período de adaptação, na qual foram incluídos, diariamente, 10% de alimento concentrado farelado (76,8% de milho moído, 18,2% de farelo de soja e 5% de núcleo mineral e vitamínico), até completar 80% da MS (Brossard et al., 2003; Girardi, 2016), porcentagem mantida até o final dos 30 dias experimentais.

Os animais pertencentes ao GC receberam somente alimento volumoso durante o período experimental. O alimento concentrado e o volumoso foram fornecidos separadamente e à vontade, de uma vez, às 6h30. Na manhã seguinte, as sobras foram pesadas para cálculo do consumo médio diário (kg de matéria orgânica por animal, posteriormente convertido para kg de MS por animal, com base nos resultados das análises bromatológicas), de cada grupo, para cada tipo de alimento. Tal procedimento teve por objetivo garantir a manutenção da ingestão de MS/kg de peso corporal obtido durante o período de adaptação (0,019601643 kg MS/kg de peso corporal para os animais do GC e 0,023506968 kg MS/kg de peso corporal para o GI), ajustando semanalmente o fornecimento do alimento à variação do peso corpóreo dos animais. Os valores basais obtidos foram as médias das análises realizadas 15 dias, sete dias e imediatamente antes da introdução da dieta concentrada.

## 2.2 Estresse oxidativo

As colheitas de sangue venoso foram obtidas antes da introdução do alimento concentrado na dieta (Dia 0) e, diariamente após a alimentação dos animais até o final dos 30 dias experimentais. Os animais permaneceram em posição quadrupedal e as amostras foram obtidas por meio de punção da veia jugular externa após antissepsia da região, utilizando-se tubos plásticos estéreis

contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetrascético dissódico ( $K_2EDTA$  7,2 mg) com capacidade de 4 mL. Imediatamente após a colheita, a amostra foi cuidadosamente misturada ao anticoagulante, virando-se o tudo entre as mãos e acondicionada sob refrigeração por no máximo 30 minutos antes da análise. acondicionados em isopor com gelo reutilizável após a colheita. O plasma sanguíneo foi obtido após centrifugação da amostra à 2500 g durante 5 minutos. Após separação do plasma, o mesmo foi armazenado em tubos tipos Eppendorf em freezer  $-20^{\circ}C$ . A capacidade antioxidante total (TAC) foi determinada pelo método descrito por Erel (2004) e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalente de Trolox/L. A capacidade oxidante total (TOC) foi quantificada pelo método descrito por Erel (2005) e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrogênio equivalente/L. O malondialdeído (MDA) foi o indicador escolhido para a avaliação da peroxidação lipídica (LPO), sendo a mesma determinada pela quantificação das espécies reativas ao tiobarbitúrico (TBARS) segundo método de Hunter et al. (1985), com auxílio de leitora automática de microplacas (Robonik, Elisa Plate Analyser, Índia) e absorvância medida em 540 nm. O índice de estresse oxidativo foi calculado da seguinte forma:  $IEO (\%) = 100 \times [TOC/TAC]$  (Aycicek et al., 2005).

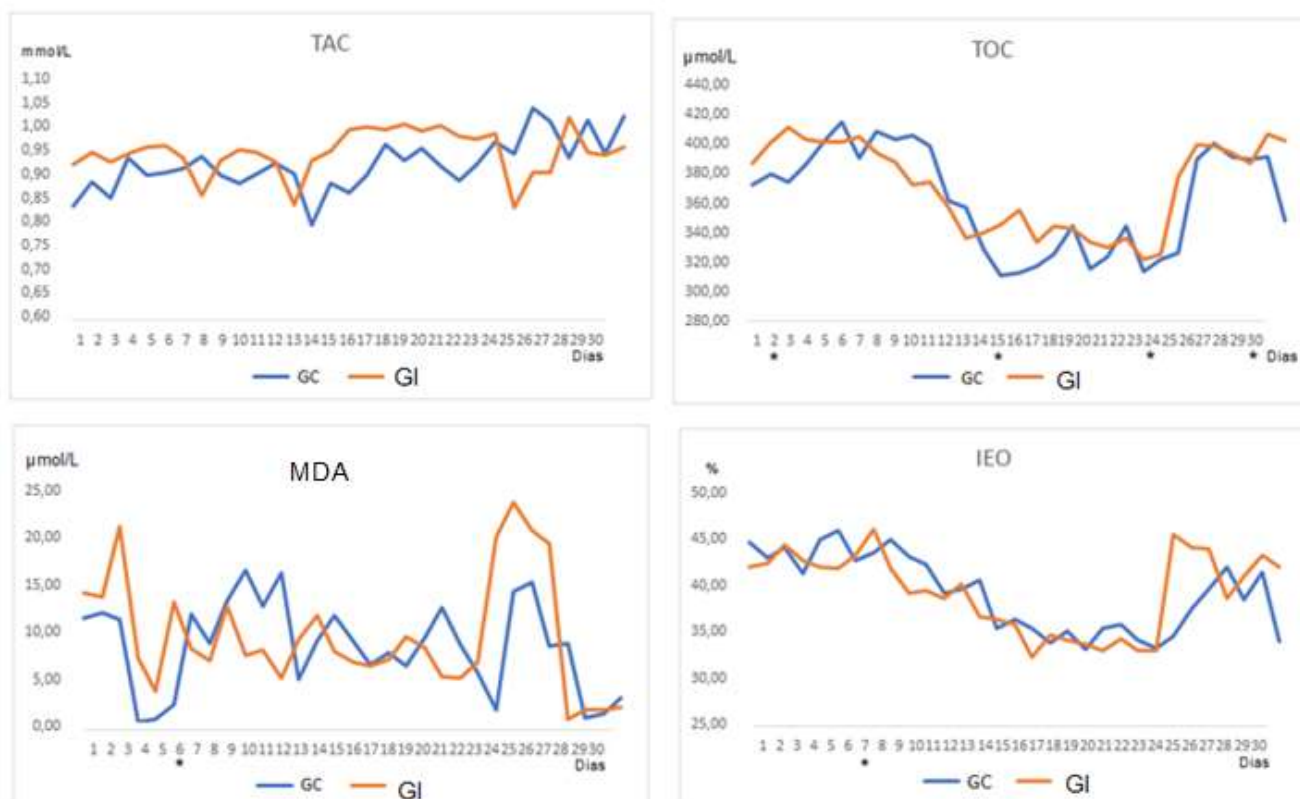
### 2.3 Análise estatística

Foi utilizado o software de análise estatística SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) para análise das variáveis, o método empregado foi a análise de variância com medidas repetidas, além de comparações de médias aos pares. Pelo teste F foi realizado o desdobramento dos grupos através dos tempos, com nível de significância adotado de 5%.

### 3. Resultados

As médias do pH ruminal dos animais do GI, durante vinte e quatro horas ( $6,11 \pm 0,20$ ), apresentaram diferença significativa quando comparado com as médias do pH ruminal das ovelhas do GC ( $6,57 \pm 0,16$ ). Os dias experimentais que diferiram do GC foram segundo, quarto, quinto, sexto e do oitavo ao 30º dia de fornecimento de dieta concentrada. Os menores valores de pH ruminal do GI se concentraram do oitavo até o 17º dia após a indução da doença, ou seja, desde o início da dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de alimento volumoso, mostrando que o método de indução de ARS foi eficaz nos animais do GI.

Não ocorreu diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as médias do GC e GI em relação à TAC. Já os dias 2, 15, 24 e 30 referentes à variável TOC diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre as médias do GC e GI. Com relação ao MDA, somente o momento 6 apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e o IEO apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no momento 7 na comparação entre os grupos. Na Figura 01 estão as representações gráficas das variáveis analisadas.



**Fig 01:** gráficos resultantes das médias obtidas das variáveis oxidativas e antioxidativas de ovinos pertencentes aos grupos controle (GC) e indução (GI), submetidos à indução experimental de acidose ruminal subguda (ARS) Capacidade antioxidante total (TAC - mmol/L); Concentração de oxidantes total (TOC - µmol/L); Malondialdeído (MDA - µmol/L) e Índice de estresse oxidativo (IEO - %) O \* presente no eixo x de cada gráfico indica os momentos em que ocorreu diferença significativa entre o GC e GI pelo Teste F. Jaboticabal, 2019.

#### 4. Discussão

Na medicina veterinária, as causas mais investigadas de excesso de produção de EROs, resultando posteriormente em estresse oxidativo, são em doenças metabólicas e ambientais (Celi, 2010; Celi 2011b), e também em processos inflamatórios (Sordillo e Aiken, 2009). Estudos anteriores demonstraram alterações nos teores de TOC, TAC e IEO nos casos de inflamação local ou sistêmica e também em processos infecciosos (Celi e Gabai, 2015) o que corrobora os dados obtidos no presente trabalho, ao avaliar ovinos com ARS e laminite. A grande maioria dos trabalhos compilados avaliaram a

presença do estresse oxidativo em bovinos leiteiros, principalmente nos períodos compreendendo o peri-parto e o pós-parto imediato (Gabai et al., 2004; Bernabucci et al., 2005; Castillo et al., 2005).

Ghiselli et al (2000). citam a avaliação e mensuração de agentes antioxidantes de forma individual como o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) principalmente, porém tornam-se menos eficientes ao se analisar somente uma fração de forma independente, portanto a mensuração da quantidade total de antioxidantes pode ser considerada mais adequada. Não houve diferença significativa da TAC na comparação entre o GC e o GI, porém observou-se diminuição nos teores de TAC nos animais pertencentes ao GI durante vários momentos, com maior notoriedade nos dias 8, 12 e 25.

A diminuição na TAC pode ser associada com o efeito de se tentar combater as substâncias oxidantes liberadas durante o processo inflamatório, mecanismo observado em vacas lactantes após sobrecarga de carboidratos dietéticos e, com aumento posterior do metabolismo (Goff e Horst, 1997), e na análise do leite de vacas com mastite subclínica (Atakisi et al., 2010), corroborando os dados obtidos no presente trabalho, pois ao se analisar os níveis de TAC ao longo do período, os mesmos apresentaram diversos momentos em que os níveis de TOC estavam aumentados e os de TAC diminuídos, como nos dias 8, 13, 25 e 30. Os agentes antioxidantes SOD, CAT e GPx estão envolvidos na neutralização das EROs e com isso ocorre a queda nos teores da TAC, provavelmente em decorrência da diminuição ou até mesmo exaustão dos agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Kirbas et al., 2014).

Sistemas extensivos de criação animal podem auxiliar na melhora do status oxidativo dos animais, graças aos elevados teores de substâncias antioxidantes em gramíneas, pela composição de vitaminas e minerais presentes nas mesmas (Talukder et al., 2015). Em decorrência da participação das EROs e antioxidantes presentes em diversas funções fisiológicas, sugere-se que a suplementação da dieta dos animais com antioxidantes seja benéfica (Celi, 2010). Em estudos realizados em animais com mastite, já foi evidenciado o importante papel da nutrição na prevenção dessa patologia (Erskine, 1993; Bowers, 1997; Weiss et al., 1997; Scaletti et al., 2003). A suplementação na dieta de vacas com mastite clínica pode diminuir a duração, incidência e severidade da doença (Smith et al., 1984), o que é sugerido para os animais do GI do presente estudo ao apresentarem os níveis de TAC inferiores aos animais do GC. Sabe-se que o selênio é um elemento essencial na dieta dos animais e também um importante agente de defesa antioxidante (Rivera et al., 2005). Pesquisas mostraram que o selênio total presente no sangue sofre diminuições em ovinos com foot-rot, e que a suplementação via intravenosa acelerou a recuperação dos animais (Hall et al., 2009).

No presente trabalho nota-se que os animais pertencentes ao GI apresentaram níveis aumentados de TOC em diversos momentos em comparação aos animais do GC, alterações essas concentrando-se principalmente no início da adaptação do alimento concentrado na dieta e ao final do período, entre os dias 24 e 29. Em vacas leiteiras, a gestação e lactação são estágios fisiológicos considerados indutores de estresse metabólico (Drackley, 1999). Nesses animais, o estresse oxidativo pode estar presente (Pedernera et al., 2009; Bernabucci et al., 2005; Castillo et al., 2006), o que está

associado com doenças metabólicas durante o período de peri-parto e pós-parto imediato (Miller et al., 1993). Ao avaliarmos outras patologias inflamatórias como a própria ARS e laminite posteriormente, a ocorrência de estresse oxidativo pode estar presente nos mais variados graus. Atakisi et al. (2010) ao avaliarem o leite de vacas com mastite subclínica obtiveram resultados superiores de TOC em relação aos animais saudáveis, levando ao aumento da produção de EROs no leite, resultados semelhantes aos obtidos nesse trabalho.

Nos animais do presente estudo, ocorreram alterações nos valores de TOC durante todo o período, porém o que se nota é a falta de valores críticos de corte para os biomarcadores de estresse oxidativo tanto para ovinos, quanto para bovinos (Sordillo e Mavangira, 2014; Abuelo et al., 2015). A literatura compilada não apresenta intervalos de referência para os biomarcadores de estresse oxidativo ou quais técnicas deveriam ser utilizadas para detectar alterações mais sensíveis nos biomarcadores. Alguns estudos examinaram a relação entre o status oxidativo e a claudicação, determinando que o estresse oxidativo estava presente quando os animais já apresentavam sinais clínicos, porém não é sabido se o estresse oxidativo foi a causa ou a consequência da claudicação (Abuelo et al., 2015). Os aumentos da TOC nos animais do GI podem ter sido em decorrência das alterações provocadas tanto pela ARS quanto pelo quadro de laminite que os mesmos apresentaram, ocorrendo dor e/ou desconforto além de episódios de claudicação entre os dias 11 e 17 do período. Porém, como foi discutido no capítulo referente à avaliação da laminite por meio de termografia infravermelha podal, os animais do GI apresentaram diversos momentos de ocorrência de laminite mesmo sem ocorrência da manifestação clínica. O aumento do status pró-oxidante nesses animais poderia

aumentar potencialmente os mediadores pró-inflamatórios presentes no tecido laminar, levando à ocorrência de laminite.

Sugere-se que os animais que apresentam sinais de lesões nos cascos possuem um status oxidante maior em relação aos animais saudáveis, sendo que o desenvolvimento do estresse oxidativo nos casos de claudicação ocorre próximo ao aparecimento dos sinais clínicos ou somente seria uma consequência do processo inflamatório instalado associado à injúria tecidual do casco (Abuelo et al., 2015). Em estudo realizado em vacas leiteiras com lesões podais (Al-Qudah e Ismail, 2012), os animais apresentaram status pró-oxidante sistêmico aumentado em comparação aos animais sadios no momento do diagnóstico das afecções, corroborando os dados obtidos no presente trabalho. Uma dúvida presente a respeito desse assunto baseia-se na ocorrência de alterações na microvasculatura do casco, em decorrência da instalação de um status oxidativo sistêmico. Não se sabe se o estresse oxidativo presente se deve pela ocorrência de ARS, ou pela laminite, ou por ambos já que a mesma é considerada um processo sistêmico com reflexos nos dígitos (Greenough, 2007). Sugere-se a avaliação do estresse oxidativo do próprio tecido laminar, porém a realização de biópsias seriadas em ovinos não pode ser efetuada como ocorre nas espécies bovina e equina, em virtude da estrutura frágil e do tamanho reduzido dos cascos desses animais.

A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação das EROs sobre os lípidos insaturados presentes nas membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (Benzie, 1996). A LPO resulta na produção de vários produtos, sendo o MDA

(malondialdeído) o indicador mais utilizado como marcador do aumento do estresse oxidativo em tecidos (Gawel et al., 2004; Vasconcelos et al., 2007), sendo o mesmo utilizado para análise. No presente trabalho, os níveis de MDA apresentaram variações durante o período experimental, porém com marcantes aumentos entre os dias 1 e 3 e também 23 e 27. Yin et al. (2009) em estudo realizado com equinos, demonstraram que a LPO ocorre durante a fase prodrômica e aguda da laminite induzida pelo extrato de noqueira preta. Em casos de laminite endocrinopática o estresse oxidativo tem sido estudado em equinos com laminite induzida pela insulina, pois os produtos finais de glicação avançada causam liberação de mediadores inflamatórios, levando a ocorrência de estresse oxidativo (De Laat et al., 2012).

Joshi et al. (2017) ao avaliar a LPO de cabras com acidose láctica ruminal aguda (ALRA), encontraram níveis superiores de MDA no sangue dos animais doentes em relação aos animais controle, com concomitante redução nos valores da TAC, ocorrendo o mesmo no presente estudo. A ALRA foi associada com a produção excessiva de EROs e ocorrência de estresse oxidativo, sugerido pelo aumento nas concentrações do MDA e diminuição nas atividades dos agentes antioxidantes, sendo observadas as mesmas alterações no presente estudo. Níveis elevados de MDA podem ser atribuídos à extensiva fermentação dos carboidratos, como ocorre na ALRA (Joshi, et al., 2017) e em menor grau de fermentação na ARS. Em trabalhos realizados em vacas com babesiose, o aumento dos teores de MDA foram acompanhados pela diminuição dos níveis de antioxidantes (Salem et al., 2016), semelhante ao encontrado em ovelhas com ARS.

Em estudos realizados em bovinos leiteiros com mastite, ocorreu aumento na LPO, levando a diminuição nos níveis de moléculas antioxidantes (Goff et al., 1996; Komine et al., 2004; Weiss et al., 2004). Acredita-se que em outras patologias inflamatórias o mesmo possa ocorrer, como nos casos de ARS e laminite. Em bovinos leiteiros notou-se aumento nos níveis de MDA em animais claudicantes em comparação a animais saudáveis (Al-Qudah e Ismail, 2012), também observado com os dados obtidos no presente estudo ao se avaliar os casos de claudicação em decorrência de laminite após quadro de ARS nos animais pertencentes ao GI.

Os valores calculados de IEO evidenciaram vários momentos em que os animais pertencentes ao GI apresentaram níveis superiores dessa variável em relação aos animais do GC, principalmente entre os dias 5 e 7, e nos dias 24 e 28, evidenciando que os animais com ARS e laminite apresentaram níveis superiores de EROs e queda na TAC, indicando que o IEO pode ser utilizado como indicativo de status de saúde (Talukder et al., 2015). Quando o valor de IEO está alto, é esperado diminuição na higidez e condições de bem-estar no animal afetado, resultando em diminuições de adaptação para desafios ambientais (Talukder et al., 2015). Valores aumentados de IEO também foram observados em potros com afecções respiratórias (Crowley et al., 2013; Po et al., 2013). Pedernera et al. (2010) relataram que a análise do IEO calculado apresenta maior acurácia em relação à análise separada das EROs e agentes antioxidantes, preconizando o uso dessa variável.

## **5. Conclusões**

Afecções como a ARS e laminite levam a alterações nos marcadores relacionados à liberação de EROs e, conseqüente ocorrência de estresse oxidativo, como o aumento nos valores de TOC, LPO e IEO, além da diminuição na TAC. O estresse oxidativo foi coincidente aos momentos em que os animais apresentaram sinais clínicos de laminite, tornando-se um importante parâmetro para avaliação da higidez. Assim, a suplementação da dieta com elementos antioxidantes, a fim de se prevenir as lesões relacionadas ao estresse oxidativo tanto no tecido laminar quanto lesões sistêmicas, pode ser de fundamental importância para o bem estar animal.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio regular (Processo: 2016/16631-8).

## **Declaração de conflitos de interesses**

Os autores declaram que não ocorreram conflitos de interesses.

## **6. Referências**

Abuelo, A., Hernandez, J., Benedito, J.L., Castillo, C. 2015. The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 99, 1003 - 1016 <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12273>.

Al-Qudah, K.M. 2011. Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. *Vet Clin Path.* 40, 1, 60-65. <http://DOI:10.1111/j.1939-165X.2011.00284.x>.

Al-Qudah, K.M., Ismail, Z.B., 2012. The relationship between serum biotin and oxidant/antioxidant activities in bovine lameness. *Res Vet Sci*, 92, 138 - 141. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.017>.

Atakisi, O., Oral, H., Atakisi, E., Merhan, O., Pancarci, S. M., Ozcan, A., Marasli, S., Polat, B., Colak, A., Kaya, S. 2010. Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. *Res Vet Sci*, 89, 1, 10 – 13. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.01.008>.

Aycicek, A., Erel, O., Kocyigit, A. 2005. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr. Int.* 47, 635 – 639. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200x.2005.02137.x>

Benzie, I.F.F. 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int J Food Sci Nut*, 47, 233-261.

Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A. 2005. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 88, 2017 – 2026. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72878-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72878-2).

Bowers, T.L. 1997. Nutrition and immunity part 2: The role of selected micronutrients and clinical significance. *Vet Clin Nutr*, 4, 96 - 101.

Brossard, L., Martin, C., Michalet-Doreau, B. 2003. Ruminal fermentative parameters and blood acid-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. *An. Res.*, 52, 513-530. <http://dx.doi.org/10.1051/animres:2003036>.

Castillo, C., Hernandez, J., Bravo, A., Lopes-Alonso, M., Pereira, V., Bedito, J.L. 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet J*, 169, 286 – 292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.02.001>.

Castillo, C., Hernandez, J., Valverde, I., Pereira, V., Sotillo, J., Alonso, M.L., Bedito, J.L. 2006. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res Vet Sci*, 80, 133 – 139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.06.003>.

Celi, P., 2010. The role of oxidative stress in small ruminants health and production. *Rev. Bras. de Zootec.* 39, 348–363. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300038>.

Celi, P., 2011a. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 33, 233–240. <https://doi.org/10.3109/08923973.2010.514917>.

Celi, P., 2011b. Oxidative stress in ruminants. In: Mandelker, L., Vajdovich, P (Eds.), Studies on Veterinary Medicine. Humana Press, New York, 191–231.

Celi, P., Gabai, G. 2015. Oxidant/antioxidante balance in animal nutrition and health: the role of protein extration. *Front Vet Sci*, 2, 1 – 14. <http://10.3389/fvets.2015.00048>.

Crowley, J., Po, E., Celi, P., Muscatello, G., 2013. Systemic and respiratory oxidative stress in the pathogenesis and diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Eq Vet. J.* 45, 20–25. [http:// DOI:10.1111/evj.12166](http://DOI:10.1111/evj.12166).

De Laat, M.A., Kyaw-Tanner, M.T., Sillence, M.N., McGowan, C.M., Pollitt, C.C. 2012. Advanced glycation end products in horses with insulin-induced laminitis. *Vet Immun Immunopath*, 145, 395 - 401. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.12.016>.

Dias, D.C.R., Rocha, J.S., Gusmão, A.L., El-Bachá, R.S., Ayres, M.C.C. 2009. Efeito da suplementação com vitamina E selênio sobre o quadro hematológico, enzimas marcadoras de lesão muscular e índice de peroxidação de biomoléculas em equinos submetidos à atividade de salto. *Cien An Bras*, 10, 3, 790-801.

Drackley, J.K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier. *J Dairy Sci*, 82, 2259 - 2273.

Erel, O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Bioch*, 4, 277-285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>.

Erel, O. 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Bioch*, 38, 12, 1103 - 1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>.

Erskine, R.J. 1993. Nutrition and mastitis. Update on bovine mastitis. *Vet Clin North Am: Food An Pract*, 9, 551 – 556.

Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*, 43, 1, 61-68. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>.

Gabai, G., Testoni, S., Piccinini, R., Marinelli, L., Howard, C.M., Stradaoli, G. 2004. Oxidative stress in primiparous cows in relation to dietary starch and the progress of lactation. *An Sci*, 79, 1, 99 – 108. <https://doi.org/10.1017/S1357729800054576>.

Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P., 2004. MDA as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek*, 57, 453 – 455.

Girardi, A.M. 2016. Acidose ruminal subaguda em ovinos santa inês: estudo clínico, laboratorial e avaliação da laminite por termografia infravermelha e

radiologia digital (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data *Free Radic. Biol Med*, 29,1106 – 1114.

Goff, W.L., Johnson, W.C., Wyatt, C.R., Cluff, C.W. 1996. Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-dependent nitric oxide production. *Vet Immun Immunopath*, 55, 1, 45 – 62. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05629-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05629-2).

Goff, J.P., Horst, R.L. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci*, 80, 1260 – 1268.

Greenough, P. 2007. *Bovine Laminitis and Lameness*. Philadelphia. W. B. Saunders, USA, 319p.

Hall, J.A., Bailey, D.P., Thonstad, K.N., Van Saun, R.J., 2009. Effect of parenteral selenium administration to sheep on prevalence and recovery from footrot. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 352–358. [http:// doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0253.x](http://doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0253.x).

Halliwell, B., Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 142, 2, 231-255. <http://10.1038/sj.bjp.0705776>.

Heidarpour, M., Ennaifer, E., Ahari, H., Srairi-Abid, N., Borchani, L., Khalili, G., Amini, H., Anvar, A.A., Boubaker, S., El-Ayeb, M., 2013. Histopathological changes induced by *Hemiscorpius lepturus* scorpion venom in mice. *Toxicon* 59, 373–378. [http:// DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.12.011](http://DOI:10.1016/j.toxicon.2011.12.011)

Hunter, M. I., Nlemadim, B. C., Davidson, D. L. 1985. Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Neuroch Res*, 10, 12, 1645–1652.

Joshi, V., Dimri, U., Ajith, Y., Alam, S., Gupta V., K., Raguvaran, R. 2017. Evaluation of oxidant-antioxidant status, sérum cytokine levels and some cardiac injury biomarkers in acute ruminal acidosis in goats. *Small Rum Res*, 149, 6 – 10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.01.003>.

Kirbas, A., Yildirim, B.A., Baydar, E., Kandemir, F.M., 2014. Status of lipidperoxidation and some antioxidants in sheep with acute ruminal lactic acidosis. *Med Weter*, 70, 357–361.

Komine, K., Toshinobu, K., Komine, Y. Kouichi, W., Jin, K., Takahiro, Y., Shin-ichi, K., Katsuo, K. 2004. Induction of nitric oxide production mediated by tumor necrosis factor alpha on Staphylococcal enterotoxin C-stimulated bovine

mammary gland cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11, 1, 203 – 210. <http://10.1128/CDLI.11.1.203-210.2004>.

Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84, 407 - 412. <http://10.1042/cs0840407>.

Nemec, A., Drobnic-Kosorok, M., Skitek, M., Pavlica, Z., Galac, S., Butinar, J., 2000. Total antioxidant capacity (TAC) values and other correlation with individual antioxidants in serum of healthy beagles. *Acta Vet Brno*, 69, 297–303.

Pedernera, M., Celi, P., García, S.C., Salvin, H.E., Barchia, I., Fulkerson, W.J., 2009. Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture. *Vet J*, 186, 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.09.003>.

Po, E., Williams, C., Muscatello, G., Celi, P., 2013. Assessment of oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate and blood of thoroughbred foals. *Vet J*, 196, 269–271. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.08.018>.

Rivera, M.T., Souza, A.P.D., Araujo-Jorge, T.C., De Castro, S.L., Vanderpas, J., 2005. Trace elements, innate immune response and parasites. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 1020 - 1025. <http://10.1515/CCLM.2003.156>.

Salem, N.Y., Yehia, S.G., Farag, H.S., Elkhiat, M.A. 2016. Clinical, hemato-biochemical alterations and oxidant-antioxidant biomarkers on Babesia-infected calves. *Int J Vet Sci Med*, 4, 17 – 22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijvsm.2016.10.003>.

Scaletti, R.W., Trammell, D.S., Smith, B.A. Harmon, R.J. 2003. Role of dietary copper in enhancing resistance to escherichia coli mastitis. *J Dairy Sci*, 86, 1240 - 1249. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73708-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73708-4).

Shami, N.J.I.E., Moreira, E.A.M. 2004. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr*. 17, 2, 227-236. <http://10.1590/S1415-52732004000200009>.

Smith, K.L., Harrison, J.H., Hancock, D.D. Todhunter, D.A., Conrad, H.R. 1984. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J Dairy Sci*, 67, 1293 - 1300. [http://10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81436-8](http://10.3168/jds.S0022-0302(84)81436-8).

Smith, B. P. 2006. Alterations in alimentary and hepatic function. In: Smith, B. P. *Large An Med*. 4. ed. Saint Louis: Mosby Elsevier, 2006. p. 96-169.

Sobrinho, A. G. S., Batista, A. M. V., Siqueira, E. R., Ortolani, E. L., Susin, I., Silva, J. F. C., Teixeira, J. C., Borba, M. F. S. 1996. *Nutrição de ovinos*. Jaboticabal: FUNEP, 258p.

Sordillo, L.M., Aitken, S.L., 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immuno. Immunopathol*, 128, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.305>.

Sordillo, L.M., Mayangira, V. 2014. The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows. *Anim Prod Sci*, 54, 1204 – 1214. <http://dx.doi.org/10.1071/AN14503>.

Souza Junior, T.P., Oliveira, P.R., Pereira, B. 2005. Exercício físico e estresse oxidativo: Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. *Rev Bras Med Esp*, 11, 1, 91-96.

Talukder, S., Gabai, G., Celi, P. 2015. The use of digital infrared thermography and measurement of oxidative stress biomarkers as tools to diagnose foot lesions in sheep. *Small Rum Res*, 127, 80-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.04.006>.

Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.F., Benfato, V.M., Kubota, L.T. 2007. Espécies reativas do oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores do dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quimica Nova*, 30, 5, 1323 – 1338.

Weigel R.A., Ortolani, E.L., Sucupira, M.C.A 2010. Assessment of the oxidative metabolism of sheep poisoned with copper and treated with tetrathiomolybdate

associated or not with antioxidant vitamins. *Braz J Vet Res Anim Sci* 47,6, 421-428.

Weiss, W.P., Hogan, J.S., Todhunter, D.A., Smith, K.L. 1997. Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *J Dairy Sci*, 80, 1728-1737.

Weiss, W.P., Hogan, J.S., Smith, K.L. 2004. Changes in Vitamin C Concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *J Dairy Sci*, 87, 32 - 37.

Yin, C., Pettigrew, A., Loftus, J.P., Black, S.J., Belknap, J.K. 2009. Tissue concentrations of 4-HNE in the black walnut extract model of laminitis: Indication of oxidant stress in affected laminae. *Vet Immun Immunopath*, v, 129, p. 211-215, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.016>.

**Hightlights**

- avaliação do estresse oxidativo em ovinos com acidose ruminal subaguda e laminite
- aumento nos parâmetros relacionados à liberação de fatores oxidantes nos animais pertencentes ao grupo indução
- o estresse oxidativo foi coincidente aos momentos em que os animais apresentaram sinais clínicos de laminite

## **Capítulo 4 – Metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores teciduais em ovinos submetidos à acidose ruminal subaguda<sup>1</sup>**

Amanda Festa Sabes<sup>1\*</sup>, Annita Morais Girardi<sup>1</sup>, Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha<sup>2</sup>, RONALDA SILVA DE ARAÚJO<sup>2</sup>, Fabiana Toshie de Camargo Konno<sup>2</sup>, Gabriela Marchiori Bueno<sup>1</sup>, Tiago José Caparica Módulo<sup>1</sup>, Daniela Gomes da Silva<sup>1</sup>, Luiz Carlos Marques<sup>1</sup>.

1 - Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP/Jaboticabal.

\*Autor para correspondência: [amanda.festa@hotmail.com](mailto:amanda.festa@hotmail.com)

2 – Departamento de Patologia Experimental e Ambiental. Universidade Paulista – UNIP/São Paulo.

Resumo: a acidose ruminal subaguda (ARS) é conhecida por ser uma das causas mais comuns de laminite em ruminantes. Teorias foram formuladas tentando explicar qual é o mecanismo responsável pela ocorrência da laminite após quadro de ARS, porém não foi obtido sucesso. A teoria de liberação sistêmica de metaloproteinases (MMPs) 2 e 9 e da participação dos inibidores teciduais (TIMPs) para o dígito é utilizada principalmente em trabalhos com a espécie equina, após ocorrência de abdômen agudo induzido por sobrecarga de carboidratos na dieta. Esse estudo teve como objetivo avaliar a expressão das MMPs 2 e 9 e dos TIMPs 1 e 2 em ovinos com ARS induzida experimentalmente. Foram utilizadas oito ovelhas adultas, sendo três animais alocados no grupo controle (GC) e cinco no grupo indução (GI), o qual recebeu dieta com alta proporção de alimento concentrado durante 30 dias. Amostras de sangue venoso foram obtidas diariamente para avaliação zimográfica e testes de ELISA. Todos os animais do GI apresentaram diminuição do pH ruminal compatível com

---

<sup>1</sup> O presente capítulo foi redigido conforme as normas da revista "Research in Veterinary Science" e será enviado para publicação.

o quadro de ARS e ocorrência de laminite em diversos momentos, porém somente foi encontrada a forma pró ativa da MMP 2, com importantes aumentos nos dias 6 e 11, momentos que ocorreram a manifestação clínica de laminite pelos animais do GI. Os TIMPs 1 e 2 foram detectados ao longo de todo o período experimental, concentrando as alterações entre os dias 8 e 30 para a TIMP 1 e a partir do dia 20 para a TIMP 2, momentos esses que os animais do GI apresentaram laminite clínica. A ativação das MMPs pode ter sido bloqueada pelos elevados teores encontrados dos TIMPs 1 e 2, sugerindo a avaliação de outras proteases relacionadas à danos laminares.

Palavras-chave: membrana extracelular; inflamação; laminite, zimografia.

## **1. Introdução**

As metaloproteinases (MMPs) constituem uma família de mais de 20 metaloenzimas e são responsáveis por clivar componentes da matriz extracelular (MEC), liberando fragmentos com atividades biológicas que alteram estas funções. São secretadas na forma latente como pró-enzimas e requerem ativação por meio da clivagem proteolítica do domínio amino-terminal rico em cisteína, além da conhecida dependência de zinco para sua atividade (McCawley e Matrisian, 2000). As MMPs apresentam diferenças em sua estrutura e são classificadas de acordo com o substrato e a organização do domínio catalítico. Dentre todos os grupos existentes, as MMP-2 e MMP-9 fazem parte do grupo das gelatinases, apresentam domínio adicional semelhante à fibronectina, sendo responsáveis pela ligação das enzimas ao colágeno desnaturado e à gelatina (Opdenakker et al., 2001a; Geurts et al., 2011).

As MMPs são conhecidas por degradar componentes proteicos da MEC, além de participar em vários processos fisiológicos como angiogênese, reparação tecidual, morfogênese, mobilização de células tronco e cicatrização de feridas (Nagase et al., 2006; Geurts et al., 2011). Durante esses processos, a atividade das MMPs está sob estreito controle combinando ativação e inibição. Os níveis de expressão das MMPs são regulados por fatores genéticos e epigenéticos, bem como por hormônios, fatores de crescimento, citocinas e interações célula-célula e célula-matriz, além de inibidores fisiológicos endógenos (Kupai et al., 2010; Geurts et al., 2011). Dentre os inibidores endógenos conhecidos, os principais são os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Nagase et al., 2006; Geurts et al., 2011).

Brew e Nagase (2010), citaram que o genoma humano possui 4 genes que codificam os TIMPs (TIMP-1 a 4) (Brew e Nagase, 2010). Em teoria, todos os TIMPs são capazes de inibir os mais de 20 diferentes tipos de MMPs, porém diferenças na especificidade entre eles são encontradas (Brew e Nagase, 2010). Os TIMPs se ligam às pró-MMPs por meio da ligação de seu domínio C-terminal com o domínio hemopexina da pró-enzima. Essa interação é relativamente específica, sendo que o TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 se ligam à MMP-2, e TIMP-1 e TIMP-3 à MMP-9 (Manello e Medda, 2012). Variações no equilíbrio entre as MMPs e TIMPs foram estudadas em patologias associadas com alterações da MEC, como nas artrites, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas e também no câncer, levando à maior degradação da MEC, facilitando a invasão tecidual e, em alguns casos, metástase (Nagase e Woessner, 1999; Stamenkovic, 2000).

Os ruminantes são susceptíveis a casos de acidose ruminal, entre elas a forma subaguda (ARS), ocorrendo fermentação exacerbada dos carboidratos presentes no concentrado empregado na dieta. Nesse quadro, ocorre aumento da produção dos ácidos graxos de cadeia curta, em especial do ácido propiônico, alterando os valores do pH ruminal, mantendo-o entre 5,2 a 5,6. O sintoma mais evidente é a diminuição na ingestão de alimentos ou em alguns casos anorexia, além da ocorrência de diarreia. Os animais acometidos podem apresentar laminite além de perda de condição corporal (Ortolani, 2009). A ARS e a laminite são doenças presentes nos rebanhos de todo o país, levando a perdas econômicas que vão desde a diminuição da produção de carne e leite, até casos mais graves culminando com a perda do animal. Diante do quadro inflamatório que ocorre nos animais com ARS e posteriormente com laminite, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a expressão das MMPs 2 e 9 e dos TIMPs 1 e 2 em ovinos submetidos à ARS induzida experimentalmente.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Animais**

O presente trabalho está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e tendo recebido aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp Câmpus Jaboticabal, sob Protocolo nº 5758/16. Foram utilizadas oito ovelhas adultas, híginas e criadas a campo. Os animais foram mantidos em baias providas de piso de borracha, comedouros e bebedouros, sob as devidas condições de higiene, junto ao Laboratório de Apoio

à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Unesp Câmpus de Jaboticabal. Os animais foram alimentados durante 60 dias, antes da indução da ARS, com feno de *Cynodon dactylon* à vontade, dieta nutricionalmente adequada para ovinos em manutenção (Sobrinho et al., 1996), com livre acesso à água potável e mistura mineral.

Os animais foram divididos em dois grupos sendo o grupo controle (GC) com três animais e o grupo indução (GI) com cinco animais. Para indução da ARS, o GI recebeu dieta, baseada no consumo de matéria seca (MS) do período de adaptação, na qual foram incluídos, diariamente, 10% de alimento concentrado farelado (76,8% de milho moído, 18,2% de farelo de soja e 5% de núcleo mineral e vitamínico), até completar 80% da MS (Brossard et al., 2003; Girardi, 2016), porcentagem mantida até o final dos 30 dias experimentais. Os animais pertencentes ao GC receberam somente alimento volumoso durante o período experimental. O alimento concentrado e o volumoso foram fornecidos separadamente e à vontade, de uma vez, às 6h30. Na manhã seguinte, as sobras foram pesadas para cálculo do consumo médio diário (kg de matéria orgânica por animal, posteriormente convertido para kg de MS por animal, com base nos resultados das análises bromatológicas), de cada grupo, para cada tipo de alimento. Tal procedimento teve por objetivo garantir a manutenção da ingestão de MS/kg de peso corporal obtido durante o período de adaptação (0,019601643 kg MS/kg de peso corporal para os animais do GC e 0,023506968 kg MS/kg de peso corporal para o GI), ajustando semanalmente o fornecimento do alimento à variação do peso corpóreo dos animais. Os valores basais obtidos foram as médias das análises realizadas 15 dias, sete dias e imediatamente antes da introdução da dieta concentrada.

## 2.2 Análise zimográfica

As colheitas de sangue venoso foram obtidas antes da introdução do alimento concentrado na dieta (Dia 0) e, diariamente após a alimentação dos animais até o final dos 30 dias experimentais. Os animais permaneceram em posição quadrupedal e as amostras foram obtidas por meio de punção da veia jugular externa após antissepsia da região, utilizando-se tubos plásticos estéreis sem anticoagulante, com capacidade de 10 mL. Imediatamente após a colheita, a amostra foi acondicionada sob refrigeração por no máximo 30 minutos antes da análise. O soro sanguíneo foi obtido após centrifugação do sangue total à 2500 g durante 10 minutos. As frações de soro foram acondicionadas em tubos tipo eppendorf e mantidas em freezer -20°C para a zimografia e em freezer -80°C para as análises dos TIMPS 1 e 2.

A zimografia foi realizada segundo o método descrito por Melo et al. (2011), sendo as amostras de soro sanguíneo, submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida copomerizada a 10% utilizando-se sistema vertical. Para o preparo do gel utilizaram-se 4,1mL de gelatina tipo A (1mg/mL), 3,3mL de acrilamida/bisacrilamida (30:0,8), 2,5mL de tris-HCl pH 8,8 (1M), 40µL de SDS (0,4%), 40 µL de PSA e a polimerização foi possível pela adição de 20µL de N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED). As placas de vidro contendo os géis foram alocadas em cuba específica com tampão de corrida. Este tampão é constituído por 30,2g de tris base 250mM, 144g de glicina 1,92M, 10g de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1000mL de água destilada. Ato contínuo, as amostras foram pipetadas e a corrida eletroforética iniciada, permanecendo durante duas horas a 125V e 80mA.

Após a corrida eletroforética, os géis foram lavados em solução Triton X-100 (2,0%) por 30 minutos a temperatura ambiente, sob constante agitação, seguido de incubação em tampão de ativação enzimática pH 7,6 (6,057g de Tris 50mM; 1,11g de  $\text{CaCl}_2$  10mM; 0,65g de  $\text{NaN}_3$  10 Mm; 2g de Brij5® 35% e 1000mL de água destilada) por 20 horas em banho-maria a 37°C. Em seguida, foram corados pela solução azul de Comassie 0,5% (1g de azul de Comassie R250 0,5% e 200mL de solução fixadora) por 20 minutos sob agitação. A solução fixadora e também descorante, é constituída de 500mL de álcool metílico, 100mL de ácido acético glacial e 400mL de água destilada. Após a coloração, os géis foram descorados por 30 minutos, também sob constante agitação. Na sequência, os géis foram fotografados em alta resolução, empregando-se fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000, GE), sendo as bandas analisadas por densitometria para a comparação dos dados obtidos nos diferentes momentos. Assim, as imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ 1.46r (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, EUA - <http://rsb.info.nih.gov/ij>), utilizando o método da densidade integrada (expresso em unidade arbitrária). Para normalização entre os géis, foi utilizada amostra de líquor de cães infectados com vírus da cinomose.

### 2.3 Inibidores teciduais das MMPs

As amostras de soro sanguíneo armazenadas em freezer -80°C foram submetidas as análises de ELISA (Enzyme-Linked Immunonorbent Assay) através de kits comerciais específicos para a espécie ovina (Cloud-Clone Corp., Katy, Tx, USA). As placas tiveram sua leitura realizada em leitor de microplacas

de ELISA (iMark Microplate Reader, Bio-rad, Japão Microplate Reader MRX, Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, USA) à 450 nm.

#### 2.4 Análise estatística

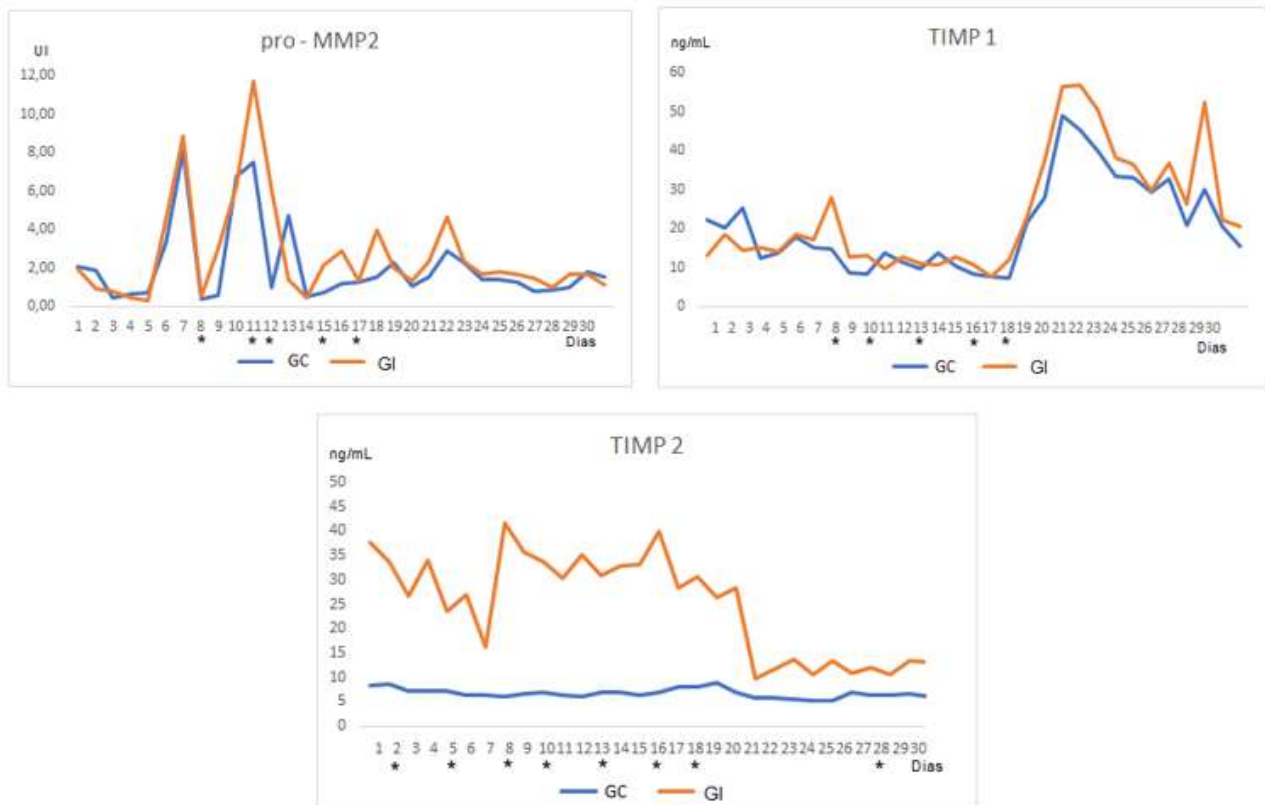
Foi utilizado o software de análise estatística SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) para análise das variáveis, o método empregado foi a análise de variância com medidas repetidas, além de comparações de médias aos pares. Através do teste F foi realizado o desdobramento dos grupos através dos tempos, com nível de significância adotado de 5%.

### 3. Resultados

As médias do pH ruminal dos animais do GI, durante vinte e quatro horas ( $6,11 \pm 0,20$ ), apresentaram diferença significativa quando comparado com as médias do pH ruminal das ovelhas do GC ( $6,57 \pm 0,16$ ). Os dias experimentais que diferiram do GC foram segundo, quarto, quinto, sexto e do oitavo ao 30º dia de fornecimento de dieta concentrada. Os menores valores de pH ruminal do GI se concentraram do oitavo até o 17º dia após a indução da doença, ou seja, desde o início da dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de alimento volumoso, mostrando que o método de indução de ARS foi eficaz nos animais do GI.

Através da técnica de zimografia somente foi encontrada a forma pró-ativa da MMP 2, sendo essa expressa em unidades arbitrárias. Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos foram verificadas nos dias 8, 11, 12, 15 e 17, com notável aumento no GI da pró-MMP2 no dia 11. O TIMP 1 apresentou diferença significativa na comparação entre os grupos ( $p < 0,05$ ) nos

momentos 8, 10, 13, 16 e 18, com maior média do GI obtida no momento 22. O TIMP 2 apresentou diferença significativa na comparação entre os grupos ( $p < 0,05$ ) nos momentos 2, 5, 8, 10, 13, 16, 18 e 28; com maior média do GI obtida no momento 8. Todos os animais do GI apresentaram sinais clínicos compatíveis com ARS, além da ocorrência de laminite, que se iniciou no momento 11, permanecendo até o momento 17, com predomínio dos sinais clínicos nos membros torácicos. A Figura 01 representa os gráficos resultantes das médias obtidas da análise zimográfica e dos testes de ELISA dos animais pertencentes ao GC e GI durante os trinta dias experimentais.



**Fig 01:** Gráficos resultantes das médias obtidas dos grupos controle (GC) e indução (GI) em relação aos dias experimentais em unidades arbitrárias (UA) da pró-metaloproteinase 2 (pró – MMP2), inibidores teciduais das metaloproteinases 1 e 2 (TIMPs 1 e 2 - ng/mL) em ovinos submetidos à indução experimental de acidose ruminal subaguda (ARS). O \*presente no eixo x

indica a ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos. Jaboticabal, 2019.

#### **4. Discussão**

Estudos relacionados à quantificação das MMPs em patologias de ruminantes, principalmente nos casos de laminite após episódios de acidose ruminal tanto na forma aguda quanto na forma subaguda, é um tópico pouco abordado na Medicina Veterinária. O papel das MMPs na gênese da laminite é assunto que vem sendo estudado nos últimos anos, principalmente em trabalhos com equinos (Canello et al., 2018; De Laat e Pollitt, 2019).

As MMPs são secretadas como pró-enzimas, também chamadas de zimógenos, por células inflamatórias e também por células tumorais em resposta a estímulos variados (Woessner, 1991). As pró-MMPs necessitam ser ativadas, processo conhecido como clivagem proteolítica, ocorrendo a participação de proteases plasminogênicas, agentes não proteolíticos e até mesmo outras MMPs, como a MT1-MMP (Nagase e Woessner, 1999). No presente estudo somente foi encontrada a forma pró-ativa da MMP 2 nos animais de ambos os grupos, com marcante aumento da expressão desse zimógeno nos dias 6 e 11 do período experimental nos animais do GI, diferindo dos resultados obtidos por Loftus et al. (2009) ao induzir laminite em equinos por sobrecarga de carboidratos, e por Canello et al. (2018), após obstrução intraluminal do cólon descendente em equinos, pois nesses trabalhos os níveis da pró-MMP 2 não se alteraram. A não ativação da pró-MMP 2 ocorreu possivelmente pelo fato de que o processo inflamatório não foi de intensidade suficiente para que a enzima fosse ativada (Sabes, 2015). Outro fator a ser levado em consideração é a alta concentração dos TIMPs, principalmente do TIMP 2, durante o período, o que

também poderia explicar a ausência das formas ativas das MMPs 2 e 9 no soro dos animais, como será posteriormente discutido. A não detecção das formas ativas de ambas MMPs pode sugerir que as mesmas se encontram complexadas com os TIMPs ou degradadas, não apresentando potencial de atividade proteolítica (Gusmão, 2013).

Apesar da quantificação e presença de somente a forma pró-ativa da MMP 2, os momentos em que os maiores valores foram encontrados no GI são coincidentes com os sinais clínicos de laminite, ou seja, entre os dias 11 e 17. Ainda neste período ocorreram as mudanças dos padrões termográficos dos cascos, conforme foi descrito discutido no capítulo referente à termografia infravermelha podal do presente estudo. A degradação laminar podal causada pelas MMPs tem sido associada à resposta inflamatória devido à liberação de fatores de ativação de MMPs da corrente sanguínea para os dígitos, contribuindo para o processo degenerativo (Clutterbuck et al., 2010).

A variação, com marcantes incrementos dos teores, encontrada nos valores da pró-MMP 2 corrobora com os resultados obtidos por outros trabalhos que dosaram as formas inativas e ativas das MMPs em diversas patologias em outras espécies animais conforme descrição a seguir. Riley et al. (2000) estudaram as MMPs na placenta ovina, encontrando aumento da pró-MMP 2 do líquido amniótico durante a gestação. Aoki (2014) relata o aumento da pró-MMP 2 no líquido cefalorraquidiano de cães com cinomose, levando à perda da integridade da barreira hematoencefálica, além da presença de sinais clínicos característicos dessa patologia. Silva (2014) ao avaliar coelhos com cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina relatou alterações morfofuncionais que ocorreram ao longo da indução da cardiomiopatia, com marcantes aumentos

na pró-enzima. Uzuelli (2008), ao induzir embolia pulmonar aguda em cães encontrou somente a pró-MMP 9 aumentada, sem alterações nos teores da pró-MMP 2. Sabes (2015) avaliou as MMPs de ovinos com laminite aguda após indução experimental de acidose láctica ruminal aguda, encontrando aumento das duas formas pró ativas entre 32 e 144 horas após indução. Pollit et al. (1998); Johnson et al. (1998) e Mungall e Pollit (1999) descreveram que as formas tanto latente quanto ativa da MMP 2 estavam aumentadas no tecido laminar de equinos com laminite, implicando que a degradação enzimática das lâminas do casco ocorre ativamente. Diante desse fato, o aumento na expressão da forma pró-ativa da MMP 2 poderia ser usado como parâmetro para avaliação da laminite, antes mesmo de sua manifestação clínica e instituição do tratamento adequado.

Os TIMPs possuem a propriedade de se ligarem às pró-MMPs por meio da ligação de seu domínio C-terminal com o domínio hemopexina da pró enzima. Essa interação é relativamente específica, sendo que TIMP 2 se liga à MMP 2, e TIMP 1 à MMP 9. Os TIMPs possuem outras atividades biológicas independentes da inibição de MMPs, como, por exemplo, promoção da proliferação celular, atividade anti angiogênica, pró e anti apoptótica (Nagase et al., 2006; Brew e Nagase, 2010). Quando os níveis dos TIMPs diminuem, as formas ativas das MMPs podem liberar as ligações presentes na membrana extracelular, afetando a estabilidade do membrana extracelular (Towle et al., 2002).

Os resultados obtidos no presente estudo com a dosagem dos TIMPs 1 e 2 diferiram dos resultados obtidos por Li et al. (2017) ao induzir acidose láctica ruminal aguda em ovinos após sobrecarga de oligofrutose, com o

desenvolvimento de laminite aguda em sequência, pois os autores não encontraram diferença significativa na dosagem tecidual dos inibidores. Riley et al. (2000) ao avaliarem os TIMPs do tecido uterino durante a gestação em ovinos encontraram os TIMPs 1 e 2 presentes no líquido amniótico, porém os dados não foram publicados e discutidos, pois a acurácia das amostras estavam comprometidas. Os mesmos autores relataram teores aumentados do TIMP 3, com predominância desse inibidor. Towle et al. (2002), ao estudarem o equilíbrio entre as MMPs 2 e 9 e TIMPs 1 e 2 durante a luteólise em ovinos, relataram o declínio nos valores de ambos os TIMPs, com aumento nos teores da MMP 2 resultando no desequilíbrio entre esses, favorecendo a atividade da enzima. Marucci et al. (2002) avaliaram a participação das MMPs e TIMPs na remodelação óssea mandibular em ovinos, encontrando diminuição na expressão dos TIMPs nos osteoblastos e osteócitos ao longo dos 12 meses experimentais, refletindo a atividade metabólica envolvida entre a ativação e inibição das MMPs ao longo do processo de remodelação óssea. Evidências sugerem que níveis baixos do TIMP 2 podem levar ao aumento da MMP 2, além de que esse inibidor geralmente é encontrado em associação com a forma latente da MMP 2 (Goldberg et al., 1989), apresentando um importante papel na ativação ou não da MMP 2 (Kyaw-Tanner et al., 2010), o mesmo observado com os resultados encontrados no presente estudo, pois os momentos que os níveis do TIMP 2 estavam elevados, os teores da pró-MMP 2 haviam diminuído.

Aumentos significativos nos valores do TIMP 1 foram relatados no soro de pacientes com desordens hematológicas, porém a significância patofisiológica de tal condição não foi estabelecida (Lambert et al., 2004). Foi relatado o aumento dos teores do TIMP 1 em diversas neoplasias em humanos como em

tumores de mama, osteossarcomas, hepatoma, carcinomas basocelulares (Lambert et al., 2004; Ribeiro et al., 2008). Estímulos externos como fatores de crescimento e citocinas inflamatórias podem induzir a expressão do TIMP 1 em várias células (Lambert et al., 2004), o que poderia explicar os valores aumentados nos animais do GI em relação à inflamação ocasionada pela laminite. Em trabalho realizado com pacientes humanos portadores da Doença de Chagas, Gusmão (2013) constatou que quando os níveis séricos do TIMP 1 estão aumentados, os níveis do TIMP 2 também estão, o oposto do que foi observado no presente trabalho, pois os níveis do TIMP 1 encontram-se aumentados nos últimos 10 dias experimentais e, em contrapartida, o TIMP 2 aumentou entre o 7º e o 17º dia. Gusmão (2013) sugere que esse aumento simultâneo seria um possível mecanismo de controle da produção das MMPs 2 e 9. Não foi possível a dosagem das MMPs e dos TIMPs provenientes do tecido laminar dos animais, pois os ovinos apresentam o casco muito frágil, não sendo possível a realização da biópsia para obtenção do tecido, como é realizado com equinos (Johnson et al., 1998; Mungal e Pollit, 1999, Canello et al., 2018).

## **5. Conclusões**

A avaliação zimográfica de animais com ARS e laminite revelou somente a presença da forma pró-ativa da MMP 2, com os teores apresentando importantes aumentos nos dias 6 e 11 após a introdução do carboidrato na dieta. Mesmo encontrando somente a pró-MMP 2, os aumentos dessa pró-enzima foram observados no intervalo de tempo que os animais apresentaram laminite clínica, sugerindo o uso dessa pró-enzima como marcador. Os TIMPs 1 e 2 foram expressos em elevados graus nos animais acometidos durante todo o período.

A provável justificativa para não detecção das formas ativas das MMPs seria os teores de TIMPs elevados, inibindo a ativação das mesmas. Fatores reguladores como o TIMP 2 podem estar envolvidos ao dano laminar precoce, sugerindo avaliação de outras proteases que possam estar envolvidas no processo.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio regular (Processo: 2016/16631-8).

### **Declaração de conflitos de interesses**

Os autores declaram que não ocorreram conflitos de interesses.

## **6. Referências**

Aoki, C. G. 2014. Metaloproteinases de matriz 2 e 9 no líquido cefalorraquidiano e soro de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal.

Brew, K., Nagase, H. 2010. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Bioch Biopsy Acta*, 1, 55 – 73. [http:// DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003](http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.003)

Brossard, L., Martin, C., Michalet-Doreau, B. 2003. Ruminal fermentative parameters and blood acid-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. *An. Res.*, 52, 513-530. <http://dx.doi.org/10.1051/animres:2003036>.

Canello, V.A., Gravena, K., Tovar, M.C.H., Dias, D.P.M., Gomide, L.M.W., Bernardi, N.S., Sabes, A.F., Queiroz, D.J., Melo, G.D., Machado, G.F., Lacerda Neto, J.C. 2018. Metalloproteinases in hoof laminar tissue of equine submitted to intraluminal small colon obstruction. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 70, 1, 45 – 52. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9378>.

Clutterbuck, A.L., Harris, P., Allaway, D. Mobasheri, A. 2010. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *Vet J*, 183, 27 - 38. [http:// DOI:10.1016/j.tvjl.2008.09.022](http://DOI:10.1016/j.tvjl.2008.09.022).

De Laat, M.A., Pollitt, C.C. 2019. Ultrastructural examination of basement membrane pathology in horses with insulin-induced laminitis. *Domest Na Endoc*, 1, 1 – 19. <http://: 10.1016/j.domaniend.2019.04.004>.

Geurts, N., Opdenakker, G., Van Den Steen, P. E. 2011. Matrix Metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmac Therap*, 133, 3, 257 - 279. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.11.008>

Girardi, A.M. 2016. Acidose ruminal subaguda em ovinos santa inês: estudo clínico, laboratorial e avaliação da laminite por termografia infravermelha e radiologia digital (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal.

Goldberg, G.I., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., Wilhelm, S., He, G. 1989. Human 72-kilodalton type IV collagenases form a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases designated as TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci*, 86, 8207 – 8211.

Gusmão, R. C. G. F. 2013. Estudo das metaloproteinases 2 e 9 e seus inibidores nas formas clínicas indeterminada e cardíaca da Doença de Chagas (Doutorado em Ciências). Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisa René Rachou.

Johnson, P.J., Tyagi, S.C., Katwa, L.C., Ganjam, V.K., Moore, L.A., Kreeger, J.M., Messer, N.T. 1998. Activation of extracellular matrix metalloproteinases in equine laminitis. *Vet Rec*, 142, 392 - 396. DOI: 10.1136/vr.142.15.392.

Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T., Ferdinandy, P. 2010. Matrix metalloproteinase activity assays: importance of zymography. *J Pharmac toxic meth*, 61, 2, 205 - 209. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.011>.

Kyaw-Tanner, M.T., Wattle, O., Van Eps, A.W., Pollitt, C.C. 2010. Equine laminitis: membrane type matrix metalloproteinase 1 (MMP-14) is involved in

acute phase onset. *Eq Vet J*, 40, 5, 482 – 487.  
<https://doi.org/10.2746/042516408X270353>.

Lambert, E., Dassé, E., Haye, B., Petitfrère, E. 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Revs Oncol Hemato*, 49, 187 – 198. <http://doi:10.1016/j.critrevonc.2003.09.008>.

Li, H., Liu, J., Zhu, W., Mao, S. 2017. Intraruminal infusion of oligofructose alters ruminal microbiota and induces acute laminitis in sheep. *J Na Sci*, 1, 1 – 11. DOI: [10.2527/jas2017.1860](https://doi.org/10.2527/jas2017.1860).

Loftus, J.P., Johnson, P.J., Belknap, J.K., Pettigrew, A.; Black, S.J. 2009. Leukocyte-derived and endogenous matrix metalloproteinases in the lamellae of horses with naturally acquired and experimentally induced laminitis. *Vet Immun Immunopath*, 129, 221 - 230. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.003>

Manello, F., Medda, V. 2012. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytoche.* 47, 27 – 58.  
<https://doi.org/10.1016/j.proghi.2011.12.002>

Marrucci, D.D., Yu, Y., McTavish, J., Bonar, F., Poole, M.D., Walsh, W.R. 2002. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone remodelling following distraction osteogenesis of the sheep mandibule. *J Cranio-Maxillo Surgery*. 30, 208 – 212. <https://doi.org/10.1054/jcms.2002.0289>.

McCawley, L.J., Matrisian, L.M., 2000. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol. Med. Today* 6, 149–156. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(00\)01686-5](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(00)01686-5).

Melo, G.D., Marangoni, N. R., Marcondes, M., Lima, V. M.F, Machado, G.F. 2011. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniosis: A preliminary study. *The Vet J*, 188, 243 – 245. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.017>.

Mungall, B.A., Pollitt C.C. 1999. Zymographic analysis of equine laminitis. *Histochem Cell Biol*, 112, 467 - 472. [http:// DOI: 10.1007/s004180050430](http://DOI: 10.1007/s004180050430).

Nagase, H., Woessner, J.R.F. 1999. Matrix metalloproteinases. *The J Biol Chem*, 274, 31, 21491 - 21494.

Nagase, H., Visse, R., Murphy, G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Card Res.* 69, 562 – 573. <http://doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002>.

Opdenakker, G., Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., Masure, S., Proost, P., Van Damme, J., 2001a. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.* 69, 851–859.

Ortolani, E. 2009. Enfermidades do período de transição. *Cien An Bras*, 1, 1 – 8. <http://10.5216/cab.v1i0.7660>.

Pollitt, C. C., Pass, M. A., Pollitt, S. 1998. Batimastat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. *Eq Vet J*, 26, 119-124. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1998.tb05130.x>.

Ribeiro, R. I. M. A.; Borges Júnior, P. C.; Cardoso, S. V.; Candelori, I.; Espíndola, F. S.; Cassali, G. D.; Loyola, A. M. 2008. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in basal cell carcinoma. *J Bras Patol Med Lab*, 44, 2, 115 – 121.

Riley, S.C., Webb, C.J., Leask, R., McCaig, F.M., Howe, D.C., 2000. Involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9, tissue inhibitor of metalloproteinases and apoptosis in tissue remodelling in the sheep placenta. *J. Reprod Fertil*, 118, 19–27. <http://10.1530/jrf.0.1180019>.

Sabes, A. F. 2015. Acidose láctica ruminal aguda: aspectos clínicos e laboratoriais. (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal.

Silva, S.N.S. 2014. Metaloproteínas da matriz 2 e 9 em coelhos com cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal.

Stamenkovic, I. 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Seminars Cancer Biol*, 10, 6, 415 – 433. <http://10.1006/scbi.2000.0379>.

Sobrinho, A. G. S., Batista, A. M. V., Siqueira, E. R., Ortolani, E. L., Susin, I., Silva, J. F. C., Teixeira, J. C., Borba, M. F. S. 1996. *Nutrição de ovinos*. Jaboticabal: FUNEP, 258p.

Towle, T.A., Tsang, P.C.W., Milvae, R.A., Newbury, M.K., McCracken J.A. 2002. Dynamic In Vivo Changes in Tissue Inhibitors of Metalloproteinases 1 and 2, and Matrix Metalloproteinases 2 and 9, During Prostaglandin F<sub>2α</sub>-Induced Luteolysis in Sheep. *Biol Reproduc*, 66,5, 1515 – 1521. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.5.1515>.

Uzuelli, J. A. 2008. Alterações das concentrações plasmáticas de troponina I e de metalloproteinases 2 e 9 da matrix extracelular após embolia aguda em cães. (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

Woessner, J. F. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, v.5, n.8, p.2145-2154, 1991. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.8.1850705>.

**Hightlights**

- avaliação das metaloproteinases e seus inibidores em ovinos com acidose ruminal subaguda e laminite
- detecção somente a pró-MMP 2 e dos TIMPs 1 e 2 nos animais submetidos à indução experimental
- TIMPs 1 e 2 aumentadas podem ter sido responsáveis pelo bloqueio da ativação das MMPs 2 e 9.