

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA EM OVINOS:
FLUTUAÇÕES DIÁRIAS DOS VALORES DE pH RUMINAL,
FECAL E URINÁRIO E DINÂMICA DO FLUXO DA ARTÉRIA
TIBIAL CRANIAL**

Gabriela Marchiori Bueno

Médica Veterinária

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA EM OVINOS:
FLUTUAÇÕES DIÁRIAS DOS VALORES DE pH RUMINAL,
FECAL E URINÁRIO E DINÂMICA DO FLUXO DA ARTÉRIA
TIBIAL CRANIAL**

**Discente: Gabriela Marchiori Bueno
Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Marques**

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

2019

B928a	Bueno, Gabriela Marchiori Acidose ruminal subaguda em ovinos: flutuações diárias dos valores de pH ruminal, fecal e urinário e dinâmica do fluxo da artéria tibial cranial / Gabriela Marchiori Bueno. -- Jaboticabal, 2019 67 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Luiz Carlos Marques 1. Medicina Veterinária. 2. Rúmen Fermentação. 3. Ultrassonografia Doppler. 4. Medicina veterinária de animais de grande porte. 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: ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA EM OVINOS: FLUTUAÇÕES DIÁRIAS DOS VALORES DE pH RUMINAL, FECAL E URINÁRIO E DINÂMICA DO FLUXO DA ARTÉRIA TIBIAL CRANIAL

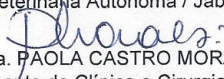
AUTORA: GABRIELA MARCHIORI BUENO

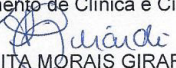
ORIENTADOR: LUIZ CARLOS MARQUES

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


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


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal


Dra. ANNITA MORAIS GIRARDI
Auditora Fiscal Federal Agropecuária (AFFA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Ituverava/SP


Profa. Dra. ANGÉLICA TRAZZI BENTO DE MORAES
Centro Universitário Moura Lacerda / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 29 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIELA MARCHIORI BUENO – nascida no décimo sétimo dia do mês de julho de 1988, na cidade de São José do Rio Preto, no Estado de São Paulo. Realizou curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, concluindo-a em janeiro de 2012. Fez Iniciação Científica na área Clínica Médica de Equinos, sob orientação do Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto, no ano de 2011, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2010/16104-1). Em fevereiro de 2014 concluiu os dois anos do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública, na área de Clínica Médica de Grandes Animais, sob orientação Prof. Dr. Luiz Carlos Marques, junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Recebeu, em 2016, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Carlos Marques, o título de Mestre em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus Jaboticabal, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Em março do mesmo ano, iniciou na mesma instituição, curso de Doutorado, também sob orientação do Prof. Dr. Luiz Carlos Marques, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica Veterinária, novamente como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Dedico esta Tese à memória de meus amados avós Luccas Marchiori e Itália
Fornaro Marchiori.

AGRADECIMENTOS

A Deus, aos Anjos da Guarda e aos Santos de minha fé que sempre abençoaram meus caminhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela ajuda financeira para o desenvolvimento desta tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao orientador Prof. Luiz Carlos Marques, pelo rico aprendizado, pelo suporte técnico e por permitir uma trajetória onde o conhecimento se entrelaça com a ciência.

Aos meus pais Sérgio Luiz Bueno e Cleuza Marchiori Bueno por serem a luz na minha vida e, principalmente, serem exemplo de amor, comunhão e esperança.

Ao meu marido Tiago José Caparica Módolo por iluminar minha vida e por permitir que eu possa sempre contar com seu amor, companheirismo, afeto e valiosas vivências.

À Carolina Marchiori Bueno Cocenzo (querida irmã) pelos agradáveis momentos, ternura, afeição e por ser, sempre, uma figura tão necessária na minha vida.

Às colegas Annita Moraes Girardi e Amanda Festa Sabes pelo convívio, pelos aprendizados e pela troca de conhecimento.

Ao amigo e pesquisador Dr. Emanuel Ferreira Martins Filho pela serenidade, análise estatística enriquecedora e engajamento neste trabalho.

Ao Dr. Evandro Zacché Pereira pelo conhecimento e pela disponibilidade em acompanhar este estudo com tantos ensinamentos e técnicas.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari e à Dra. Daniela da Silva Gomes por terem cedido tão prontamente o laboratório e pela construção e análise dos dados.

Aos técnicos do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV - UNESP, Cláudia Aparecida da Silva Nogueira, Renata Lemos Nagib Jorge e Paulo César da Silva pela disponibilidade e convivência.

Ao Dárcio Zangirolami Filho, à Michelle Avante Zangirolami, ao Yuri Bonacin, ao Lucas Mendonça, à Monica Midon e aos funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” que auxiliaram em várias etapas deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP pela excelência em formação, aprimoramento e pesquisa.

Às ovelhas pela relevância e possibilidade de realizar esse trabalho.

A todos os meus familiares por serem tão essenciais.

À Lúcia Ferreira da Rosa Sobreira, Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Naiá Carla Marchi de Rezende Lago, Patrícia Orlandini Gonzalez, Angélica Trazzi Bento de Moraes, Selma de Fátima Grossi, Roberta Casale, Paola Castro Moraes pelas inspiradoras palavras.

Às queridas amigas Cibeles Naoum Mattos e Milena Gonçalves de Souza Alves, por serem tão essenciais, verdadeiras e únicas.

À minha família de Jaboticabal, Tia Célia Maria Sitta de Gonçalves de Souza, Milena Gonçalves de Souza Alves, Livia Gonçalves de Souza, Cristina Gonçalves de Souza, Laura Gonçalves de Souza Cestari por todo o carinho, força e compreensão nos momentos bons e difíceis.

A algumas pessoas por terem sido pontes que proporcionaram o elo entre minha vida, grandes aprendizados, trocas afetivas e escolhas.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	2
2.1 Ovinocultura no Brasil	2
2.2 Acidose Ruminal Subaguda (ARS)	3
2.3 Etiopatogenia da Acidose Ruminal Subaguda (ARS).....	4
2.4 Achados Clínicos e Diagnóstico da Acidose Ruminal Subaguda (ARS).....	6
2.5 Laminite	8
2.6 Ultrassonografia Doppler.....	11
3. Referências	13
CAPÍTULO 2 – RUMENOSTOMIA EM DOIS TEMPOS CIRÚRGICOS COM COLOCAÇÃO DE CÂNULA DE SILICONE FLEXÍVEL PERMANENTE EM OVELHAS.....	17
Resumo	17
1. Introdução	17
2. Material e métodos	18
3. Resultados e discussão	21
4. Conclusão	23
5. Referências	24
CAPÍTULO 3 - OSCILAÇÕES DIÁRIAS DOS VALORES DE PH RUMINAL, FECAL E URINÁRIO DE OVINOS SUBMETIDOS A ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA.....	25
Resumo.....	25
1. Introdução	25
2. Material e métodos	26
2.1. Período de adaptação.....	27
2.2. Período experimental.....	27
2.3. Análise do pH do líquido ruminal, fezes e urina.....	28
2.4. Análise estatística.....	28
3. Resultados e discussão	29
4. Conclusão	37
5. Referências	37
CAPÍTULO 4 - ALTERAÇÕES DO FLUIDO RUMINAL EM OVELHAS SUBMETIDAS A ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA.....	41
Resumo	41
1. Introdução	41
2. Material e métodos	43
2.1. Período de adaptação.....	43
2.2. Período experimental.....	43
2.3. Análise do líquido ruminal.....	44
3. Resultados.....	45
4. Discussão	47

5. Conclusão	49
6. Referências	49
CAPÍTULO 5 – DOPPLER ULTRASONOGRAPHY OF THE CRANIAL TIBIAL ARTERY IN SHEEP WITH SUBACUTE RUMINAL ACIDOSIS.....	52
Abstract.....	52
1. Introduction	53
2. Materials and methods	55
3. Results.....	57
4. Discussion.....	57
5. Conclusion	61
6. Acknowledgments.....	62
References	62

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.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA EM OVINOS: FLUTUAÇÕES DIÁRIAS DOS VALORES DO PH RUMINAL, FECAL E URINÁRIO E A DINÂMICA DO FLUXO DA ARTÉRIA TIBIAL CRANIAL

RESUMO – A acidose ruminal subaguda (ARS) é caracterizada como doença metabólica de ruminantes alimentados com dieta de alta concentração de carboidratos e escassez de fibras, associada à diminuição do pH ruminal. As consequências da ARS incluem alteração do consumo alimentar, queda na produção, alteração na microbiota e digestão ruminal, diarreia, laminite, abscessos hepáticos e sepse. O presente estudo avaliou as flutuações diárias dos valores do pH ruminal, fecal e urinário, alterações no líquido ruminal e analisou a dinâmica do fluxo da artéria tibial cranial, por ultrassonografia Doppler. Foram utilizadas oito ovelhas adultas, hípidas, distribuídas em grupo tratado (GT, cinco animais, que receberam alta porcentagem de concentrado na dieta) e grupo controle (GC, três animais, alimentados com feno). Para a indução da ARS, as ovelhas do GT receberam dieta na qual foram incluídos ao volumoso, diariamente, 10% de alimento concentrado farelado até completar 80%, porcentagem mantida até finalizar os 30 dias experimentais. Diariamente foram mensurados o pH ruminal, fecal e urinário; no líquido ruminal foram avaliados os aspectos físicos (viscosidade, cor e odor), o tempo de sedimentação, prova de redução do azul de metileno e níveis de histamina. Posteriormente, realizou-se o exame ultrassonográfico Doppler nas artérias tibial cranial do membro pélvico esquerdo e direito. Os parâmetros Doppler analisados foram velocidade máxima sistólica, velocidade diastólica final, índice de pulsatilidade e resistividade. As ovelhas com ARS induzida (GT) apresentaram: diminuição do pH ruminal e aumento do pH fecal e urinário; o fluido ruminal apresentou coloração amarela, diminuição do tempo de redução do azul de metileno, aumento do tempo de sedimentação e diminuição dos níveis de histamina; as ovelhas não apresentaram sinais clínicos evidentes da laminite e nos parâmetros Doppler avaliados observou-se aumento da velocidade diastólica final e diminuição dos índices de pulsatilidade e resistividade na artéria tibial cranial de ambos os membros pélvicos das ovelhas. Concluiu-se que o incremento de carboidrato na dieta causou alterações no pH ruminal, fecal e urinário; no líquido ruminal e vasodilatação na da artéria tibial cranial.

Palavras-chave: ARS, índice de pulsatilidade, índice de resistividade, laminite, ovelhas, pH fluido ruminal

SUBACUTE RUMINAL ACIDOSIS IN SHEEP: DAILY FLUCTUATIONS OF RUMINAL, FECAL AND URINARY PH VALUES AND FLOW DYNAMICS CRANIAL TIBIAL ARTERY

ABSTRACT – Subacute ruminal acidosis (SARA) is characterized as a metabolic disease of ruminants fed a diet of high carbohydrate concentration and fiber shortage associated with decreased of ruminal pH. The consequences of ARS include altered food intake, decreased production, altered microbiota and ruminal digestion, diarrhea, laminitis, hepatic abscesses, and sepsis. The present study evaluated the daily fluctuations of ruminal, fecal and urinary pH values, alterations in ruminal fluid and analyzed the flow dynamics of the cranial tibial artery by Doppler ultrasonography. Eight healthy adult sheep were distributed in treated group (TG, five animals, which received high percentage of concentrate in the diet) and control group (CG, three animals fed hay). For the ARS induction, sheep from TG received a diet in which 10% of the concentrate feed was added to the bulk, until 80%, until the end of the 30 experimental days. Ruminal, fecal and urinary pH values were measured; in ruminal fluid the physical aspects (viscosity, color and odor), sedimentation time, methylene blue reduction test and histamine levels were evaluated. Subsequently, Doppler ultrasonographic examination was performed on the cranial tibial artery of left and right pelvic limbs. The Doppler parameters analyzed were maximum systolic velocity, end-diastolic velocity, pulsatility index and resistivity index. Sheep with induced ARS (TG) presented: decreased of ruminal pH and increased of fecal and urinary pH; ruminal fluid presented yellow staining, decreased of time of methylene blue reduction test, increased of sedimentation time and decreased of histamine levels; the sheep did not present evident clinical signs of laminitis and Doppler parameters evaluated showed an increase in final diastolic velocity and a decrease in pulsatility and resistivity indexes in the cranial tibial artery of both pelvic limbs. It was concluded that the increase of carbohydrate in diet caused changes in ruminal, fecal and urinary pH; in ruminal fluid and vasodilation in the cranial tibial artery.

Keywords: SARA, pulsatility index, resistivity index, laminitis, ewes, pH ruminal fluid

Lista de Figuras

Página

CAPÍTULO 2 - RUMENOSTOMIA EM DOIS TEMPOS CIRÚRGICOS COM COLOCAÇÃO DE CÂNULA FLEXÍVEL PERMANENTE DE SILICONE EM OVELHAS

Figura 1. Rumenostomia com colocação de cânula permanente. Primeiro período cirúrgico em ovino, em decúbito lateral direito: (A) incisão circular na pele, respeitando o tamanho do diâmetro da cânula, no terço superior do flanco esquerdo, caudal à 13^a costela, seguida por divulsão do tecido subcutâneo e hemostasia dos vasos de maior calibre com fio poliglactina 920 2-0; (B) incisão e divulsão dos músculos abdominais oblíquo externo e oblíquo interno com tesoura, no sentido das fibras musculares; (C) sutura da serosa ruminal, peritônio, camadas musculares e pele com fio de algodão 0, em ponto simples separado (UNESP – Jaboticabal, 2019).....20

Figura 2. Rumenostomia com colocação de cânula permanente. Segundo período cirúrgico em ovino: (A) retirada dos pontos e incisão do tecido ruminal necrosado; (B) formação de fístula comunicando o rúmen e o meio externo. Observa-se boa cicatrização da ferida cirúrgica e aderência do rúmen à parede abdominal; (C) encaixe da cânula na fístula; (D) cânula de silicone fechada e estabilizada perfeitamente na fístula; (E) ovelhas com a cânula flexível de silicone permanente (UNESP – Jaboticabal, 2019).....20

Figura 3. Cânula flexível de silicone com 1,5 polegadas: (A) cânula desmontada. Nota-se presença de depressões para melhor encaixe e estabilização da cânula entre o rúmen e a pele; (B) vista lateral da cânula montada e fechada (UNESP – Jaboticabal, 2019).....21

CAPÍTULO 3 – OSCILAÇÕES DIÁRIAS DOS VALORES DE PH RUMINAL, FECAL E URINÁRIO DE OVINOS SUBMETIDOS A ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA

Figura 1. Representação gráfica das médias e desvios padrão diários do pH do líquido ruminal de ovinos dos grupos tratado e controle, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). * $P < 0,05$29

- Figura 2.** Representação gráfica das médias e desvios padrão do pH do líquido ruminal de ovinos dos grupos tratado (GT) e controle (GC), obtidas quatro (C4), oito (C8), 12 (C12), 16 (C16), 20 (C20) e 24 (C24) horas após o fornecimento do alimento concentrado, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). *P<0,05.....31
- Figura 3.** Representação gráfica das médias e desvios padrão diários do pH das fezes de ovinos dos grupos tratado e controle, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). *P<0,05.....32
- Figura 4.** Representação gráfica das médias e desvios padrão do pH das fezes de ovinos dos grupos tratado (GT) e controle (GC), obtidas quatro (C4), oito (C8), 12 (C12), 16 (C16), 20 (C20) e 24 (C24) horas após o fornecimento do alimento concentrado, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). *P<0,05.....34
- Figura 5.** Representação gráfica das médias e desvios padrão diários do pH da urina de ovinos dos grupos tratado e controle, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). *P<0,05.....35
- Figura 6.** Representação gráfica das médias e desvios padrão da variável pH da urina de ovinos dos grupos tratado (GT) e controle (GC), obtidas quatro 12 (C12) e 24 (C24) horas após o fornecimento do alimento concentrado, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso;

D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019).

*P<0,05..... 36

CAPÍTULO 4 – ALTERAÇÕES DO FLUIDO RUMINAL EM OVELHAS SUBMETIDAS A ACIDOSE RUMINAL SUBAGUDA

Figura 1. Fluido ruminal de ovinos induzidos à acidose ruminal subaguda por ingestão de dieta rica em carboidratos: verde oliva (A), verde amarelado (B) e amarelado (C).....45

Figura 2. Representação gráfica das médias e desvios padrão diários da análise da prova sedimentação (TS) do fluido ruminal dos ovinos dos grupos tratado (GT) e controle (GC), em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). *P<0,05.....46

Figura 3. Representação gráfica das médias e desvios padrão diários da análise da prova de redução de azul de metileno (PRAM) do fluido ruminal dos ovinos dos grupos tratado (GT) e controle (GC), em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). *P<0,05.....46

Figura 4. Representação gráfica das médias e desvios padrão diários da concentração de histamina no fluido ruminal grupos tratado (GT) e controle (GC), em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). *P<0,05.....47

CAPÍTULO 5 – DOPPLER ULTRASONOGRAPHY OF THE CRANIAL TIBIAL ARTERY IN SHEEP WITH SUBACUTE RUMINAL ACIDOSIS

Figure 1. Graphical representation of mean $\pm$ standard deviation of heart rate (HR), end-diastolic velocity (EDV), resistivity index (RI), and pulsatility index (PI) in the treatment (TG) and control (CG) groups (B: diet with only bulk grass/hay; 1 to 7: gradual daily inclusion of 10% concentrate feed to the diet on a dry matter (DM) basis; 8 to 30: diet with 80% concentrate feed and 20% bulk on a DM basis). (UNESP - Jaboticabal, 2019). * $P < 0.05$67

Figure 2. (A) Triplex-mode Doppler image of the cranial tibial artery of the left pelvic limb from ewe of the control group (CG). (B) Triplex-mode Doppler image of the cranial tibial artery of right pelvic limb from ewe of the treated group (TG) on the 18th experimental day (diet with 80% concentrate feed and 20% bulk on a dry matter basis). (UNESP - Jaboticabal, 2019).....67

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

No Brasil, o mercado para carne ovina está em ascensão e tal fato se deve ao aumento da comercialização da propaganda em prol do consumo e da renda da população.

Com a alta demanda por carne ovina, ocorre aumento do número de animais no sistema de criação intensiva, visando maior ganho de peso em curto período de tempo (Viana et al., 2015). Este sistema de criação propõe o fornecimento de altas quantidades de carboidrato como fonte de energia e baixa quantidade de volumoso, o que desencadeia diversas alterações no rúmen, podendo predispor à acidose ruminal. Esta afecção gera queda na produtividade, diminuição do consumo alimentar e descarte de animais, além do prejuízo econômico vinculado à doença (González et al., 2012).

A acidose ruminal subaguda (ARS) caracteriza-se pela diminuição do pH do rúmen devido ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e insuficiência de tampões para manutenção do pH. As causas estão atreladas ao excesso de carboidratos não estruturais na dieta, à grande quantidade de alimentos fermentescíveis e à deficiência de volumoso ou fibras na dieta (Radostitis et al., 2007).

As consequências da ARS incluem alteração do consumo alimentar, queda na produção, alteração na microbiota e digestão ruminal, diarreia, laminite, abscessos hepáticos e endotoxemia (Oetzel, 2003). Há grande número de pesquisas envolvendo bovinos com ARS, porém estudos com ovinos apresentam escala menos representativa.

A ARS é de grande importância não só pelo prejuízo econômico causado pela queda na produção de leite, produção de carne ou deterioração da condição corporal, mas também pelo bem-estar dos ruminantes, pois esta doença está vinculada à dor causada por processos inflamatórios. É necessário entender as alterações do fluido ruminal para compreender a instalação e gravidade da doença em ruminantes (Krause e Oetzel, 2006).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os valores de pHs ruminal, fecal e urinário, lipopolissacarídeos (LPS) e histamina no fluido ruminal e alterações hemodinâmicas arteriais em ovelhas (*Ovis aries*) mestiças de Santa Inês com ARS induzida.

2. Revisão de Literatura

2.1. Ovinocultura no Brasil

O ovino foi a primeira espécie a ser domesticada e explorada pelo ser humano durante o começo da civilização. Desde este período até os dias atuais o ovino é utilizado como fonte de alimento, na forma de carne ou leite, e de proteção, com a utilização da lã e pele. Portanto, a criação ovina está destinada tanto à exploração econômica como à subsistência dos seres humanos (Sobrinho, 2006).

O Brasil possui um rebanho de 17.976.367 ovinos, com a maior concentração na região Nordeste (64,22%), seguida pela região Sul (23,69%), Centro-Oeste (4,97%), Norte (3,65%), e Sudeste (3,47%) (IBGE, 2018). O rebanho ovino brasileiro vem aumentando com o passar dos anos, este fato deve-se à intensificação dos acordos comerciais internacionais. Visando a suprir estes acordos, os produtores brasileiros começaram a investir e explorar economicamente a introdução de raças especializadas, melhoramento genético e técnicas de manejo que propiciam a elevação da produtividade (Viana et al., 2015).

No Brasil, o principal objetivo da ovinocultura é a produção de carne (Viana et al., 2015). Portanto, todas as medidas adotadas para intensificar a produção tem a finalidade de aumentar a quantidade e qualidade do produto final (Caldeira, 2005).

Dietas ricas em grãos, carboidratos, favorecem o aumento da produção de leite e ganho de peso, sendo benéficas por um curto tempo, porém a longo prazo o seu consumo acarreta efeitos adversos como a acidose ruminal subaguda (ARS) (Oetzel, 2003).

2.2. Acidose Ruminal Subaguda (ARS)

A primeira menção à ARS foi realizada por Dirksen (1965), que a descreveu como uma enfermidade crônica latente e mais frequente que a acidose ruminal aguda. Além disso, deve-se considerar a ARS como um problema de rebanho e não pontual, como a acidose ruminal aguda.

A acidose ruminal aguda é uma enfermidade do sistema digestório de ruminantes, comum no rebanho, a qual acarreta prejuízos econômicos e ao bem-estar animal (González et al., 2012).

Todos os tipos de ruminantes são susceptíveis, porém é mais comum em confinamentos de engorda e em rebanhos de vacas leiteiras que são alimentados com rápida introdução de altos níveis de grãos na dieta (Radostitis et al., 2007).

Segundo Plaizier et al. (2009), a acidose ruminal é uma doença metabólica de bovinos alimentados com dieta de alta concentração de carboidratos associado com a diminuição do pH ruminal.

A acidose ruminal pode ser classificada como aguda ou clínica e subaguda ou subclínica ou crônica (Owens et al., 1998; Kleen et al., 2003; Najara e Titgemeyer, 2007). Animais com acidose ruminal aguda manifestam sinais clínicos rapidamente após consumir carboidratos altamente fermentescíveis (Najara e Titgemeyer, 2007). Na acidose subaguda não há manifestação clínica evidente da doença, ocorrendo somente queda no consumo alimentar e na produção, sem que o animal pareça enfermo (Owens et al., 1998). A definição da ARS é confusa e varia de acordo com os grupos de pesquisa e países. Essa confusão na nomenclatura, provavelmente, se deve à complexidade da doença e à dificuldade de delimitar o momento de transição de um rúmen em condições fisiológicas para o estado de ARS e à junção das variáveis bioquímicas e microbióticas do líquido ruminal (Enemark et al., 2002).

Alguns estudos definem a ARS somente baseado na diminuição do pH ruminal. Propõem que a manutenção de pH ruminal 5,6 durante três horas em um dia é caracterizado como ARS (Kleen et al., 2003; Gozho et al., 2005). Garret et al. (1999) sugerem que o pH ruminal deve estar em torno de 5,5 independente da duração e Beauchemin et al. (2003) apostam 5,8 como pH ruminal para a ARS.

Em termos de alterações ruminais, a ARS pode ser caracterizada pela diminuição do pH ruminal, o qual está em torno de 5 e 5,5; pelo aumento da concentração de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGCC), pela alteração da proporção do ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico; e pelo acúmulo de ácido láctico no rúmen (5-10 mMol/L) (Hibbard et al., 1995).

No entanto, a ARS não causa mudanças somente no rúmen. Há alterações sistêmicas como nas concentrações dos gases sanguíneos, no valor do pH do sangue e das fezes, no excesso de base, na concentração do bicarbonato, na pressão parcial de oxigênio, na pressão parcial de dióxido de carbono, na concentração de glicose, na concentração do cortisol, na contagem de neutrófilos, na atividade fagocitária, na translocação de lipopolissacarídeos do fluido ruminal para os vasos sanguíneos e na concentração de proteínas de fase aguda (Enemark et al., 2002; Khafipour et al., 2009; Morgante et al., 2009).

2.3. Etiopatogenia da Acidose Ruminal Subaguda (ARS)

A ingestão exagerada de grãos e comedida de forragem, a redução do tamanho do volumoso (triturado), a redução dos “pellets” da ração, o tratamento térmico ou a extrusão do concentrado são fatores que aumentam a rapidez da fermentação destes componentes no rúmen (Beauchemin et al., 2003; Oetzel, 2003). Baseando-se no grau de fermentabilidade, ou seja, na taxa de degradação do amido no rúmen, os grãos que fermentam mais rápido são: trigo, seguidos de aveia, cevada e milho (Huntington et al., 2006).

Os ruminantes, especialmente os bovinos, possuem grande produção de saliva que, além de ter a função de umedecer o alimento, também funciona como tampão para a manutenção do pH ruminal. A saliva é composta por bicarbonato, sódio, potássio e fosfato e é secretada durante a mastigação e ruminação. A produção da saliva não é desencadeada pela queda do pH, mas sim, pelo consumo de fibras, portanto, quanto menor a concentração de fibras da dieta, menor é o tempo de mastigação e ruminação, menor a produção de saliva e menor a eficiência do tamponamento ruminal (Oetzel, 2003; Beauchemin et al., 2008).

O consumo excessivo de carboidratos rapidamente fermentáveis causa diminuição do pH ruminal para níveis inferiores aos do fisiológico para o ruminante (Oetzel, 2003). A queda do pH ocorre porque há acúmulo de AGCC e ácido láctico no rúmen e o sistema tamponante do rúmen não é capaz de reverter o pH (González et al., 2012).

O rúmen tem a habilidade de absorver rapidamente os AGCC contribuindo para estabilidade do pH ruminal. Os AGCC são absorvidos passivamente pelas papilas ruminais, as quais aumentam de acordo com a necessidade de absorção. Quando a produção de AGCC sobrepuja a capacidade das papilas, ocorre o acúmulo desses ácidos no rúmen, dificultando a estabilidade do pH ruminal e causando injúrias à parede do órgão (Enemark et al., 2002; Oetzel, 2003; Krause e Oetzel, 2006).

A produção exagerada de AGCC depende do tipo e da quantidade de alimento ingerido e da taxa de degradação do amido por microrganismos no rúmen. Após dissociação, estes ácidos orgânicos liberam prótons, os quais podem decrescer o valor do pH do fluido ruminal, redução esta que depende da quantidade de saliva adicionada, a qual neutraliza os ácidos e depende do tempo de mastigação do alimento (González et al., 2012).

Quando o pH ruminal está abaixo de 5,5 os AGCC passam rapidamente para forma indissociada, o que resulta na remoção de íons de hidrogênio livres no fluido ruminal e promove a absorção passiva dos AGCC pela parede ruminal. Este fato favorece a estabilização e a manutenção do pH dentro dos níveis fisiológicos (Oetzel, 2003; Krause e Oetzel, 2006).

A queda do pH associado ao acúmulo de AGCC resulta na elevação da osmolalidade do fluido ruminal. Estudos relatam osmolalidade de 300 a 700 mOsm/kg em vacas com ARS (Oetzel, 2003; Khafipour et al., 2009).

Outro fato correlacionado com a redução do pH ruminal para 5,5 é atuação de espécies de bactérias lactogênicas como o *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* spp. Em condições fisiológicas, o ácido láctico é produzido em quantidades mínimas no líquido ruminal e é controlado por espécies de microrganismos lactolíticos, *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*. Quando o pH do rúmen decresce, *Streptococcus bovis* converte a glicose em ácido láctico rapidamente,

momento crítico que contribui ainda mais com a diminuição do pH ruminal. As bactérias lactolíticas são recrutadas como resposta adaptativa para conversão de ácido láctico em AGCC, que são absorvidos pelo epitélio ruminal (Enemark et al., 2002; Oetzel, 2003; Krause e Oetzel, 2006).

Ciclos de privação e fornecimento alimentar são fatores de risco importantes para o desenvolvimento da ARS. Nos períodos de privação alimentar há elevação do pH, que acarreta a inibição de bactérias lactolíticas, tornando o indivíduo mais susceptível à acidose na próxima refeição (Oetzel, 2003).

2.4. Achados Clínicos e Diagnóstico da Acidose Ruminal Subaguda (ARS)

Os estudos revelam que a primeira manifestação da ARS é a queda na ingestão de alimentos. Alguns autores utilizam esse sinal clínico para o diagnóstico da ARS (Kleen et al., 2003; Oetzel, 2003). As razões para depressão do consumo de matéria seca estão associadas com a redução das fibras na dieta, que resulta na queda da digestibilidade, com o aumento na concentração de AGCC e com o aumento da osmolalidade do líquido ruminal (Allen, 2000; Kleen et al., 2003). Estudos comprovam que a ARS reduz o consumo de matéria seca em vacas em período de lactação (Khafipour et al., 2009) e em gado de corte confinado (Gozho et al., 2006).

Outra teoria sobre a diminuição da ingestão de matéria seca está ligada ao aumento da osmolaridade ruminal devido à redução da absorção dos AGCC, glicose e lactato. Estas alterações acarretam no transporte de fluidos para dentro do rúmen, o que determina queda do apetite (Owens et al., 1998).

A constante agressão dos AGCC na parede ruminal, o aumento transitório do lactato e as flutuações de osmolalidade do fluido ruminal causam ruminite, erosão e ulceração do epitélio ruminal. A ruminite é uma das principais lesões causadas pela ARS (Krehbiel et al., 1995; Enemark et al., 2002; Kleen et al., 2003). Como no epitélio ruminal está ocorrendo inflamação, bactérias podem colonizar as papilas e progredirem para o fígado, através da circulação portal. Após os êmbolos bacterianos acessarem o sistema porta, podem ocorrer formações de abscessos hepáticos com possível peritonite focal, e colonização dos pulmões, rins,

articulações e válvulas cardíacas (Nocek, 1997). Alguns autores chamam este fenômeno de “complexo paraqueratose ruminite-abscesso hepático” (Kleen et al., 2003).

Outra manifestação clínica da ARS é a diarreia. A consistência e estrutura das fezes dependem da ruminação, da atividade dos microrganismos presentes no rúmen e do trânsito ruminal e intestinal (Radostitis et al., 2007). As fezes de ruminantes com ARS tornam-se mais brilhantes, com coloração amarelada, às vezes espumosas, sugestivas de extensa fermentação intestinal (Kleen et al., 2003; Plaizier et al., 2009). O pH fecal na ARS é ligeiramente ácido quando comparado com fezes de animais saudáveis (Morgante et al., 2009).

Os sinais clínicos da ARS não são específicos, representam processo inflamatório sem causas aparentes, diminuição no desempenho e condição corporal ruim. Devido à abrangência clínica, o diagnóstico é de suma importância, pois, eventualmente o que se observa são sequelas da doença. Dessa forma, é necessário diagnosticar a ARS antes do aparecimento dos danos causados (Garret et al., 1999).

O uso de amostras sanguíneas para a mensuração de excesso de base ou do valor do pH são relevantes para o diagnóstico da ARS, pois a absorção exacerbada dos AGCC pode levar à redução do excesso de base no sangue. A redução do excesso de base pode ser sugestiva da tentativa de neutralização do excesso de ácidos no rúmen, revelando assim, acidose metabólica compensada (Owens et al., 1998).

O monitoramento do pH ruminal é de suma importância para o diagnóstico fidedigno da ARS (Enemark et al., 2002). Considera-se a ARS instalada quando o pH ruminal permanece abaixo de 5,5 (Nocek, 1997; Goad et al., 1998). A flutuação do pH ruminal é considerável ao longo de 24 horas, e esta flutuação é ainda mais expressiva com a ingestão de dietas ricas em carboidratos fermentescíveis (Krause e Oetzel, 2006; Nagaraja e Titgemeyer, 2007).

As características do fluido ruminal de vacas com ARS são: coloração leitosa ou amarronzada, odor ácido, consistência levemente viscosa, rápido tempo de sedimentação, pH em torno 6,2 a 5,3 e tempo de redução do azul de metileno de até três minutos (Enemark et al., 2002). Apesar do líquido ruminal ter predominância por

bactérias Gram-negativas, ocorre ascensão do número de bactérias Gram-positivas na ARS (Goad et al., 1998; Owens et al., 1998).

Apesar das pesquisas, não se sabe ao certo se a influência do baixo pH ruminal é desencadeador da acidose metabólica sistêmica e se esta deve ser sempre esperada. A amplitude da diminuição do pH ruminal e a duração dos episódios em que o pH fica abaixo dos valores fisiológicos para ruminantes são fatores importantes para o desencadeamento de quadros sistêmicos (Nocek, 1997).

2.5. Laminite

A maioria das claudicações, encontradas nos rebanhos, é atribuída à laminite causada pelo excesso de grãos na dieta, a qual é a segunda doença que mais causa diminuição na produtividade leiteira, no ganho de peso e falha na reprodução (Oetzel, 2003). A laminite ou pododermatite asséptica difusa é definida como inflamação das lâminas dérmicas do casco (Nocek, 1997). Apesar da laminite ser a principal sequela da ARS (Nordlund et al., 1995), a causa é multifatorial. Sugere-se que doenças metabólicas aumentam a susceptibilidade do desencadeamento da laminite, além de estar associada a abscessos e úlceras de sola e supercrescimento do estojo córneo (Nocek, 1997). Porém, os mecanismos fidedignos de como a ARS desencadeia a laminite não estão completamente esclarecidos (Krause e Oetzel, 2006).

Acredita-se que a conexão entre a ARS e a laminite seja o consumo inadequado de carboidratos e deficiência na ingestão de fibras na dieta acarretando, assim, na fermentação ruminal excessiva (Nocek, 1997). Com a intensa fermentação no rúmen, conseqüentemente, queda do pH ruminal, há lise bacteriana e danos teciduais. Tais fenômenos resultam na liberação de substâncias vasoativas, que estão associadas a alterações na hemodinâmica da microvasculatura periférica (Boosman et al., 1989; Nocek, 1997). As substâncias vasoativas são, principalmente, histamina e endotoxinas e causam no sistema microvascular vasoconstrição e, posteriormente, dilatação arterial resultando na elevação da pressão sanguínea e exsudação de soro pelas paredes venosas, provocando edema, hemorragia e expansão do cório laminar (Nocek, 1997).

A laminite é caracterizada pela perda da conexão entre a terceira falange e o casco, isso ocorre pela separação das lâminas interdigitais que revestem a superfície interna do casco, das lâminas sensitivas ligadas a terceira falange. Deste modo, ocorre a rotação da terceira falange, que em muitas vezes, se insinua na sola do casco (Radostitis et al., 2007).

Os mecanismos do desenvolvimento da laminite podem ser descritos em quatro fases. Inicialmente, com o manejo nutricional errôneo ocorre o decréscimo do pH ruminal, e subsequentemente, o pH sistêmico. Esta redução do pH sanguíneo ativa um mecanismo vasoativo que aumenta o pulso digital e o fluxo sanguíneo. As substâncias do mecanismo vasoativo são, principalmente, histamina e endotoxinas e causam no sistema microvascular vasoconstrição e, posteriormente, dilatação arterial. Nos pequenos capilares ocorre aumento da constrição e dilatação mediados pela histamina e endotoxinas, criando *shunts* arteriovenosos não fisiológicos, resultando na elevação da pressão sanguínea e exsudação de soro pelas paredes venosas, provocando edema, hemorragia e expansão do cório laminar, causando muita dor ao animal. Na segunda fase, o edema causa isquemia e hipóxia, com pouca chegada de nutrientes às células epidermais. Na terceira fase, é o resultado do dano causado aos pequenos capilares e pouco aporte de nutrientes às células, conseqüentemente, ocorre a destruição do extrato germinativo da epiderme, degeneração laminar e interrupção das junções dermo-epidérmicas. E por fim, na quarta fase, há a separação do extrato germinativo com o cório, interrupção das junções laminares dorsal e lateral do casco e deslocamento da terceira falange. O deslocamento da terceira falange acarreta em compressão dos tecidos moles adjacentes causando hemorragia, edema, trombose, isquemia e necrose tecidual na região solear do casco. Na região solear do dígito, onde há a compressão dos tecidos moles contra a sola, ocorre acúmulo de debris celulares e de tecido cicatricial, o que prejudica o ajustamento das novas camadas de tecido córneo e resulta em sola dupla, hemorragia de sola, hematomas e lesões difusas (Nocek, 1997).

A histamina, é uma amina farmacologicamente ativa, produzida no rúmen pela descarboxilação dos aminoácidos percussores; sua síntese é desencadeada pela queda do pH ruminal (Nagaraja e Titgemeyer, 2007). Segundo Brent (1976), a

histamina é um potente vasodilatador e aumenta a permeabilidade vascular; ambas características causam destruição do processo hemodinâmico, fato importante para patogênese da laminite. A produção e acúmulo de histamina no rúmen está associada a queda do pH (Dain et al., 1955); estudos apontam que espécies bacterianas de *Allisonella histaminiformans* são tolerantes a pH ácidos (pH 4,5) e importantes produtoras de histamina (Garner et al., 2002).

Há controvérsias a respeito da absorção da histamina do rúmen em relação ao aumento da concentração de histamina do plasma (Brent, 1976). Segundo Aschenbach e Gabel (2000), o aumento da concentração de histamina plasmática proveniente do acúmulo de histamina ruminal depende do grau de lesão tecidual do epitélio ruminal causado pela agressão da queda do pH ruminal.

O envolvimento da histamina e das endotoxinas se encaixa na patogênese da laminite por sobrecarga de carboidratos (Nocek, 1997). As endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) são componentes da parede celular de bactérias gram-negativas. Como no líquido ruminal há predomínio de bactérias gram-negativas, em condições acidóticas ocorre a morte destas bactérias com a liberação do LPS (Nagaraja et al., 1978). Segundo Gozho et al. (2005) e Pilachai et al. (2012) na ARS espera-se aumento da concentração de LPS livre no líquido ruminal. E acredita-se que as endotoxinas bacterianas presentes no fluido ruminal participem da patogênese da ARS e da laminite, pois o LPS pode ser translocado para os vasos sanguíneos periféricos (Nagaraja et al., 1978). O alvo primário das endotoxinas parece ser o tecido arterial vascular, que afeta a liberação de mediadores vasoativos, induzindo assim uma resposta inflamatória de fase aguda da derme e respostas vasculares associadas (Nocek, 1997; Gozho et al., 2005).

A laminite causa extrema dor podal, consequentemente, claudicação (Radostitis et al., 2007), causando danos ao bem-estar (Fitzpatrick et al., 2006) e prejuízos econômicos importantes. O sucesso para o tratamento e controle das claudicações é o diagnóstico fidedigno (Radostitis et al., 2007; Winter, 2008).

2.6. Ultrassonografia Doppler

A ultrassonografia (US) é uma técnica de diagnóstico por imagem, muito empregada na Medicina Veterinária. A US permite de forma não invasiva, rápida e segura obter informações a respeito das características dos órgãos, das estruturas não visíveis ao exame radiográfico, além de ser altamente sensível (Feliciano et al., 2015). O modo bidimensional ou B utiliza informações sobre a amplitude do sinal que o transdutor emite, de acordo com a força dos ecos que retornam e, assim, formar a imagem em tons de cinza (Feliciano et al., 2015).

O físico, matemático e astrônomo Johann Christian Andreas Doppler, em 1842, a partir da análise da variação da altura do som do apito de trem em movimento descobriu o efeito Doppler. O efeito Doppler pode ser definido como princípio físico no qual se quantifica a velocidade de um movimento entre uma fonte de onda eletromagnética ou sonora e um observador (King, 2006; Carvalho e Addad, 2009).

A ferramenta Doppler associada à ultrassonografia modo B fornece informações em tempo real a respeito da anatomia, arquitetura vascular e dinâmica de fluxo sanguíneo (Szatmári et al., 2001; Novellas et al., 2007; Carvalho et al., 2008), além de informações sobre a resistência vascular periférica (Novellas et al., 2007). Sendo assim, os aparelhos de ultrassom Doppler fornecem informações sobre o fluxo, permitindo a avaliação da hemodinâmica por meio da análise do som emitido, das ondas espectrais de velocidade e do mapeamento colorido do volume de amostragem de interesse (Szatmári et al., 2001; King, 2006).

O modo Triplex Doppler é a combinação do modo B, do Doppler espectral ou pulsado e do Doppler colorido, fornecendo maior acurácia e facilidade para identificação de vasos (King, 2006; Carvalho e Addad, 2009).

Primeiramente, inicia-se o exame em modo B realizando varredura das estruturas em planos transversais e longitudinais. Em seguida, o modo Doppler colorido sobrepõe a imagem no modo B, onde é possível identificar a presença de fluxo sanguíneo no vaso pelas regiões coloridas. Posteriormente, modo espectral é utilizado para avaliar a dinâmica vascular, formando uma onda senoidal onde cada ciclo representa um ciclo cardíaco completo. As análises morfológicas das ondas

fornece dados relacionados às velocidades dos ciclos cardíacos e características do fluxo sanguíneo. Neste modo é possível a utilização de índices para mensurar a hemodinâmica do tecido ou órgão de interesse, estes índices são: índice de resistividade (IR) e índice de pulsatilidade (IP) (Carvalho e Addad, 2009; Hwang, 2017). Os índices hemodinâmicos IP e IR permitem a comparação do fluxo durante a sístole e na diástole e, são empregados para auxiliar as avaliações de estenose, trombose e aumento de resistência nos vasos periféricos (Carvalho et al., 2008).

Em equinos com claudicação por dor podal, Douthit et al. (2014) consideraram a velocidade do fluxo sanguíneo da artéria digital medial como modelo preditivo para laminite. Também em equinos, o LPS intravenoso causou diminuição do fluxo sanguíneo digital (Hunt et al., 1990; Ingle-Fehr e Baxter, 1998; Menzies-Gow et al., 2004) e aumento da resistência vascular total e pré-capilar, indicando constrição arterial/arteriolar (Hunt et al., 1990), o que demonstra participação do LPS nos distúrbios hemodinâmicos precedendo o surgimento da laminite (Menzies-Gow et al., 2004).

Em ovinos, Pawson et al. (2002) observaram alteração do índice de pulsatilidade da artéria femoral em resposta a vasodilatadores intravenosos em animais anestesiados. Em vacas leiteiras sadias, Müller et al. (2017) avaliaram o fluxo sanguíneo da artéria interdigital dos membros pélvicos e concluíram que o apoio dos membros no solo é importante para minimizar as variabilidades do perfil do fluxo sanguíneo e US Doppler mostrou-se ser uma ferramenta importante para empregá-la em animais claudicantes.

Para adequada utilização da ultrassonografia Doppler na Medicina Veterinária é necessário colaboração do paciente. Precisa-se de imobilidade para a realização do exame, e em alguns casos, é necessário sedativos ou anestésicos, o que geralmente, afetam os resultados (Miño et al., 2008).

O bem-estar dos ruminantes pode ser comprometido pela dor podal associada às doenças inflamatórias (Fitzpatrick et al., 2006). Desta forma, o diagnóstico precoce da laminite é importante para melhorar o bem-estar e a produção destes animais.

3. REFERÊNCIAS

- Aschenbach JR, Gabel G (2000) Effect and absorption of histamine in sheep rumen: Significance of acidotic epithelial damage. **Journal of Animal Science** 78:464-470.
- Allen MS (2000) Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 83:1598-1624.
- Beauchemin KA, Yang WZ, Rode LM (2003) Effects of particle size of alfafa based dairy cows diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science** 86:630-643.
- Beauchemin KA, Eriksen L, Nørgaard P, Rode LM (2008) Short communication: salivary secretion during meals in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 91:2077–2081.
- Boosman R, Nemeth F, Gruys E, Klarenbeek A (1989) Arteriographical and pathological changes in chronic laminitis in dairy cattle. **The Veterinary Quarterly** 11:144-155.
- Brent BE (1976) Relationship of acidosis to other feedlot ailments. **Journal of Animal Science** 43:930-935.
- Caldeira RM (2005) Monitorização da adequação do plano alimentar e do estado nutricional em ovelhas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias** 100:125-139.
- Carvalho CF, Chammas MC, Cerri GG (2008) Princípios físicos do Doppler em ultrasonografia. **Ciência Rural** 38:872-879.
- Carvalho CF, Addad CA (2009) Fundamentos. In: Carvalho CF (Ed.) **Ultrassonografia Doppler em Pequenos Animais**. São Paulo: Rocca, p. 1 – 20.
- Dain JA, Neal AL, Dougherty RW (1955) The occurrence of histamine and tyramine in rumen ingesta of experimentally over-fed sheep. **Journal of Animal Science** 14:930 -935.
- Dirksen G (1965) Rumen acidosis in cattle. **Veterinary Medical Review** 2:98-125.
- Douthit TL, Bormann JM, Bello NM (2014) Assessing the association between hoof thermography and hoof doppler ultrasonography for the diagnosis of lameness in horses. **Journal of Equine Veterinary Science** 34:275–280.
- Enemark JMD, Jørgensen RJ, Enemark PS (2002) Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review. **Veterinarija ir Zootechnika** 20:16-29.
- Feliciano AMR, Garcia PHS, Vicente WRR (2015) Introdução à Ultrassonografia. In: Feliciano AMR, Canola JC, Vicente WRR (Eds.) **Diagnóstico por Imagem em Cães e Gatos**. São Paulo: MedVet, p.53 – 77.

Fitzpatrick J, Scott M, Nolan A (2006) Assessment of pain and welfare in sheep. **Small Ruminant Research** 62:55–61.

Garret EF, Pereira MN, Nordlund KV, Armentano LE, Goodger WJ, Oetzel GR (1999) Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 82:1170-1178.

Garner MR, Hay AG, Guard CL, Russell JB (2002) Bovine Laminitis and *Allisonella histaminiformans*. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, p.199-208.

Goad DW, Goad CL, Nagaraja TG (1998) Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal of Animal Science** 76:234-241.

González LA, Manteca X, Calsamiglia S, Schawrtzkopf-Genswein KS, Ferret A (2012) Ruminal acidosis in fetlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). **Animal Feed Science and Technology** 172:66-79.

Gozho GN, Krause DO, Plaizier JC (2006) Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers. **Journal of Dairy Science** 89: 4404-4413.

Gozho GN, Plaizier JC, Krause DO, Kennedy AD, Wittenberg KM (2005) Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of Dairy Science** 88:1399-1403.

Hibbard B, Peters JP, Chester ST, Robinson JA, Kotarski SF, Warren J, Croom J, Hagler JWM (1995) The effect of Slaframine on salivary output and subacute, acute acidosis in growing beef steers. **Journal Animal Science** 73:516-525.

Hunt RJ, Allen D, Moore JN (1990) Effect of endotoxin administration on equine digital hemodynamics and starling forces. **American Journal of Veterinary Research** 51:1703-1707.

Huntington GB, Harmon DL, Richards CJ (2006) Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. **Journal of Animal Sciences** 84:E14–E24.

Hwang JY (2017) Doppler ultrasonography of the lower extremity arteries: anatomy and scanning guidelines. **Ultrasonography** 36:111-119.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2018), Pesquisa da Pecuária Municipal, Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>>

Ingle-Fehr JE, Baxter GM (1998) Evaluation of digital and laminar blood flow in horses given a low dose of LPS. **American Journal of Veterinary Research** 59:192-196.

Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC (2009) A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. **Journal of Dairy Science** 92:1060–1070.

King AM (2006) Development, advances and application of diagnostic ultrasound in animals. **The Veterinary Journal** 3:408-420.

Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J, Noordhuizen JPTM (2003) Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. **Journal of Veterinary Medicine Series A** 50:406-414.

Krehbiel CR, Britton RA, Harmon DL, Wester TJ, Stock RA (1995) The effect of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. **Journal of Animal Science** 73:3111-3121.

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

Menzies-Gow NJ, Bailey SR, Katz LM, Marr CM, Elliott J (2004) Endotoxin-induced digital vasoconstriction in horses: associated changes in plasma concentrations of vasoconstrictor mediators. **Equine Veterinary Journal** 36:273-278.

Miño N, Espino L, Barriero A (2008) Effects of medetomidine on Doppler variables of major abdominal arteries in normal dogs. **Veterinary Research Communications** 32:175-186.

Morgante M, Giancesella M, Casella S, Ravarotto L, Stelletta C, Giudice E (2009) Blood gas analyses, ruminal and blood pH, urine and faecal pH in dairy cows during subacute ruminal acidosis. **Comparative Clinical Pathology** 18:229-232.

Müller H, Heinrich M, Mielenz N, Reese S, Steiner A, Starke A (2017) Evaluation of arterial digital blood flow using Doppler ultrasonography in healthy dairy cows. **BMC Veterinary Research** 13:162-171.

Nagaraja TG, Bartley EE, Fina LR, Anthony HD (1978) Relationship of rumen gram-negative bacteria and free endotoxin to lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Sciences** 47:1329-1337.

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

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

Nordlund KV, Garrett EF, Oetzel GR (1995) Herd-based rumenocentesis: a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian** 17:S48-S56.

Novellas R, Gopegui RR, Espada Y (2007) Effects of sedation with midazolam and butorphanol on resistive and pulsatility indices in healthy dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 48:276–280.

Oetzel GR (2003) Subacute ruminal acidosis in dairy cattle. **Advances in Dairy Technology** 15:307-317.

Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR (1998) Acidosis in cattle: a review. **Journal of Animal Sciences** 76:275-286.

Pawson P, Nolan AM, Reid J, Boyd JS, Paterson C (2002) Changes in the Doppler waveform of the ovine femoral artery following infusion of vasoactive agents: a preliminary study. **Research in Veterinary Science** 73:215-221.

Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW (2009) Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal** 176:21-31.

Pilachai R, Schonewille JT, Thamrongyoswittayakul C, Aiumlamai S, Wachirapakorn C, Everts H, Hendriks (2012) WH Starch source in high concentrate rations does not affect rumen pH, histamine and lipopolysaccharide concentrations in dairy cows. **Livestock Science** 150:135-142.

Radostitis OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (Ed.) (2007) *Veterinary Medicine* London: Saunders Elsevier, 2065 p.

Sobrinho AGS (Ed.) (2006) *Criação de ovinos*. Jaboticabal: FUNEP, 302p.

Szatmári V, Sótonyi P, Vörös K (2001) Normal Duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 42:93-107.

Viana JGA, Moraes MRE, Dorneles JP (2015) Dinâmica das importações de carne ovina no Brasil: análise dos componentes temporais. **Semina: Ciências Agrárias** 36:2223-2234.

Winter AC (2008) Lameness in sheep. **Small Ruminant Research** 76:149-153.

CAPÍTULO 2 – Rumenostomia em dois tempos cirúrgicos com colocação de cânula de silicone flexível permanente em ovelhas

Resumo – Este estudo descreve a técnica de rumenostomia com colocação de cânula permanente de silicone, em dois tempos cirúrgicos, empregada em oito ovelhas utilizadas na pesquisa sobre acidose ruminal induzida experimentalmente. A rumenostomia em dois estágios operatórios permitiu ajuste e estabilidade da cânula adequados, boa aderência do rúmen à ferida cutânea e facilidade na implantação da cânula, além de ser efetiva para colheita de amostras de fluido ruminal por longos períodos.

Palavras-chave: ovinos, rúmen, acidose subaguda, fistulação, fluido ruminal

1. Introdução

A rumenostomia com colocação de cânula permanente é uma técnica cirúrgica na qual se realiza comunicação permanente entre o saco dorsal do rúmen e o meio exterior na fossa paralombar esquerda, acompanhada de colocação de cânula que permita a vedação e abertura do rúmen (Matera et al., 1989). Essa técnica tem como finalidade a terapêutica para timpanismos crônicos (como a Síndrome Vagal), auxiliar estudos experimentais de digestibilidade e degradabilidade, obtenção de amostras do fluido ruminal e acesso ao rúmen (Harmon e Richards, 1997; Saeed et al., 2007; Laflin e Gnad, 2008).

Há duas técnicas cirúrgicas de fistulação ruminal descritas na literatura: um e dois tempos cirúrgicos (Cattelan et al., 1990). A rumenostomia com colocação de cânula em um tempo cirúrgico consiste na rumenostomia e, posteriormente, colocação de cânula em um único ato cirúrgico (Matera et al., 1989; Stedile et al., 2008; Girardi et al., 2017). Usualmente, em ovinos, a fistulação e a canulação são realizadas em único tempo cirúrgico (Thyfault et al., 1975).

A técnica de dois tempos operatórios rotineiramente é indicada para bovinos, porém esta técnica demonstrou-se satisfatória também para ovinos (Phillipson et al., 1939; Cattelan et al., 1990). A realização da operação em dois estágios cirúrgicos consiste, no primeiro tempo cirúrgico, na fixação do rúmen à parede muscular

abdominal e, no segundo tempo cirúrgico, realização da comunicação do rúmen com o meio exterior e colocação da cânula (Cattelan et al., 1990).

A complicação mais importante da rumenostomia com colocação de cânula permanente é a peritonite e, conseqüentemente, a sepse e morte. Portanto, para reduzir a probabilidade de complicações no pós-cirúrgico, são necessárias estabilização da cânula, fixação adequada do rúmen à parede abdominal e vedação total da cânula (Saeed et al., 2007).

O presente estudo teve como objetivo descrever a técnica de rumenostomia em dois tempos cirúrgicos com colocação de cânula flexível permanente de silicone em ovelhas utilizadas em pesquisa sobre acidose ruminal subaguda induzida experimentalmente.

2. Material e métodos

Este estudo está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, sob protocolo n°5758/16.

Submeteu-se oito ovelhas adultas, mestiças Santa Inês, híginas, mantidas em baias, à rumenostomia em duas etapas cirúrgicas com colocação de cânula permanente de silicone. Todos os animais foram acompanhados diariamente por seis meses após a cirurgia.

Antes da cirurgia, os animais foram mantidos em jejum alimentar por 48 horas e hídrico por 24 horas. Previamente aos procedimentos anestésicos, a veia jugular externa esquerda de cada ovelha foi cateterizada com cateter descartável 16G (BD Angiocath®)¹. Por meio deste, administrou-se, como medicação pré-anestésica, diazepam², na dose 0,2 mg/kg/PC. Após dez minutos, também pelo cateter, foi realizada a indução anestésica utilizando-se propofol (Propovan®)³ na dose de 4 a 6 mg/kg/PC, e seguiu-se a intubação orotraqueal. A manutenção da anestesia foi feita

¹ BD Angiocath™ 16 GA x 1.88 IN – Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda., Juiz de Fora – MG.

² Hipolabor Farmacêuticas Ltda, Sabará, Minas Gerais, Brasil.

³ Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil.

com isoflurano diluído em oxigênio (Isoforine®)³, por via inalatória. Foi realizado fluidoterapia com ringer lactato, na taxa de infusão de 5 mL/kg/hora, ao longo da anestesia.

Com o animal em decúbito lateral direito realizou-se tricotomia do flanco esquerdo, seguida de antissepsia com iodopovidona degermante e solução alcoólica de iodopovidona. Realizou-se anestesia local paravertebral infiltrativa nos ramos dos nervos espinhais da décima terceira vértebra torácica, primeira e segunda vértebra lombar e em L invertido com cloridrato de lidocaína sem vasoconstritor (Xylestesin® 2%)³ diluída na proporção 1:1 em solução fisiológica. Realizou-se, no terço superior do flanco esquerdo, caudal à 13ª costela, incisão circular da pele obedecendo um molde do tamanho exato da cânula (1,5 polegadas / 3,8 centímetros de diâmetro). Seguiu-se a divulsão do tecido subcutâneo e hemostasia dos vasos de maior calibre com fio poliglactina 920 2-0 (Vicryl™)⁴. Incisou-se e divulsionou-se os músculos oblíquos abdominais externo e interno com tesoura. A parede do rúmen foi exposta e realizou-se sutura da serosa ruminal, peritônio, camadas musculares e pele com fio de algodão poliéster 0⁴, em ponto simples separado, ao redor da ferida cirúrgica (Fig. 1).

Realizou-se, por 12 dias após a cirurgia, como protocolo pós-operatório, a aplicação de iodopovidona tópica 2% sobre a ferida cirúrgica e pasta de unguento⁵, diariamente, ao redor desta. Iniciou-se, imediatamente após a cirurgia, antibioticoterapia com penicilina (Pentabiótico® Veterinário Reforçado)⁶, na dose de 30.000 UI/kg/PC, por via intramuscular, a cada 48 horas, perfazendo duas aplicações. Em associação, foi administrado dipirona sódica (D-500®)⁶, na dose de 30 mg/kg/PC por via intramuscular, duas vezes ao dia durante três dias consecutivos após a cirurgia.

Após este período de 12 dias, o animal foi colocado em decúbito lateral direito, os pontos cirúrgicos foram removidos e realizou-se incisão circular na parede

⁴ Ethicon, Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda., São Paulo, Brasil.

⁵ Vansil Indústria Veterinária, Descalvado, São Paulo, Brasil.

⁶ Zoetis Zoetis Indústria de Produtos Veterinários, Campinas, São Paulo, Brasil.

ruminal exposta (Fig. 2), na qual foi inserida uma cânula ruminal de silicone com 1,5 polegadas de diâmetro ou aproximadamente 3,8 centímetros⁷ (Fig. 3).

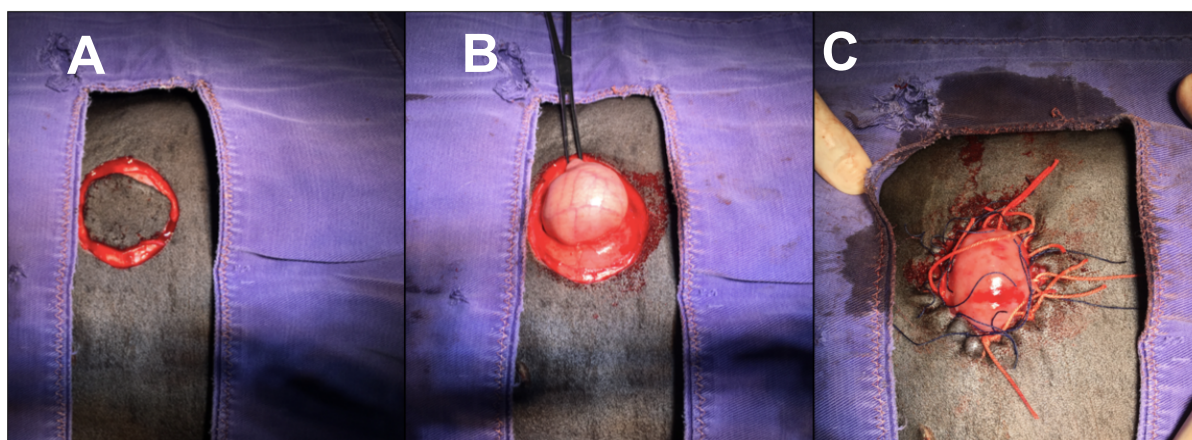


Figura 1. Rumenostomia com colocação de cânula permanente. Primeiro período cirúrgico em ovino, em decúbito lateral direito: (A) incisão circular na pele, respeitando o tamanho do diâmetro da cânula, no terço superior do flanco esquerdo, caudal à 13ª costela, seguida por divulsão do tecido subcutâneo e hemostasia dos vasos de maior calibre com fio poliglactina 2-0; (B) incisão e divulsão dos músculos abdominais oblíquo externo e oblíquo interno com tesoura, no sentido das fibras musculares; (C) sutura da serosa ruminal, peritônio, camadas musculares e pele com fio de algodão 0, em ponto simples separado (UNESP – Jaboticabal, 2019).

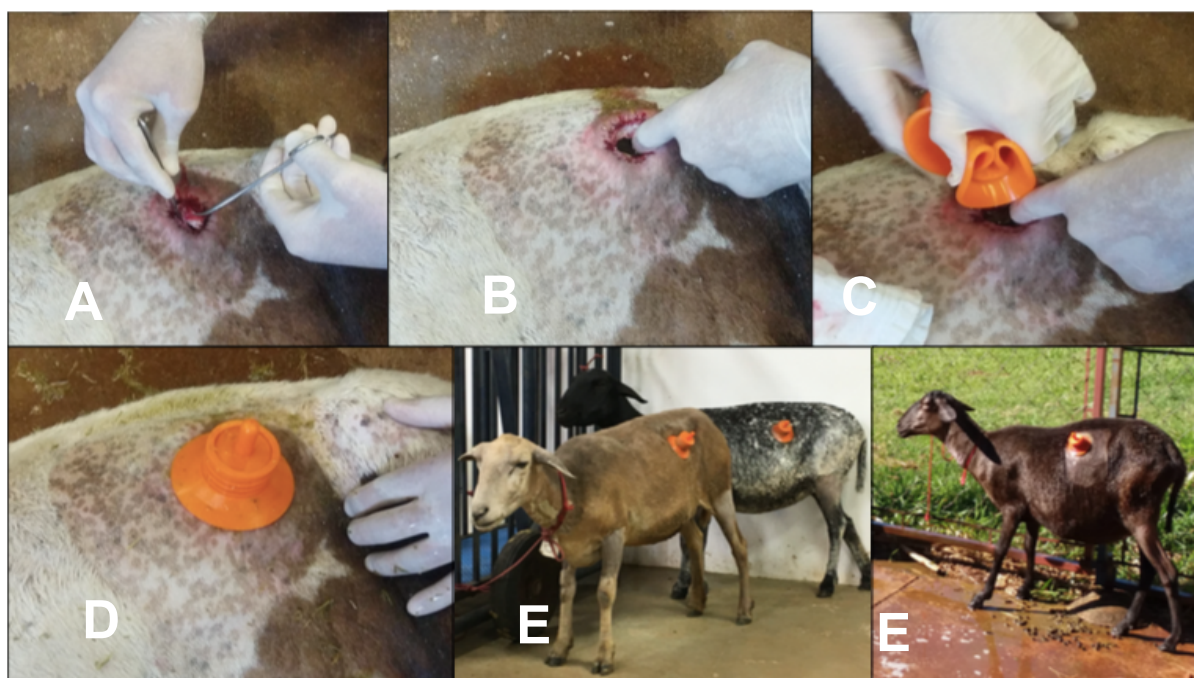


Figura 2. Rumenostomia com colocação de cânula permanente. Segundo período cirúrgico em ovino: (A) retirada dos pontos e incisão do tecido ruminal necrosado; (B) formação de fístula comunicando o rúmen e o meio externo. Observa-se boa cicatrização da ferida cirúrgica e aderência do rúmen à parede abdominal; (C)

⁷ Kehl Indústria e Comércio Ltda ME, São Carlos, São Paulo, Brasil.

encaixe da cânula na fístula; (D) cânula de silicone fechada e estabilizada perfeitamente na fístula; (E) ovelhas com a cânula flexível de silicone permanente (UNESP – Jaboticabal, 2019).

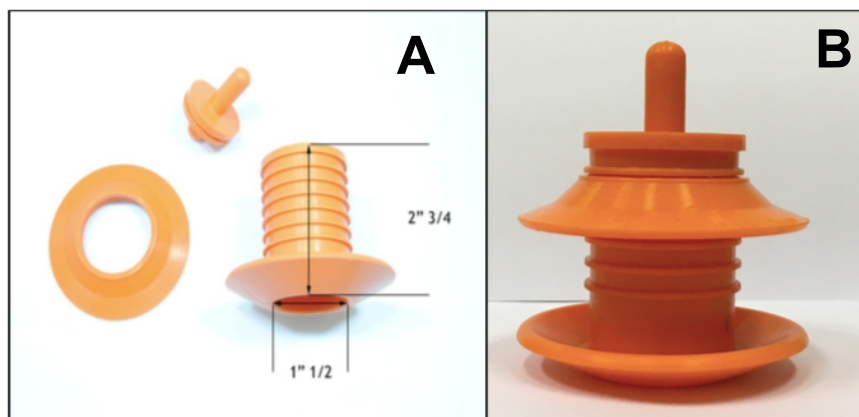


Figura 3. Cânula flexível de silicone com 1,5 polegadas: (A) cânula desmontada. Nota-se presença de depressões para melhor encaixe e estabilização da cânula entre o rúmen e a pele; (B) vista lateral da cânula montada e fechada (UNESP – Jaboticabal, 2019).

3. Resultados e Discussão

O procedimento cirúrgico prolongou-se por, aproximadamente, duas horas para cada animal. A rumenostomia foi realizada com jejum prévio, sob anestesia geral inalatória e anestesia local infiltrativa, não sendo observadas intercorrências durante a anestesia e a cirurgia; tampouco presença de refluxo gástrico espontâneo. A recuperação anestésica foi satisfatória e, no pós-cirúrgico imediato, os animais apresentaram posição quadrupedal e alimentaram-se normalmente. Tais observações corroboram os relatos de Elices et al. (2010) e Girardi et al. (2017) de que os ovinos voltam a se alimentar e a manifestar comportamentos normais para espécie em menos de 12 horas após a cirurgia.

A incisão circular realizada na pele e, posteriormente, na musculatura, obedecendo ao tamanho do diâmetro da cânula, foi descrito por Teixeira et al. (2014) em búfalos e Muzzi et al. (2009) em bovinos e ovinos. No presente estudo, esta técnica foi satisfatória e promoveu o tamanho ideal para o encaixe da cânula e estabilização da mesma.

O espaço de tempo de 12 dias entre os períodos cirúrgicos (Matera et al., 1989; Teixeira et al., 2014) permitiu que o rúmen apresentasse adequada aderência à pele, otimizando a execução da segunda fase operatória. O intervalo entre o primeiro estágio operatório e o segundo estágio deve ser adequado, pois, se a segunda fase operatória for realizada precocemente, há maior probabilidade de deiscência da sutura e abertura da ferida. No entanto, se for realizada tardiamente, a abertura da fístula fica prejudicada e a inserção da cânula fica dificultosa, gerando traumas na parede abdominal (Saeed et al., 2007). Saeed et al. (2007) preconizaram cinco dias de intervalo entre os períodos cirúrgicos, já Cattelan et al. (1990) oito dias, ambos os estudos relaram boa aderência do rúmen à parede abdominal. Observou-se completa epitelização da ferida cirúrgica após 30 dias do procedimento da rumenostomia, assim como descrito por Cattelan et al. (1990) e Muzzi et al. (2009).

Apesar do procedimento cirúrgico ter sido realizado em decúbito lateral direito, o que favorece a contaminação da cavidade abdominal com conteúdo ruminal (Muzzi et al., 2009), não houve derramamento do conteúdo ruminal na cavidade abdominal e os ovinos não apresentaram sinais de peritonite. Complicações importantes como peritonite, sepse (Cattelan et al., 1990), hemorragia, tétano (Stedile et al., 2008) e enfisema subcutâneo (Cattelan et al., 1990) não foram observados neste estudo. Porém, observou-se presença de miíase, mesmo com uso de repelente, em três animais entre cinco e 10 dias da retirada dos pontos e encaixe da cânula, atribuindo-se esta complicação ao clima quente e à presença de moscas nas baias (Sanni et al., 2002; Teixeira et al., 2014).

Observou-se, em dois animais, presença de pus na ferida cirúrgica e pequena área de necrose tecidual cinco dias após a retirada dos pontos e colocação de cânula. Segundo Ducharme (1990), não é incomum a ocorrência de pontos de necrose na borda da ferida cirúrgica devido à compressão dos tecidos exercida pela cânula.

A expulsão das cânulas é uma complicação recorrente após a cirurgia de rumenostomia e colocação de cânula permanente (Thyfault et al., 1975; Muzzi et al., 2009; Girardi et al., 2017). Como a musculatura da parede abdominal dos ovinos é mais delgada, o perfeito acoplamento e estabilidade da cânula fica comprometido. Este fato favorece a queda das cânulas, principalmente, após consumirem alimentos

e com aumento dos movimentos ruminais (Saeed et al., 2007; Muzzi et al., 2009). No presente estudo, houve queda da cânula de dois animais, um animal após um mês da segunda fase operatória e outro ovino após três meses. Ambas cânulas foram trocadas por outras com diâmetro de 3 polegadas (7,6 centímetros), as quais se ajustaram perfeitamente, não ocorrendo quedas recidivantes.

O extravasamento de conteúdo ruminal pela fístula é uma complicação apontada por vários autores (Thyfault et al., 1975; Saeed et al., 2007; Stedile et al., 2008, Teixeira et al., 2014). No presente estudo, todos os animais apresentaram extravasamento de conteúdo ruminal, porém este não causou debilidade ou queda do escore corporal, apenas queda dos pelos na região do abdome por onde o conteúdo ruminal escorria e, ocasionalmente, presença de moscas, a qual era controlada por higienização e aplicação de repelentes. Esses achados são semelhantes aos encontrados por Stedile et al. (2008), Teixeira et al. (2014) e Girardi et al. (2017). Ao fim dos seis meses de acompanhamento, a cânula de silicone apresentou-se íntegra, sem inflamação dos tecidos circunvizinhos, sem deformações, com flexibilidade e bom fechamento, assim como encontrado por Stedile et al. (2008) e Girardi et al. (2017).

Múltiplas colheitas de amostras de fluido ruminal foram realizadas durante o experimento de indução de acidose subaguda em ovinos, sendo facilmente exequíveis, com a cânula mantendo-se estável e com bom fechamento neste período, corroborando com Saeed et al. (2007).

4. Conclusão

A rumenostomia em dois estágios operatórios permite ajuste e estabilidade adequados para a cânula, boa aderência do rúmen à ferida cutânea e facilidade na implantação da cânula, além de ser efetiva para coleta de amostras ruminais por longos períodos.

5. Referências

- Cattelan JW, Canola JC, Valadão CAA, Macoris DG (1990) Rumenostomia canulada em dois tempos operatórios em bovinos e ovinos. **ARS Veterinária** 6:112-119.
- Ducharme NG (1990) Surgery of the bovine forestomach compartments. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice** 6:371-397.
- Elices MR, Revuelta RL, Martínez-Darve J, Miguélez FS (2010) Surgery technique for ovine ruminal cannulation. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias** 4:41-52.
- Girardi AM, Sousa SS, Sabes AF, Bueno GM, Módolo TJC, Bonacin YS, Pimenta BA, Marques JA, Marques LM (2017) One-stage rumen fistulation with permanente silicone cannula in sheep. **Nucleus Animalium** 9:91-96.
- Harmon DL, Richards CJ (1997) Considerations for gastrointestinal cannulations in ruminants. **Journal of Animal Science** 75:2248-2255.
- Laflin SL, Gnad DP (2008) Rumen Cannulation: Procedure and Use of a Cannulated Bovine. **Veterinary Clinics Food Animal Practice** 24:335-340.
- Matera A, Spicciati W, Holzchuh MP (1989) Fístula experimental do rúmen em bovinos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo** 26:223-227.
- Muzzi LAL, Muzzi RAL, Gabellini ELA (2009) Técnica de fistulação e canulação do rúmen em bovinos e ovinos. **Ciência e Agrotecnologia** 33:2059-2064.
- Phillipson AT, Innes JRM (1939) Permanent stomach fistulae in ruminants. **Quarterly Journal of Experimental Physiology** 29:333-341.
- Saeed A, Pir-Mohammadi R, Pour-Hasani FA (2007) two-stage rumen cannulation technique in sheep. **Journal of Animal and Veterinary Advances** 6:29-32.
- Sanni BD, Olainipekun EO, Sackey AK, Fadason ST, Gyang EO (2002) Post-surgical complications from students` large animal surgical exercise. **Nigerian Veterinary Journal** 23:40-45.
- Stedile R, Beck CAC, Nóbrega FS, Silva Filho APF, Ferreira MP, Alievi MM, Schiochet F, Bordin AI, Gonzalez PC, Lampert M (2008) Rumenostomia com colocação de cânula flexível em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae** 36:35-38.
- Teixeira PPM, Silva MAM, Viana RB (2014) Two-stage Rumenostomy in Bufaloes. **Acta Scientiae Veterinariae** 42:1-5.
- Thyfault HA, Leffel EC, Huang MD (1975) Simplified method for producing permanent ruminal fistulae. **Journal of Dairy Science** 58:1899-1901.

CAPÍTULO 3 – Oscilações diárias dos valores de pH ruminal, fecal e urinário de ovinos submetidos a acidose ruminal subaguda

Resumo – A acidose ruminal subaguda é comum em rebanhos de ruminantes de alta produção, pois está associada ao consumo excessivo de carboidratos não estruturados e escassez da ingestão de volumosos. Portanto, caracteriza-se a acidose ruminal subaguda como doença metabólica de ruminantes alimentados com dieta de alta concentração de carboidratos associado com a diminuição do pH ruminal. O presente estudo avaliou as flutuações diárias dos valores do pH ruminal, pH fecal e pH urinário em ovelhas que receberam dietas com alto teor de concentrado. Foram utilizadas oito ovelhas adultas, distribuídas em grupo tratado (GT, cinco animais, que receberam alta porcentagem de concentrado na dieta) e grupo controle (GC, três animais, alimentados com feno). Para a indução da ARS, as ovelhas do GT receberam dieta na qual foram incluídos ao volumoso, diariamente, 10% de alimento concentrado farelado até completar 80%, porcentagem mantida até finalizar os 30 dias experimentais. Resultados observados no GT foram: diminuição do pH ruminal e aumento do pH fecal e urinário. Os menores valores de pH ruminal e os maiores valores de pH fecal do GT concentraram-se do oitavo até o 17º dia experimental, e, os valores do pH urinário apresentaram diferença significativa do terceiro ao oitavo dia e 27º dia após a indução da doença. Concluiu-se que o incremento de carboidrato na dieta causou alterações no pH ruminal, fecal e urinário.

Palavras-chave: ARS, ovelhas, fluido ruminal, pH fezes, pH urina

1. Introdução

A acidose ruminal subaguda (ARS) é caracterizada pelo decréscimo anormal do pH ruminal e, geralmente, está associada ao consumo em excesso de carboidratos não estruturados e diminuição da ingestão de fibras/volumoso (Oetzel, 2003; Enemark, 2009; Plaizier et al., 2009).

O crescimento do consumo de carne ovina, acompanhado do aumento de confinamentos, acarreta em maior susceptibilidade para ARS. Esta enfermidade está associada a problemas econômicos como alto custo com tratamentos, impacto ao

bem-estar animal, queda da produtividade e aumento de descarte de animais (Kleen et al., 2003).

A ARS é comum em rebanhos de ruminantes de alta produção, pois estes sofrem com alterações na dieta sem o período de adaptação ruminal necessário, ocorrendo, assim, queda no pH ruminal (Nocek et al., 2002) e alterações metabólicas (Plaizier et al., 2009). Portanto, o monitoramento do pH ruminal é de suma importância para o diagnóstico da ARS (Enemark et al., 2002). Alguns estudos definem a ARS somente baseados na diminuição do pH ruminal, considerando-se a ARS instalada quando o pH ruminal permanece abaixo de 5,5 (Nocek, 1997; Goad et al., 1998). Outros propõem que a manutenção de pH ruminal 5,6 durante três horas em um dia é caracterizado como ARS (Kleen et al., 2003; Gozho et al., 2005). Garret et al. (1999) sugerem que o pH ruminal deve estar em torno de 5,5 independente da duração e Beauchemin et al. (2003) sugerem em 5,8 como pH ruminal para a ARS.

A flutuação do pH ruminal é considerável ao longo de 24 horas, sendo ainda mais expressiva com a ingestão de dietas ricas em carboidratos fermentescíveis (Krause e Oetzel, 2006; Nagaraja e Titgemeyer, 2007). A amplitude da diminuição do pH ruminal e a duração dos episódios em que o pH fica abaixo dos valores fisiológicos para ruminantes são fatores importantes para o desencadeamento de quadros sistêmicos (Nocek, 1997).

O objetivo deste estudo foi avaliar as flutuações diárias dos valores do pH ruminal, pH fecal e pH urinário em ovelhas que receberam dietas com alto teor de concentrado (80% MS), com o intuito de identificar o momento de instalação da ARS.

2. Material e métodos

Este estudo está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, sob protocolo n°5758/16.

2.1. Período de adaptação

Foram utilizadas oito ovelhas adultas, mestiças Santa Inês, híbridas, criadas a campo. Os animais foram mantidos em baias providas de piso de borracha¹, 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.

No período pré-experimental os animais foram alimentados 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 (Tortuga Ovinofós com minerais orgânicos)².

Neste período, os animais passaram por desverminação com ivermectina (Ivermectan 1%)³, por via subcutânea, na dose de 0,2 mg/kg e albendazol (Biozen®)⁴, por via oral, na dose de 15 mg/kg (Hajikolaei et al., 2006) e foram submetidos à rumenostomia em duas etapas cirúrgicas com colocação de cânula permanente, conforme descrito no capítulo 2 (Cattelan et al., 1990; Teixeira et al., 2014).

Após a realização da cirurgia, com o intuito de cessar os processos inflamatórios decorrentes da colocação das cânulas e adaptar as ovelhas à dieta basal preconizada pelo estudo, foi respeitado um período de dois meses.

2.2. Período experimental

As ovelhas foram distribuídas em dois grupos: grupo controle (GC); formado por três animais e grupo tratado (GT), com cinco animais. Para indução da ARS, o GT 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 – Guabi Ruminúcleo Ovinos 40 ADE, Mogiana Alimentos S/A, Campinas, Brasil), até completar 80% da MS (Girardi, 2016), porcentagem mantida até o final

¹ Nova Vedovati Indústria e Comércio Ltda, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

² Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, São Paulo, São Paulo, Brasil.

³ Usinas Químicas Brasileiras S. A., Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

⁴ Biofarm Química e Farmacêutica Ltda, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

de 30 dias experimentais. Já o GC recebeu dieta, baseada no consumo de matéria seca (MS) do período de adaptação, somente de volumoso. 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.

2.3. Análise do pH do Líquido Ruminal, Fezes e Urina

As amostras de fluido ruminal e fezes foram colhidas em intervalos de quatro horas (6h00, 10h00, 14h00, 18h00, 22h00, 02h00) e a colheita das amostras de urina realizadas a cada 12 horas (6h00 e 18h00) durante os 30 dias.

As amostras do fluido ruminal foram obtidas por meio da fístula ruminal, utilizando-se uma pipeta descartável, sendo coletados 10 mL, acondicionados em tubo cônico estéril tipo Falcon de 15 mL e analisados imediatamente. No mesmo momento da colheita das amostras do líquido ruminal, foram colhidos 2 g de fezes frescas (diretamente da ampola retal ou após evacuação espontânea, antes do contato com o piso), os quais foram acondicionados em copos coletores e diluídos em 6 mL de água ultrapura. Amostras de urina foram colhidas em copos estéreis de 80 mL com tampa, resultantes de micção espontânea ou após indução da micção (Jackson e Cockcroft, 2002; Ortolani, 2003). Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração em isopor com gelo reciclável até o momento da análise, que foram realizadas imediatamente.

O pH urinário, do fluido ruminal e das fezes foi mensurado em pHmetro digital Digimed DM20⁵.

2.4. Análise estatística

Utilizando-se software de análise estatística (SAS 9.1)⁶, avaliou-se os momentos (colheitas) dentro de cada grupo pela análise de variância para medidas

⁵ Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁶ 14 SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.

repetidas. A comparação entre os grupos (GT/GC) foi realizada pelo teste t de Student. O nível de significância adotado foi 5%.

3. Resultados e Discussão

Considerou-se a presença da ARS quando o pH ruminal permanece abaixo de 5,8 por qualquer período prolongado de tempo (Beauchemin et al., 2003). A diminuição no pH ruminal é causada pelo aumento na concentração de ácidos graxos voláteis sem aumentar, concomitante, a concentração de lactato como ocorre na acidose ruminal aguda (Krause e Oetzel, 2006).

No presente estudo, as médias do pH ruminal, durante 24h, das ovelhas do grupo tratado (GT) ($6,11 \pm 0,20$), apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparado com as médias do pH ruminal das ovelhas do grupo controle (GC) ($6,57 \pm 0,16$) (Fig.1). Os dias 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 GT 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.

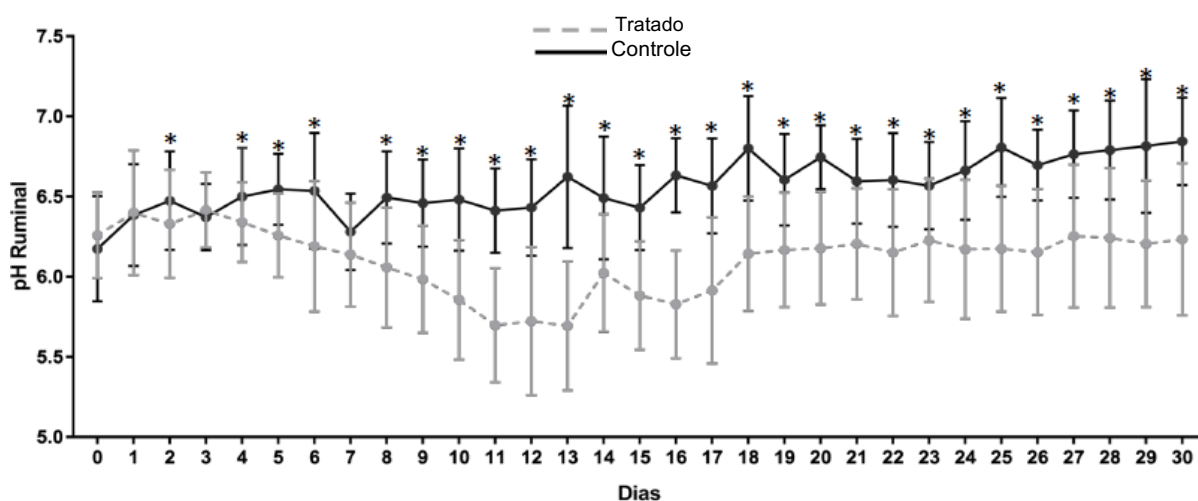


Figura 1. Representação gráfica das médias e desvios padrão diários do pH do líquido ruminal de ovinos dos grupos tratado e controle, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). * $P < 0,05$

Em bovinos, segundo Steele et al. (2011), na primeira semana da introdução da dieta com alta concentração de amido consegue-se diagnosticar a ARS por meio da aferição do pH ruminal, porém, a partir da terceira semana pode ser difícil este diagnóstico. Os autores acreditam que após três semanas da dieta com alto teor de concentrado ocorra adaptação ruminal à ARS. No presente estudo, mesmo ocorrendo diferença significativa entre os grupos até o último dia experimental, nota-se que após o 17º dia (terceira semana experimental) houve uma tendência de adaptação à dieta, onde os valores do pH ruminal tenderam a ficar mais próximos dos valores fisiológicos.

Principalmente no período entre o sexto e o 30º dia experimental, o pH ruminal apresentou valores mais baixos em 4h, 8h e 12h após o fornecimento da alimentação, aumentando gradualmente em 16h e 20h, e encontrando-se dentro da normalidade 24h após a ingestão, sem diferença com o GC (Fig. 2). Estudo com vacas leiteiras demonstrou que o pH ruminal diminuiu após 8h da ingestão alimentar rica em carboidratos e volta gradualmente a normalizar-se 10h após a refeição (Nocek et al., 2002). Outras pesquisas, as quais avaliaram o pH ruminal de bovinos confinados com dietas de alto teor de carboidratos, observaram queda mais acentuada do pH ruminal após 12h (González et al., 2012) e 48h após a ingestão da dieta rica em alimento concentrado (Goad et al., 1998).

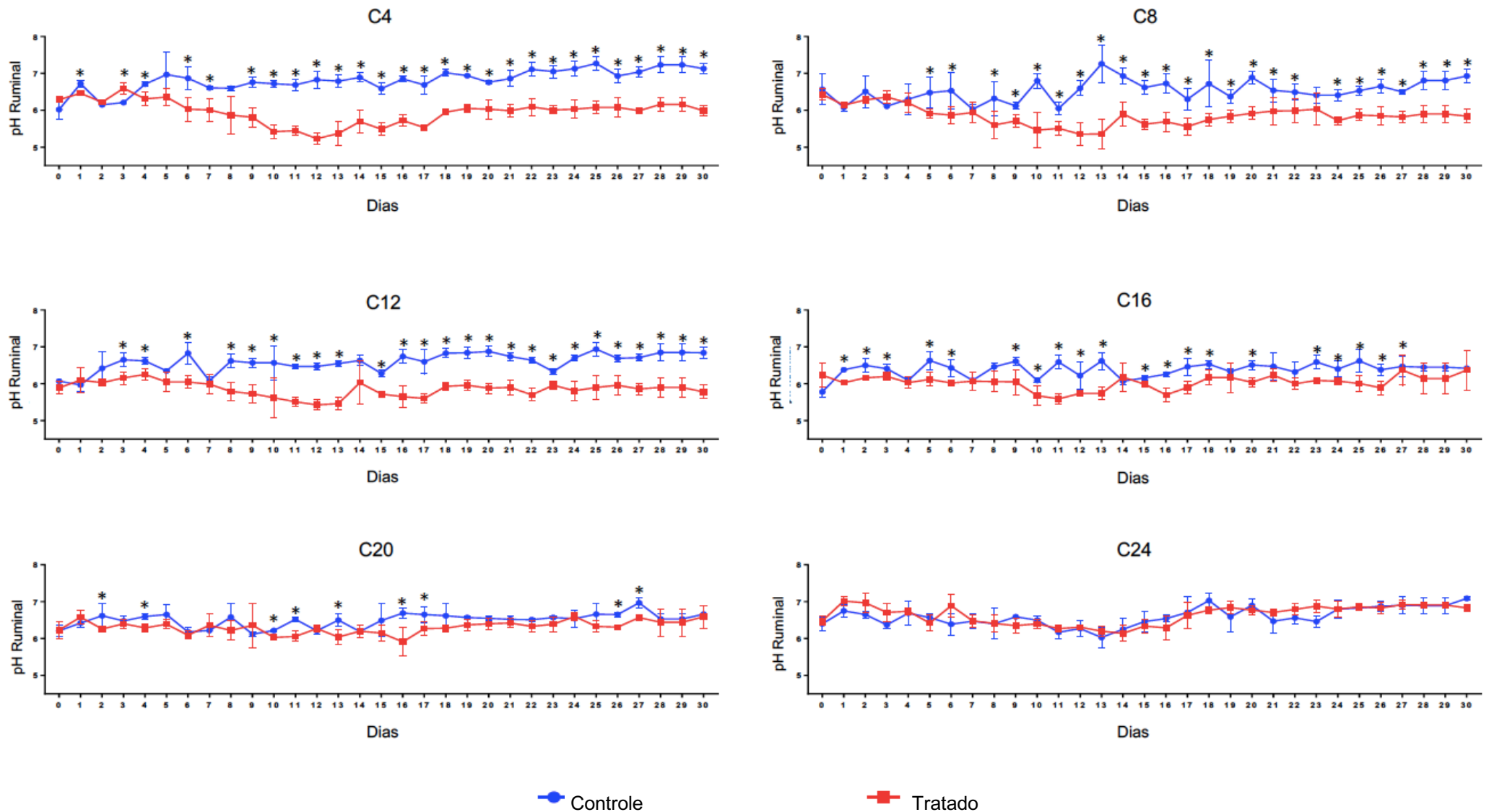


Figura 2. Representação gráfica das médias e desvios padrão do pH do líquido ruminal de ovinos dos grupos tratado (GT) e controle (GC), obtidas quatro (C4), oito (C8), 12 (C12), 16 (C16), 20 (C20) e 24 (C24) horas após o fornecimento do alimento concentrado, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). *P<0,05

As médias dos valores de pH fecal durante 24h do GT apresentaram diferença significativa ($P<0,05$) quando comparadas com as do GC do quarto ao sexto dia e do oitavo até o 16º, 20º, 23º e 30º dia experimental (Fig. 3), sendo que o GT ($7,77\pm0,12$) apresentou maiores valores de pH fecal em relação ao GC ($7,66\pm0,31$). Os dias que apresentaram maiores valores foram 11º, 13º e 20º dia experimental. Já o 27º e 30º dia experimental, também apresentaram diferença na comparação GT com GC, porém os valores foram menores no GT quando comparado ao GC. Entretanto, quando comparado o basal do GT ($7,60\pm0,35$) com as demais coletas deste grupo não houve diferença significativa ($P<0,05$), mostrando que o pH fecal oscilou em comparação ao GC, mas manteve constante em relação ao basal do próprio GT. Portanto, o pH fecal não demonstrou alterações importantes com a indução da doença, assim como descrito por Enemark (2009) e Li et al. (2012).

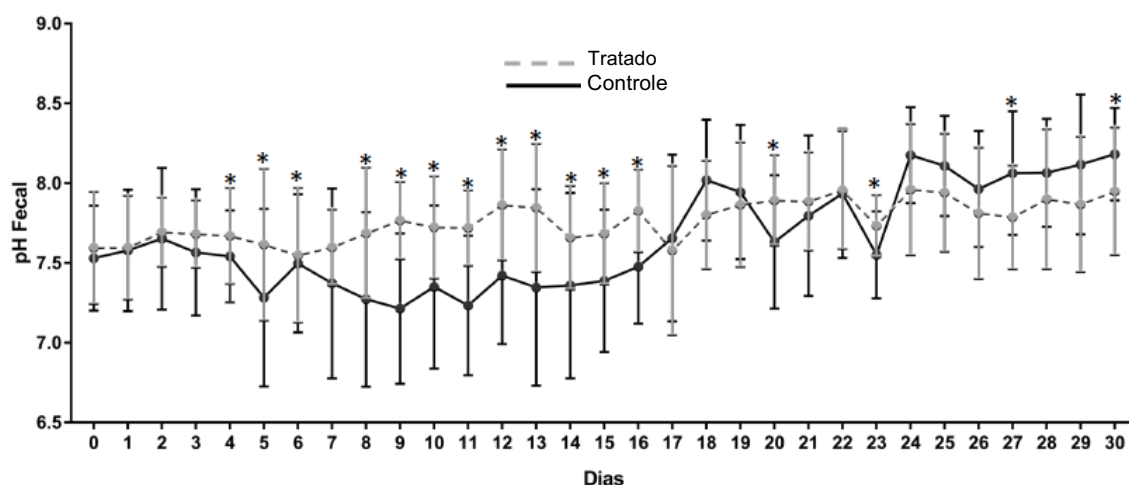


Figura 3. Representação gráfica das médias e desvios padrão diários do pH das fezes de ovinos dos grupos tratado e controle, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). * $P<0,05$

Em relação ao momento após fornecimento da dieta, quatro horas após a ingestão do alimento concentrado o GT diferiu significativamente do GC no sétimo, nono, 11º, 13º, 15º e 23º dia experimental. Às 8h após a ingestão, o pH fecal encontrou-se sem diferença significativa com o GC. O pH fecal apresentou valores mais altos 12h após o fornecimento da dieta do oitavo ao 15º, 19º, 20º e 23º dia

experimental. Com 16h, os dias que apresentaram diferença significativa pós alimentação foram quinto, sétimo, oitavo, do 11º ao 13º, 16º e 19º. E o GT apresentou diferença significativa com GC em dias esporádicos em 20h e 24h após a alimentação (Fig. 4, pág. 34). O período de dias em que o pH fecal do GT se apresentou significativamente diferente do GC corroborou o período onde houve menor média do pH ruminal. O pH fecal frequentemente espelha o pH ruminal após um tempo de latência de 12 a 18 horas (Luan et al., 2016). O aumento do pH das fezes, nestes períodos, pode estar relacionado com o aumento da absorção dos ácidos graxos voláteis pelo epitélio ruminal, secreção de bicarbonato ao longo do trajeto intestinal e aumento na secreção de bile, principalmente, quando o conteúdo do duodeno se encontra com pH abaixo da normalidade para a espécie (Gabel et al., 1991; Cunningham, 2004; Penner et al., 2009, Reece et al., 2015). Sendo estes fatores importantes para alcalinização do conteúdo ácido proveniente do rúmen. Li et al. (2012) analisaram o pH fecal duas vezes ao dia (9h00 e 15h00) de vacas leiteiras submetidas à dieta com grãos e, constataram aumento do pH fecal na segunda coleta do dia (15h00), relatando não haver interação das análises seriadas do pH fecal com as alterações promovidas pela ARS.

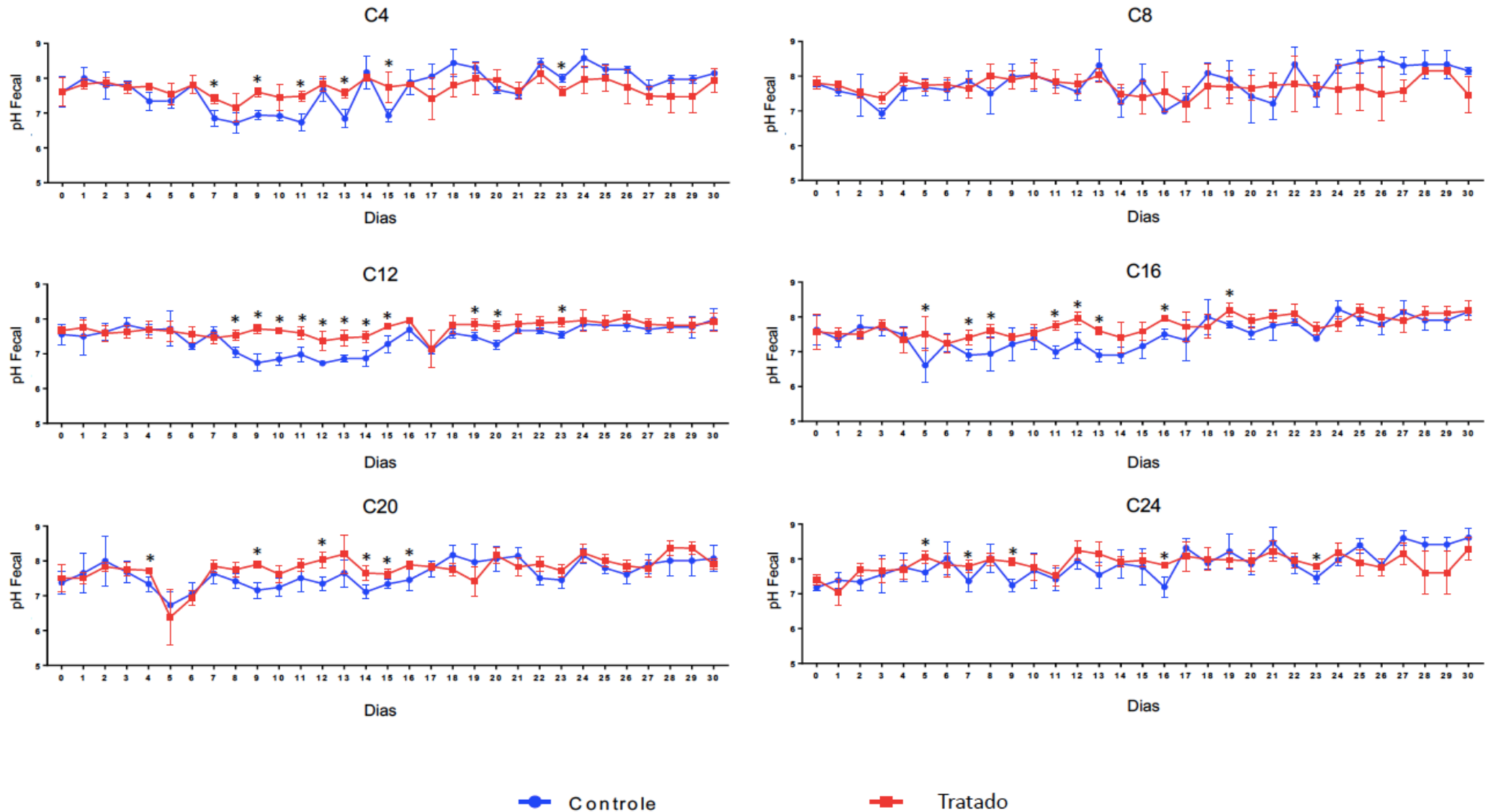


Figura 4. Representação gráfica das médias e desvios padrão do pH das fezes de ovinos dos grupos tratado (GT) e controle (GC), obtidas quatro (C4), oito (C8), 12 (C12), 16 (C16), 20 (C20) e 24 (C24) horas após o fornecimento do alimento concentrado, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). * $P < 0,05$

As médias do pH urinário entre os grupos apresentaram-se significativamente diferentes ($P < 0,05$) no período do terceiro ao oitavo dia e 27º dia após a indução da ARS. Na maioria dos dias as médias dos valores de pH do GT ($6,47 \pm 0,26$) foram superiores as do GC ($6,20 \pm 0,42$) (Fig. 5). Na ARS acontece aumento da excreção renal de H^+ na tentativa de compensar a possível, acidose metabólica (Enemark, 2009). Esperava-se que a depressão no pH ruminal na ARS provocasse diminuição dos valores de pH urinário (Gianesela et al., 2010, Minervino, 2014; Girardi, 2016). Alguns estudos na literatura apontam que não há alterações dignas de nota no pH urinário em bovinos submetidos à ARS (Roche et al., 2005; Enemark, 2009; Morgante et al., 2009). Porém, no presente estudo, observou-se aumento do pH urinário do GT quando comparado ao GC. Ao comparar o basal do GT ($5,85 \pm 0,69$) com os demais dias do mesmo grupo constatou-se que a diferença significativa ocorreu somente no oitavo e 16º dia experimental, correspondentes ao período de menor pH ruminal. Supostamente, o aumento do pH urinário neste período pode ser resultado da desidratação sistêmica e aumento da concentração da urina (Li et al., 2012).

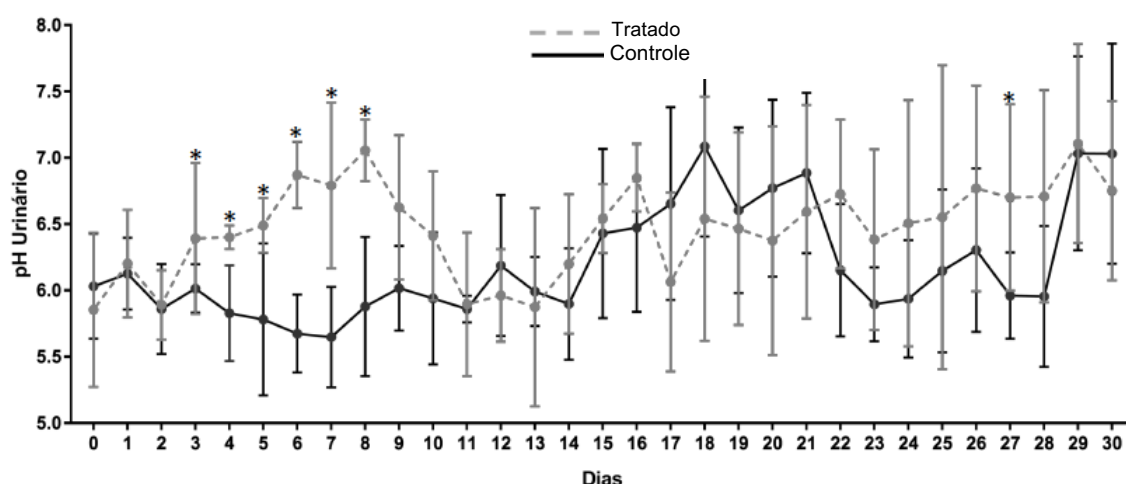


Figura 5. Representação gráfica das médias e desvios padrão diários do pH da urina de ovinos dos grupos tratado e controle, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). * $P < 0,05$

Ao comparar GT com o GC o pH urinário apresentou valores maiores e diferiu estatisticamente 12 horas após o fornecimento da dieta, no quarto, sexto ao oitavo

dia, 10º, 16º e do 21º ao 25º, 27º e 28º dia experimental. Portanto, o GT apresentou 13 dias de pH da urina maior que do GC. Já 24 horas após a ingestão alimentar o pH urinário apresentou valores superiores no GT, em relação ao GC, no sexto e oitavo dia experimental, e no 17º, 19º, 20º e 21º dia experimental observou-se diminuição dos valores de pH urinário (Fig. 6).

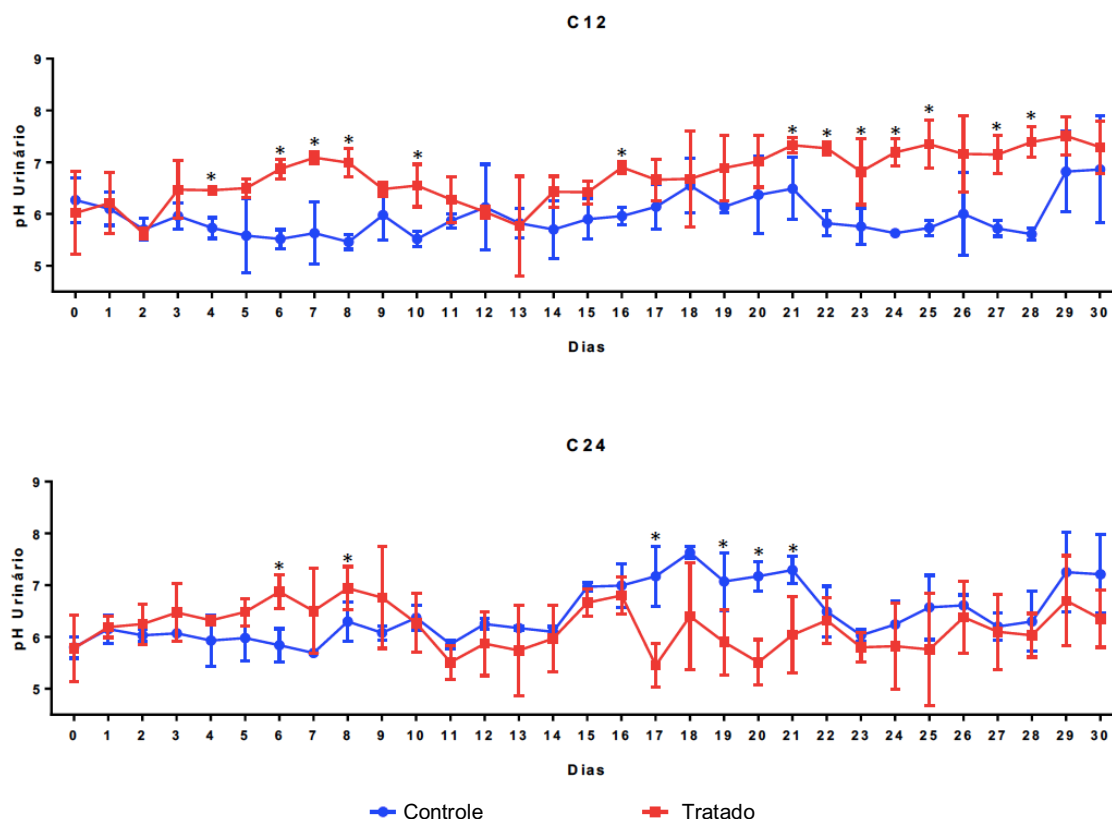


Figura 6. Representação gráfica das médias e desvios padrão da variável pH da urina de ovinos dos grupos tratado (GT) e controle (GC), obtidas quatro 12 (C12) e 24 (C24) horas após o fornecimento do alimento concentrado, em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). *P<0,05

Li et al. (2012) analisaram duas vezes ao dia (9h00 e 15h00) o pH urinário de vacas leiteiras submetidas a dieta rica em grãos e, constataram que os valores de pH eram menores na segunda análise do dia (15h00). No presente estudo, notou esporadicamente este fato em 30 dias experimentais, quatro dias o pH urinário com valores mais baixos 24h após ingestão da dieta e 12 dias os valores de pH urinário maiores 12h após ingestão da dieta.

O período de dias que o pH urinário permaneceu com valores menores 24h após a ingestão da dieta rica em carboidrato aproxima-se do período de queda acentuada do pH ruminal (oitavo até o 17º dia experimental). Como a eliminação de H^+ em pequenos ruminantes é realizada, principalmente, pelos rins (Enemark et al., 2002), provavelmente neste período houve tendência de compensação renal da acidose metabólica (Jones, 2010).

4. Conclusão

Este estudo demonstrou que a ingestão de dietas com alto teor de carboidrato e baixo teor de volumoso causou alterações significativas no pH ruminal, fecal e urinário. Conclui-se que o pH do líquido ruminal apresentou menores valores e maior flutuação 4h, 8h e 12h após a ingestão da alimentação, o pH das fezes e pH da urina apresentaram maiores valores e maior flutuação 12 horas após a ingestão da dieta. Constatou-se que ARS iniciou-se a partir do oitavo dia experimental.

5. Referências

- Beauchemin KA, Yang WZ, Rode LM (2003) Effects of particle size of alfafa based dairy cows diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science** 86:630-643.
- Cattelan JW, Canola JC, Valadão CAA, Macoris DG (1990) Rumenostomia canulada em dois tempos operatórios em bovinos e ovinos. **ARS Veterinária** 6:112-119.
- Cunningham JG (2004) Digestão: processos fermentativos. In: Cunningham JG (Ed.) **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogans, p. 288-311.
- Enemark JMD, Jørgensen RJ, Enemark PS (2002) Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review. **Veterinarija ir Zootechnika** 20:16-29.
- Enemark JMD (2009) The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. **The Veterinary Journal** 176:32-43.
- Gabel G, Bestmann M, Martens H (1991) Influences of diet, short-chain fatty acids, lactate and chloride on bicarbonate movement across the reticulo-rumen wall of sheep. **Journal of Veterinary Medicine Series A** 38:523-529.
- Garret EF, Pereira MN, Nordlund KV, Armentano LE, Goodger WJ, Oetzel GR (1999) Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 82:1170-1178.

Gianesella M, Morgante M, Cannizzo C, Stefani A, Dalvit P, Messina V, Giudice E (2010) Subacute ruminal acidosis and evaluation of blood gas analysis in dairy cow. **Veterinary Medicine International** 1-4.

Girardi AM (2016) **Acidose ruminal subaguda em ovinos Santa Inês: estudo clínico, laboratorial e avaliação da laminite por termografia infravermelha e radiologia digital**. 2016. 136f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Goad DW, Goad CL, Nagaraja TG (1998) Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal of Animal Science** 76:234-241.

González LA, Manteca X, Calsamiglia S, Schawrtzkopf-Genswein KS, Ferret A (2012) Ruminal acidosis in fetlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). **Animal Feed Science and Technology** 172:66-79.

Gozho GN, Plaizier JC, Krause DO, Kennedy AD, Wittenberg KM (2005) Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of Dairy Science** 88:1399-1403.

Hajikolaie MRH, Nouri M, Afshar FS, Dehkordi AJ (2006) Effects of experimentally induced ruminal lactic acidosis on blood pH, bicarbonate and pCO₂ in the sheep. **Pakistan Journal of Biological Sciences** 9:2003- 2005.

Jackson PGG, Cockcroft PD (2002) Clinical examination of farm animals. Malden: Blackwell Science, 313 p.

Jones MB (2010) Basic interpretation of metabolic acidosis. **Critical Care Nurse** 30:63-69.

Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J, Noordhuizen JPTM (2003) Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. **Journal of Veterinary Medicine Series A** 50:406-414.

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

Li S, Gozho GN, Gakhar N, Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC (2012) Evaluation of diagnostic measures for subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science** 92:353-364.

Luan S, Cowles K, Murphy MR, Cardoso FC (2016) Effect of a grain challenge on ruminal, urine, and fecal pH, apparent total-tract starch digestibility, and milk composition of Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science** 99(3):2190–2200.

Minervino AHH, Araújo CASC, Kaminishikawahara CM, Soares FB, Rodrigues FAML, Reis LF, Oliveira FLC, Barrêto Júnior RA, Mori CS, Ortolani EL (2014) Influência de diferentes dietas com alto teor de concentrados sobre parâmetros ruminais, bioquímicos e urinários de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 51:30-36.

Morgante M, Giancesella M, Casella S, Ravarotto L, Stelletta C, Giudice E (2009) Blood gas analyses, ruminal and blood pH, urine and faecal pH in dairy cows during subacute ruminal acidosis. **Comparative Clinical Pathology** 18:229-232.

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

Nocek JE (1997) Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal of Dairy Science** 80:1005-1028.

Nocek JG, Allman JG, Kautz WP (2002) Evaluation of an indwelling ruminal probe methodology and effect of grain level on diurnal pH variation in dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 85:422-428.

Oetzel GR (2003) Subacute ruminal acidosis in dairy cattle. **Advances in Dairy Technology** 15:307-317.

Ortolani EL (2003) Diagnóstico de doenças nutricionais e metabólicas por meio de exame de urina em ruminantes. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. (Eds.) SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL **Anais...** Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 91-102.

Penner GB, Aschenbach JR, Gabel G, Rackwitz R, Oba M (2009) Epithelial capacity for apical uptake of short chain fatty acids is a key determinant for intraruminal pH and the susceptibility to subacute ruminal acidosis in sheep. **The Journal of Nutrition** 139:1714–1720.

Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW (2009) Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal** 176:21-31.

Reece WO, Erickson HH, Goff JP, Uemura EE (Eds) (2015) *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. Hoboken:Wiley-Blackwell, 720p.

Roche JR, Petch S, Kay JK (2005) Manipulating the dietary cation-anion difference via drenching to early-lactation dairy cows grazing pasture. **Journal of Dairy Science** 88:264-276.

Steele MA, Croom J, Kahler M, Alzahal O, Hook SE, Plaizer K, McBride W (2011) Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** 30:R1515-R1523.

Sobrinho AGS, Batista AMV, Siqueira ER, Ortolani EL, Susin I, Silva JFC, Teixeira JC, Borba MFS (1996) Nutrição de ovinos. Jaboticabal: FUNEP, 258 p.

Teixeira PPM, Silva MAM, Viana RB (2014) Two-stage rumenostomy in buffaloes. **Acta Scientiae Veterinariae** 42:1-5.

CAPÍTULO 4 – Características do fluido ruminal de ovelhas submetidas à acidose ruminal subaguda

Resumo – A alimentação de ruminantes com excesso de carboidrato e escassez de fibras, geralmente está associada a alterações no líquido ruminal, causando a acidose ruminal subaguda. O presente trabalho avaliou as alterações do fluido ruminal de ovelhas que receberam dietas com alto teor de concentrado (80% matéria seca), com propósito de induzir experimentalmente a acidose ruminal subaguda. Foram utilizadas oito ovelhas adultas, distribuídas em grupo tratado (GT, cinco animais, que receberam alta porcentagem de concentrado na dieta) e grupo controle (GC, três animais, alimentados com feno). Para a indução da ARS, as ovelhas do GT receberam dieta na qual foram incluídos ao volumoso, diariamente, 10% de alimento concentrado farelado até completar 80%, porcentagem mantida até completar 30 dias experimentais. Amostras de fluido ruminal foram obtidas por meio da fístula ruminal, a fim de se analisar as características físicas (viscosidade, cor e odor), o tempo de sedimentação, prova de redução do azul de metileno e níveis de lipopolissacarídeos e histamina. Observou-se que o fluido ruminal das ovelhas do GT apresentou diminuição do tempo de redução do azul de metileno, aumento do tempo de sedimentação e diminuição dos níveis de histamina. Conclui-se que a dieta empregada foi capaz de alterar o líquido ruminal e desencadear ARS em ovelhas.

Palavras-chave: prova de redução do azul de metileno, ARS, líquido ruminal, tempo de sedimentação, histamina

1. Introdução

No Brasil, o principal objetivo da ovinocultura é a produção de carne (Viana et al., 2015). Portanto, todas as medidas adotadas para intensificar a produção tem a finalidade de aumentar a quantidade e qualidade do produto final (Caldeira, 2005). Dietas ricas em grãos, carboidratos, favorecem o aumento da produção de leite e ganho de peso, sendo benéficas por um curto tempo, porém a longo prazo, o seu consumo acarreta efeitos adversos como a acidose ruminal subaguda (ARS) que torna o pH ruminal ácido (Oetzel, 2003).

Segundo Plaizier et al. (2009), a acidose ruminal subaguda é uma doença metabólica de bovinos alimentados com dieta de alta concentração de carboidratos associado com a diminuição do pH ruminal.

As características do fluido ruminal de vacas com ARS são: coloração leitosa ou amarronzada, odor ácido, consistência levemente viscosa, rápido tempo de sedimentação, pH em torno 6,2 a 5,3 e tempo de redução do azul de metileno de até três minutos (Enemark et al., 2002). Apesar do líquido ruminal ter predominância de bactérias Gram-negativas, ocorre ascensão do número de bactérias Gram-positivas na ARS (Goad et al., 1998; Owens et al., 1998).

A queda do pH ruminal desencadeia a síntese da histamina, que é uma amina farmacologicamente ativa, produzida no rúmen pela descarboxilação dos aminoácidos percussores (Nagaraja e Titgemeyer, 2007). Segundo Brent (1976) a histamina é um potente vasodilatador e aumenta a permeabilidade vascular, ambas características causam alterações hemodinâmicas, fato importante para patogênese da laminite.

O envolvimento da histamina e das endotoxinas se encaixa na patogênese da laminite por sobrecarga de carboidratos (Nocek, 1997). As endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) são componentes da parede celular de bactérias gram-negativas. Como no fluido ruminal há predomínio de bactérias Gram-negativas, em condições acidóticas ocorre a morte destas bactérias com a liberação do LPS (Nagaraja et al., 1978). Acredita-se que as endotoxinas bacterianas presentes no fluido ruminal participem da patogênese da ARS e da laminite, pois o LPS pode ser translocado para os vasos sanguíneos periféricos (Nagaraja et al., 1978). O alvo primário das endotoxinas parece ser o tecido arterial vascular, que afeta a liberação de mediadores vasoativos, induzindo assim uma resposta inflamatória de fase aguda da derme e respostas vasculares associadas (Nocek, 1997; Gozho et al., 2005).

O presente estudo avaliou as alterações do fluido ruminal de ovelhas que receberam dietas com alto teor de concentrado (80% matéria seca – MS), com propósito de induzir experimentalmente a ARS.

2. Material e métodos

2.1. Período de adaptação

Foram utilizadas oito ovelhas adultas, mestiças Santa Inês, híginas, criadas a campo. Os animais foram mantidos em baias providas de piso de borracha¹, 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.

No período pré-experimental (60 dias) os animais foram alimentados 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 (Tortuga Ovinofós com minerais orgânicos)².

2.2. Período experimental

Foram utilizadas oito ovelhas, adultas, mestiças Santa Inês, distribuídas em grupo tratado (GT, cinco animais, que receberam alta porcentagem de concentrado na dieta) e grupo controle (GC, três animais, alimentados com volumoso/feno). Para indução da ARS, o GT 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 – Guabi Ruminúcleo Ovinos 40 ADE, Mogiana Alimentos S/A, Campinas, Brasil), até completar 80% da MS (Girardi, 2016), porcentagem mantida até o final de 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.

¹ Nova Vedovati Indústria e Comércio Ltda, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

² Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, São Paulo, São Paulo, Brasil.

2.3. Análise do Líquido Ruminal

As amostras do líquido ruminal foram obtidas por meio da fístula ruminal, 24 horas após o fornecimento do alimento, utilizando-se uma pipeta descartável, sendo coletados 30 mL e acondicionadas em três tubos cônicos estéreis tipo Falcon de 15 mL e analisados, logo após a colheita, quanto às características físicas (viscosidade, cor, odor), o tempo de sedimentação (TS) e prova de redução do azul de metileno (PRAM). Na prova de sedimentação, as amostras foram deixadas em repouso até a formação de camadas estratificadas (Arcuri et al., 2006). Para o teste do tempo de redução do azul de metileno, adicionou-se 0,5 mL desta solução a 0,03% a 9,5 mL de fluido ruminal (Dirksen, 1993), comparando-se a cor ao controle do próprio fluido e registrando o tempo necessário para descolorir o azul de metileno (Dirksen, 1993; Jackson e Cockcroft, 2002).

Para a análise dos níveis de histamina as amostras de líquido ruminal foram obtidas no basal, quarto, sétimo, 10º, 15º, 19º, 23º, 27º e 30º dia experimental e para análise dos níveis de LPS no basal, sétimo, 15º, 23º e 30º dia experimental, ambas 24 horas após o fornecimento da dieta. A amostra de fluido ruminal foi obtida com pipeta estéril, filtrada com gaze estéril e acondicionada em tubos cônicos estéreis tipo Falcon de 15 mL para centrifugação refrigerada a 4°C, durante 15 minutos a 6.000 rpm, separando-se a fração de sobrenadante, o qual foi armazenado em alíquotas em freezer -80°C em microtubos de plástico estéreis tipo Eppendorf para avaliação da concentração de histamina, e para amostra destinada à análise de LPS, foi acondicionada em tubo de vidro borossilicato estéril a -20°C.

Os níveis de LPS e histamina foram avaliados por kits (LPS³ e histamina⁴) para ensaio imunoenzimático (ELISA – Enzyme-Linked Immunonorbent Assay) multiespécies e a leitura da reação foi feita em leitor de microplacas de ELISA (iMark Microplate Reader Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Utilizando-se software de análise estatística (SAS 9.1)⁵, avaliou-se os momentos (coletas) dentro de cada grupo pela análise de variância para medidas repetidas com ANOVA. A comparação entre os grupos (GT/GC) foi realizada pelo teste t de Student. O nível de significância adotado foi 5%.

³ Cloud-Clone Corp., Katy, Tx, USA. (SEB526Ge 96 Tests)

⁴ Cloud-Clone Corp., Katy, Tx, USA. (CEA927Ge 96 Tests)

⁵ SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.

3. Resultados

A coloração do fluido ruminal que era verde oliva até o terceiro dia, tornou-se verde amarelado do quarto ao 10º dia e, então, manteve-se amarelada até o fim do período experimental (Fig. 1). O fluido ruminal, geralmente líquido durante o experimento, apresentou episódios de aumento de viscosidade a partir do 13º dia, chegando a se tornar espumoso no 15º, 21º, 22º, 26º, 27º, 28º e 30º dia após a introdução de carboidrato na dieta. O odor passou de característico para ácido a partir do sexto dia experimental e permaneceu até o final.

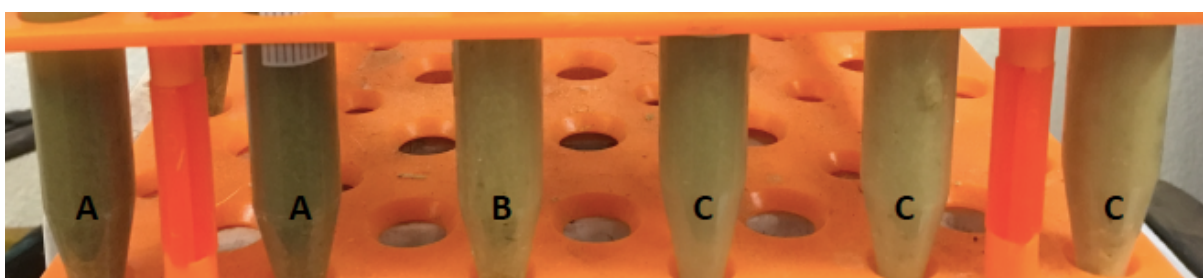


Figura 1. Fluido ruminal de ovinos induzidos à acidose ruminal subaguda por ingestão de dieta rica em carboidratos: verde oliva (A), verde amarelado (B) e amarelado (C).

Os resultados referentes à prova de sedimentação (TS) e prova de redução de azul de metileno (PRAM) do líquido ruminal estão apresentados nas Figuras 2 e 3. Observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) no TS do líquido ruminal dos animais do GT em relação ao GC no quarto, nono, 12º, 14º, 15º, 16º, 18º, 21º, 22º e 30º dia após a introdução de carboidrato na dieta. A média de tempo em minutos do TS do GT ($4 \pm 1,72$) foi maior em comparação ao GC ($1,5 \pm 0,30$). A PRAM do fluido ruminal das ovelhas do GT apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao GC no nono, 10º ao 13º, 15º, 28º ao 30º dia após o fornecimento da dieta com alto teor de carboidratos. A média de tempo em minutos do GT ($0,9 \pm 0,65$) foi menor quando comparado com GC ($1,7 \pm 0,43$).

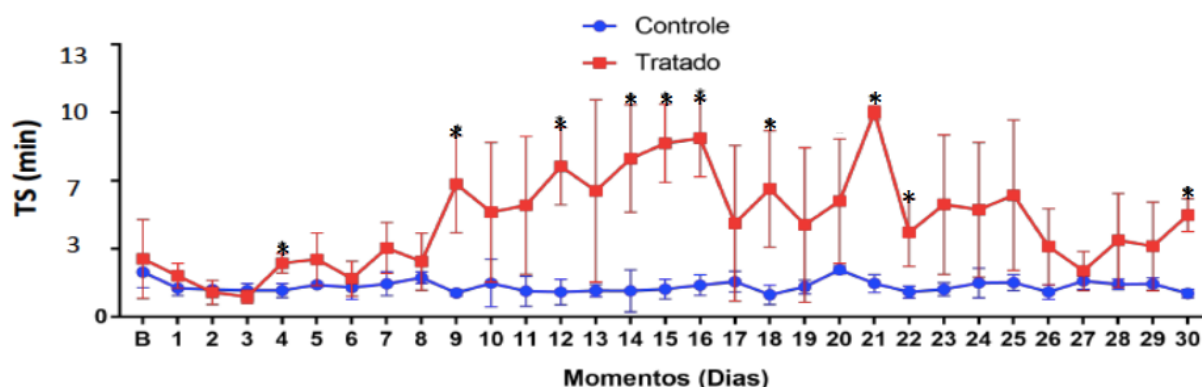


Figura 2. Representação gráfica das médias e desvios padrão diários da análise da prova de sedimentação (TS) do fluido ruminal dos ovinos dos grupos tratado (GT) e controle (GC), em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). * $P < 0,05$

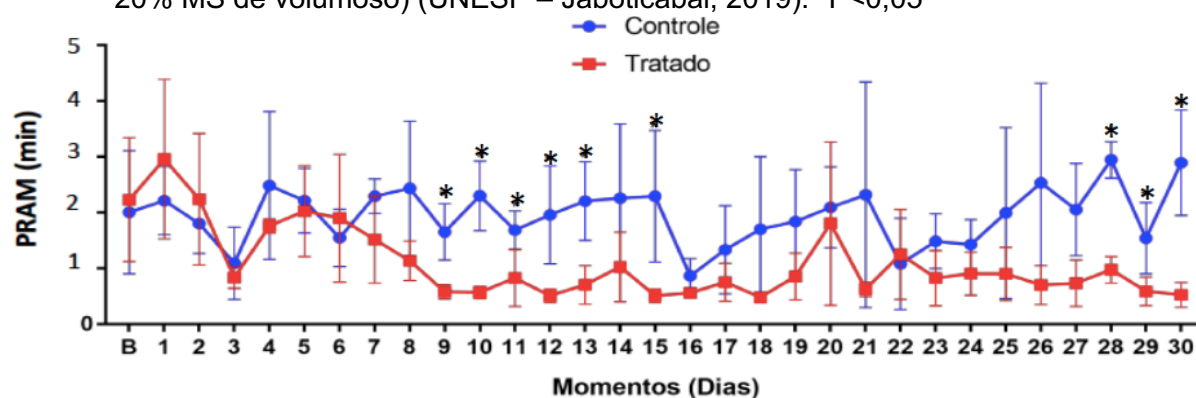


Figura 3. Representação gráfica das médias e desvios padrão diários da análise da prova de redução de azul de metileno (PRAM) do fluido ruminal dos ovinos dos grupos tratado (GT) e controle (GC), em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). * $P < 0,05$

Ao comparar com GC ($4,20 \pm 0,97$), a concentração de histamina no fluido ruminal das ovelhas do GT ($3,16 \pm 1,07$) decresceu e apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) no sétimo, 10º, 15º e 27º dia após o fornecimento de dieta com 80% MS de alimento concentrado (Fig. 4).

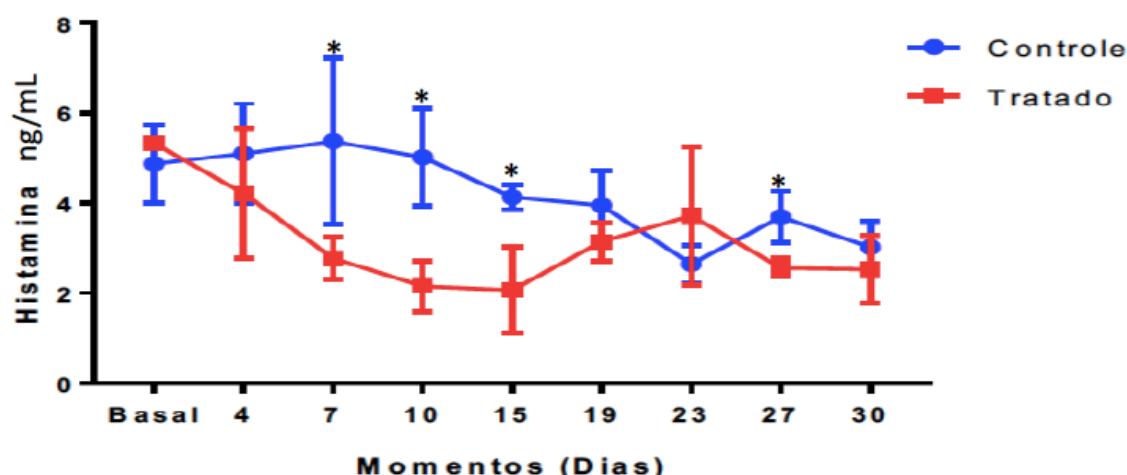


Figura 4. Representação gráfica das médias e desvios padrão diários da concentração de histamina no fluido ruminal grupos tratado (GT) e controle (GC), em relação aos dias experimentais (D0 – alimentação apenas com volumoso; D1 a D7 – inclusão gradual diária de 10% matéria seca (MS) de alimento concentrado à dieta; D8 a D30 – dieta com 80% MS de alimento concentrado e 20% MS de volumoso) (UNESP – Jaboticabal, 2019). *P<0,05

Os lipopolissacarídeos (LPS) do fluido ruminal somente foram detectados no momento basal em ambos os grupos, GC ($0,50 \pm 0,34$) e GT ($0,18 \pm 0,06$), após esse momento, não houve detecção de LPS por meio da metodologia utilizada.

4. Discussão

Os achados referentes a viscosidade, coloração e odor do fluido ruminal corroboraram o esperado do líquido ruminal de ruminantes portadores de ARS: viscosidade aumentada, odor ácido, coloração verde amarelado a amarelado (Enemark et al., 2002).

A prova de redução do azul de metileno tem como objetivo determinar a atividade da microbiota ruminal, em ruminantes com dietas equilibradas de volumoso e concentrado espera-se que o consumo do azul de metileno pela microbiota seja de até três minutos; já em dietas ricas em carboidratos e desprovida de volumoso, o tempo para a redução é menor, em torno de um minuto (Dirksen, 1993; Feitosa, 2014). No líquido ruminal das ovelhas com ARS, observou-se diminuição do tempo da PRAM, principalmente, após a introdução de dieta com 80% de carboidrato, assim como observaram Girardi et al. (2018). A análise da PRAM do líquido ruminal

de vacas leiteiras com afecções podais apresentou tempo menor que três minutos, principalmente no lote de animais alimentados com alta concentração de carboidratos (50% da dieta) (Rodrigues et al., 2013).

A prova de sedimentação determina o tempo em que as partículas fibrosas e maiores permanecem na superfície por meio dos gases produzidos pela fermentação e as partículas menores e finas se depositam no fundo do recipiente (Dirksen, 1993). Portanto, ocorre estratificação do conteúdo ruminal pela atividade bacteriana, geralmente, em animais saudáveis o TS é em torno de seis a nove minutos e em animais com acidose ruminal espera-se diminuição deste tempo (Enemark et al., 2002; Feitosa, 2014). Porém, não foi observado diminuição do TS conforme descrito e, sim, aumento do tempo de sedimentação dos animais alimentados com 80% de concentrado na dieta em relação ao GC. Provavelmente, o TS aumentou devido a consistência espumosa do fluido ruminal.

A diminuição do pH ruminal está associada com o aumento da produção e acúmulo da histamina no fluido ruminal (Dain et al., 1955). No presente estudo observou-se decréscimo da concentração de histamina no líquido ruminal das ovelhas, principalmente, no período de fornecimento de dieta rica em carboidrato. As espécies de bactérias produtoras de histamina, *Allisonella histaminiformans*, necessitam pH extremamente ácido, para desencadear a produção de histamina (Schelp et al., 2001; Garner et al., 2002); pH ruminal abaixo de 5,0 potencializa a produção de histamina (Dain et al., 1955). Provavelmente não ocorreu aumento da concentração de histamina no fluido ruminal, porque o pH ruminal das ovelhas do GT não atingiu valores tão ácidos ($6,11 \pm 0,20$) (conforme descritos no Capítulo 3).

Estudos apontam aumento da concentração de histamina e LPS no fluido ruminal de vacas com ARS (Gozho et al., 2005; Pilachai et al., 2012). Dietas ricas em carboidratos (trigo e cevada) e valores de pH ruminal abaixo de 5,6 durante três horas/dia favorecem o aumento da concentração de LPS no líquido ruminal de bois (Gozho et al., 2005; Gozho et al., 2006) e de vacas em lactação (Gozho et al., 2007). Porém, no presente estudo, a concentração de LPS do fluido ruminal das ovelhas com ARS, permaneceu abaixo do limiar de detecção da metodologia utilizada. Talvez não foi possível mensurar os níveis de LPS, porque, a colheita foi realizada uma vez ao dia, diferente do apontado por Khafipour et al. (2009), os quais

verificaram que seis e 12h após a alimentação são os períodos de maior concentração de LPS no líquido ruminal.

5. Conclusão

A ingestão da dieta com 80% de carboidrato por ovelhas influenciou as características organolépticas do fluido ruminal (odor, cor e consistência), diminuiu do tempo da prova de redução do azul de metileno, aumentou o tempo de sedimentação e diminuiu os níveis de histamina. Conclui-se que houve alterações do fluido ruminal com a ingestão de dieta com 80% de carboidrato.

6. Referências

Arcuri PB, Lopes FCF, Carneiro JC (2006) Microbiologia do rúmen. In: Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG (Eds.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p. 183-228.

Brent BE (1976) Relationship of acidosis to other feedlot ailments. **Journal of Animal Science** 43:930-935.

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

Dain JA, Neal AL, Dougherty RW (1955) The occurrence of histamine and tyramine in rumen ingesta of experimentally over-fed sheep. **Journal of Animal Science** 14:930 -935.

Dirksen G (1993) Sistema Digestivo. In: Dirksen G, Gründer HD, Stöber M (Eds.) **Rosenberger Exame Clínico dos Bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 166-228.

Enemark JMD, Jørgensen RJ, Enemark PS (2002) Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review. **Veterinarija ir Zootechnika** 20:16-29.

Feitosa FLF (2014) Semiologia do Sistema Digestório de Ruminantes. In: Feitosa FLF (Ed.) **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, p. 121-144.

Garner MR, Hay AG, Guard CL, Russell JB (2002) Bovine Laminitis and *Allisonella histaminiformans*. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, p.199-208.

Girardi AM, Sabes AF, Fagliari JJ, Silva PC, Oliveira JA, Marques LC (2018) Changes in the levels of acute-phase protein and other serum protein fraction in Santa Inês ewes fed with a high-concentrate diet. **Small Ruminant Research** 162:34-38.

Girardi AM (2016) **Acidose ruminal subaguda em ovinos Santa Inês**: estudo clínico, laboratorial e avaliação da laminite por termografia infravermelha e radiologia digital. 2016. 136f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Goad DW, Goad CL, Nagaraja TG (1998) Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal of Animal Science** 76:234-241.

Gozho GN, Krause DO, Plaizier JC (2007) Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 90:856-866.

Gozho GN, Krause DO, Plaizier JC (2006) Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers. **Journal of Dairy Science** 89: 4404-4413.

Gozho GN, Plaizier JC, Krause DO, Kennedy AD, Wittenberg KM (2005) Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of Dairy Science** 88:1399-1403.

Jackson PGG, Cockcroft PD (2002) Clinical examination of farm animals. Malden: Blackwell Science, 313 p.

Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC (2009) A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. **Journal of Dairy Science** 92:1060–1070.

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

Nagaraja TG, Bartley EE, Fina LR, Anthony HD (1978) Relationship of rumen gram-negative bacteria and free endotoxin to lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Sciences** 47:1329-1337.

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

Oetzel GR (2003) Subacute ruminal acidosis in dairy cattle. **Advances in Dairy Technology** 15:307-317.

Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR (1998) Acidosis in cattle: a review. **Journal of Animal Sciences** 76:275-286.

Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW (2009) Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal** 176:21-31.

Pilachai R, Schonewille JT, Thamrongyoswittayakul C, Aiumlamai S, Wachirapakorn C, Everts H, Hendriks (2012) WH Starch source in high concentrate rations does not affect rumen pH, histamine and lipopolysaccharide concentrations in dairy cows. **Livestock Science** 150:135-142.

Rodrigues M, Deschk M, Santos GGF, Perri SHV, Hussni MCA, Alves ALG, Rodrigues CA (2013) Avaliação das características do líquido ruminal, hemogasometria, atividade pedométrica e diagnóstico de laminite subclínica em vacas leiteiras. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 33:99 –106.

Schelp E, Worley S, Monzingo AF, Ernst S, Robertus JD (2001) pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a. **Journal of Molecular Biology** 306:727-732.

Sobrinho AGS, Batista AMV, Siqueira ER, Ortolani EL, Susin I, Silva JFC, Teixeira JC, Borba MFS (1996) Nutrição de ovinos. Jaboticabal: FUNEP, 258 p.

Viana JGA, Moraes MRE, Dorneles JP (2015) Dinâmica das importações de carne ovina no Brasil: análise dos componentes temporais. **Semina: Ciências Agrárias** 36:2223-2234.

CAPÍTULO 5 – Doppler ultrasonography of the cranial tibial artery in sheep with subacute ruminal acidosis ¹

Gabriela Marchiori Bueno^{1*}, Annita Moraes Girardi¹, Amanda Festa Sabes¹, Tiago José Caparica Módolo¹, Evandro Zacché Pereira¹, Emanuel Ferreira Martins Filho², Luiz Carlos Marques¹

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

²Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinárias, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFBA Univ. Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, CEP:40170-110, Salvador, Bahia, Brazil.

*Corresponding author gabi_marchiori@hotmail.com

Abstract

Subacute ruminal acidosis (SARA), a metabolic disease that affects ruminants, is associated with diets that contain a high concentration of carbohydrates. Although SARA is known to trigger a systemic inflammatory state, of which one of the main sequelae is laminitis, the pathophysiological processes involved are not well understood. Doppler ultrasonography is able to provide data on the vascular dynamics and architecture. Thus, it could be used to evaluate the alterations caused by laminitis in the limb arteries of ruminants. However, there are few studies on the use of Doppler ultrasonography in sheep with SARA and laminitis. The objective of this study was to monitor the dynamics of cranial tibial arterial blood flow in sheep with experimentally induced SARA in order to verify the possible hemodynamic changes caused by SARA and laminitis. Eight adult ewes were distributed into a treatment group (TG, five animals, which received a high percentage of concentrate in the diet) and a control group (three animals fed bulk grass/hay only). For SARA induction, the TG sheep received a diet in which 10% of concentrate feed was added to the bulk, reaching to 80% by

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista “Small Ruminant Research” e encontra-se em avaliação para publicação.

the end of 30 days of experimentation. Doppler ultrasonographic examination of the cranial tibial artery of the left and right pelvic limbs was performed daily. The Doppler parameters analyzed were the maximum systolic velocity, end-diastolic velocity, pulsatility index, and resistivity index. Although no clear signs of laminitis were observed, there was an increase in the end-diastolic velocity and a decrease in the pulsatility and resistivity indices in the cranial tibial artery of both pelvic limbs of the TG animals in the period of higher carbohydrate consumption. It was concluded that Doppler ultrasonography was effective for monitoring the hemodynamics of the cranial tibial artery under SARA, showing arterial vasodilation during the period of higher carbohydrate intake from the diet. Moreover, it would be a useful tool for the diagnosis and follow-up of the progression of the peripheral vascular alterations caused by SARA and laminitis.

Keywords: Sheep, SARA, Pulsatility index, Resistivity index, Laminitis

1. Introduction

Subacute ruminal acidosis (SARA), a metabolic disease of ruminants, is associated with diets that contain a high carbohydrate concentration (Plaizier et al., 2009). SARA is defined by periods of moderate ruminal pH depression and is associated with laminitis, which can lead to decreased animal productivity (Krause and Oetzel, 2006).

SARA causes intense fermentation in the rumen, resulting in a decrease in the ruminal pH, which subsequently causes tissue damage and an increase in the lysis of gram-negative bacteria. Consequently, an increase in the concentration of the endotoxin lipopolysaccharide (LPS) in the ruminal fluid ensues. LPS can be translocated to the bloodstream and contributes to systemic inflammation and the acute phase response (Gozho et al., 2005; Plaizer et al., 2009; Plaizer et al., 2012). Such inflammatory phenomena result in the release of vasoactive

substances, which are associated mainly with changes in the hemodynamics of the peripheral microvasculature (Boosman et al., 1989; Nocek, 1997). Histamine, a pharmacologically active amine, is a vasoactive substance released by mast cells during an inflammatory process. It is also produced in the rumen by the decrease in ruminal pH, being responsible for vasodilation and increased vascular permeability (Nagaraja and Titgemeyer, 2007). Therefore, it has been suggested that changes in blood circulation could play an important role in the development of foot conditions in cattle (Hirschberg and Mülling, 2002).

One of the main sequelae of SARA is laminitis or diffuse aseptic pododermatitis, which is defined as an inflammation of the dermal laminae of the hoof (Nocek, 1997). However, the exact mechanism of how SARA triggers laminitis is not fully understood (Krause and Oetzel, 2006).

Most of the incidences of claudication found in herds are attributed to the laminitis caused by excess grain in the diet, which is the second most important disease that leads to a decrease in milk yield, weight gain, and failure to reproduce (Oetzel, 2003). Although the etiology is multifactorial, it has been suggested that metabolic diseases increase the susceptibility to the onset of laminitis, besides it being associated with abscesses and ulcers of the sole and overgrowth of the corneal case (Nocek, 1997). It is believed that the connection between SARA and laminitis is a high intake of carbohydrates and a deficiency in dietary fiber intake, thus leading to excessive ruminal fermentation (Nocek, 1997).

Doppler ultrasonography is commonly used to observe changes in the vascular dynamics, as it is able to provide real-time information about the vascular architecture and hemodynamic parameters of the vessels (Novellas et al., 2007; Carvalho et al., 2008) as well as peripheral vascular resistance (Novellas et al., 2007). The objective of the present study was to use Doppler ultrasonography to monitor the dynamics of cranial tibial arterial blood flow in sheep

with experimentally induced SARA in order to verify the possible hemodynamic changes caused by SARA and laminitis.

2. Materials and methods

This study was carried out in accordance with the ethical principles in animal experimentation adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation. The study protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the State University of São Paulo, School of Agrarian and Veterinary Sciences, Jaboticabal, Brazil (Approval protocol n°5758/16).

Eight adult female sheep (*Ovis aires*, crossbred Santa Inês) were distributed into a treatment group (TG, five animals, which received a high percentage of concentrate in the diet) and a control group (CG, three animals, fed on bulk grass/hay only). For SARA induction, the TG received a diet based on the dry matter (DM) intake of the adaptation period (for 60 days all sheep were fed bulk grass/hay only); that is, 10% of a branny concentrate feed was added daily on morning (76.8% ground corn, 18.2% soybean meal, and 5% of essential minerals and vitamins) was added up to 80% on the basis of DM intake (Girardi, 2016), with the percentage maintained until the end of 30 experimental days. The Digimed DM20 digital pHmeter (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, São Paulo, Brazil) was used to measure the ruminal pH of the ewes every day. Doppler ultrasound examination was performed daily, six hours after the supply of high carbohydrate diet.

Before performing the ultrasonographic examination, the studied area was trichotomized. The ewes were acclimatized for 30 min in a temperature-controlled environment ($25.39 \pm 0.87^{\circ}\text{C}$), in a quadrupedal position with the weight of all limbs supported (Menzies-Gow et al., 2004; Müller et al., 2017), without sedation and under quiet manipulation. After the

acclimation period, the heart rate was measured in beats per minute (bpm) by cardiac auscultation, and a hoof evaluation was performed to detect signs of laminitis (Gay, 2002) and macroscopic alterations.

On each day, ultrasonic scanning in the B mode and subsequent spectral and color Doppler ultrasonography (US MyLab™ 30 Vet Gold, Esaote SpA, Genova, Italy) with an 18-6 MHz linear transducer (LA435, Esaote SpA, Genova, Italy) were carried out for identification of the cranial tibial artery of the left and right pelvic limbs of the sheep. The scanning frequencies used were 18 MHz for the B mode and 8 MHz for the spectral Doppler mode, and the apparatus was set up for a scan depth of 2 cm as the standard for the examinations. To locate the cranial tibial artery, the linear transducer was positioned caudally to the cranial tibial muscle, embedded between the lateral extensor digitorum muscles and the third fibular muscle under the long fibular muscle. The transducer scans were performed with minimal pressure (Aiken and Strickland, 2012; Müller et al., 2017).

Next, the spectral pulsed Doppler mode was triggered to quantify the velocity of blood flow within the vessel. The angle of insonation used was less than 60°, and the algorithm packaged with the ultrasound equipment was used to calculate the velocities and Doppler indices. A single mean value of five identical waveforms was obtained for each measure of the peak systolic velocity (VP), end-diastolic velocity (EDV), resistivity index (RI), and pulsatility index (PI) (Raisis et al., 2000). The examinations were performed until the 30th experimental day and always by the same operator in order to reduce variations.

GraphPad Instat® software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for evaluating repeated measures within each group by analysis of variance, and subsequently, for comparisons between the groups by Student's *t*-test. The level of significance was 5%.

3. Results

In the present study, the mean rumen pH of the TG sheep was significantly lower than that of the CG sheep. This indicated that SARA had been successfully induced in the TG animals.

Upon physical examination, the sheeps from TG did not display obvious signs of discomfort in the pelvic limbs. The heart rate differed between the groups on days 5, 6, and 8–18 as well as on days 20–24, 26, 28, and 30 after the introduction of carbohydrate into the diet (Fig. 1A). On all days when a significant difference ($P < 0.05$) was found, the mean heart rate of the TG sheep (80.9 ± 7.7 bpm) was higher than that of the CG animals (60.2 ± 3.3 bpm).

In the Doppler ultrasonographic results, there were no significant differences in the mean VP values between the two sheep groups. The mean EDV values of the TG sheep (0.10 ± 0.04) were significantly higher on days 10, 11, 12, 13, 22, 23, and 27 after SARA induction compared with those of the CG ewes (11 ± 0.07) (Fig. 1B).

The mean PI and RI values of the sheeps from TG (2.19 ± 0.21 and 0.76 ± 0.01 , respectively) were significantly lower than those of the control animals (3.01 ± 0.30 and 0.81 ± 0.02 , respectively). For the PI variable, the days with significant differences between the groups were on days 6, 7, 9, 10–14, 17–29 after SARA induction. Those for the RI variable were on days 7, 10, 11, 18, and 22–28 after SARA induction (Fig. 1C and D). Fig. 2 shows representative images of the triplex-mode Doppler ultrasonography of the cranial tibial artery of the left and right pelvic limbs of animals in both groups.

4. Discussion

In this study, the dynamics of cranial tibial arterial blood flow in sheeps with experimentally induced SARA was studied. The sheeps in which SARA was induced through

a diet of 80% of concentrate feed and 20% of bulk on a DM basis presented lower values of the indices that reflect vascular resistance (PI and RI) and an increase in the flow velocity (EDV) relative to the values in the control animals at the same examination periods.

The clinical manifestations of laminitis include intense pain, different degrees of claudication, reluctance to move and to support the affected limb, kyphosis, an increased hull temperature, and an increased arterial pulse. Ulcers of the soles, deformities in the hull, an increase in temperature in the wall of the hull, and a change of sole color are also observed (Nocek, 1997; Jackson and Cockcroft, 2002). Although there were no evident manifestations of lameness in the pelvic limbs of the studied sheeps, changes in the blood flow of the cranial tibial artery and increases in the heart rate were observed.

Although the increase in heart rate in the sheeps with SARA did not exceed the physiological limits for the species (60–120 bpm) (Terra and Reynolds, 2015), the rates did remain above those of the control group throughout the period of high carbohydrate intake from the diet. An elevated heart rate can be attributed to pain, stress, excitement, fever, metabolic and inflammatory disorders, hypovolemia, and endotoxemia (Terra and Reynolds, 2015). As the highest heart rate was observed in the period of higher carbohydrate supply in the animals with SARA, a probable inflammatory, metabolic, or endotoxemic process is suggested as the cause, since SARA triggers these disorders (Nocek, 1997; Krause and Oetzel, 2006).

Changes in the arterial blood flow velocities are a reflection of the hemodynamic changes of the vessels studied. High blood flow velocities indicate enlargements of the peripheral vessels and increased blood flow (Wongaumnaykul et al., 2006). In the present study, there was no significant difference in the VP variable between the TG and CG. However, the EDV parameter increased when the diet reached the highest percentage of carbohydrate.

The EDV variable is used to evaluate vascular resistance (Carvalho et al., 2008). When vasoconstriction occurs, the EDV decreases in response to the increased blood flow resistance. An increase in the EDV is indicative of vasodilation; that is, impedance to the reduction in blood flow (Coley, 2004). Such a finding may suggest the presence of vasodilation after the provision of 80% of carbohydrate in the diet.

The RI and PI, which allow comparison of the flow during systole and diastole, are the most used hemodynamic indices in studies of the peripheral vessels and arterial segment. The RI is the proportion of the difference between VP and EDV to the VP [$RI = (VP - EDV)/VP$], and PI is the proportion of the difference between VP and EDV to the mean velocity [$PI = (VP - EDV)/VM$] (Carvalho, 2009).

In the present study, the PI and RI of the cranial tibial artery were decreased in the animal from TG, precisely in the period of higher percentage of carbohydrate supply in the diet. Moreover, there was an increase in the EDV, suggesting arterial vasodilation (Coley, 2004), because promoted a decrease in vascular resistance and an increase in systolic flow (Carvalho, 2009). A reduction in vascular resistance increases the arterial diameter, and consequently increases the blood flow in that vessel (Cipone et al., 1997). Therefore, an increased EDV value corresponds to increased blood flow and reduced resistivity and pulsatility rates (Riesen et al., 2002), suggesting that perfusion has increased.

During inflammation, there is a release of vasoactive molecules, such as histamine, prostaglandins (PGE₂), and prostacyclins (PGI₁), which cause muscle relaxation and vasodilation (Plaizer et al., 2012; Tizard, 2017). The systemic inflammatory response is due to the increase in LPS and bacterial translocation into the peripheral circulation (Gozho et al., 2005). Studies have shown that SARA increases the concentrations of LPS in the ruminal fluid and inflammatory markers in the blood, mainly acute phase proteins (Gozho et al., 2006;

Khapfipour et al., 2009) and histamine (Nagaraja and Titgemeyer, 2007). Although not causing evident laminitis, endotoxemia may predispose to laminar tissue damage due to the systemic inflammatory mediators (Tadros et al., 2013) induced by SARA.

Pawson et al. (2002) evaluated the femoral artery of sheep following the administration of a vasoconstricting drug (phenylephrine), whereupon a significant increase in the PI was observed. With the administration of a vasodilator (bradykinin), there was a decrease in the PI. Wongaumnaykul et al. (2006), who performed Doppler ultrasonography in the medial digital artery of horses with laminitis, observed a higher blood flow velocity, arterial diameter, and volume of flow, and lower PI and RI values, than those of healthy animals. This suggested that the blood flow velocity and PI and RI can be used to monitor the progression of inflammatory diseases.

A study of 113 human patients with transplanted kidneys has suggested that it is necessary to combine the VP, EDV, and RI results to obtain information regarding hemodynamic insufficiency (Gao et al., 2011). On the other hand, a study performed with horses affected with induced laminitis showed an increase in the VP of the medial palmar artery, in addition to an increase in the temperature of the hull wall. The authors concluded that the increased VP associated with the increased hull temperature and claudication would be an indicator of the onset of the inflammatory process in the hull blades (Douthit et al., 2014). However, the sheep of our present study did not experience VP changes or show pain, lameness, or temperature increase in the wall of the hull of the pelvic limbs studied. However, they did present significant changes in the PI, RI, and EDV, suggesting that the measurement of these other parameters is also important for determining the occurrence of phenomena in the vascular architecture.

With regard to the PI and RI, the findings of this study of sheep with experimentally induced SARA corroborate those of a Doppler ultrasonographic study of the medial digital artery in horses with laminitis, which also presented lower indices than those in the healthy animals (Wongaumnunaykul et al., 2006). Using Doppler ultrasonography, Aguirre et al. (2013) evaluated changes in the vascular dynamics of the lateral digital palmar artery of horses with systemic inflammatory response syndrome, horses with laminitis with evident radiographic changes, and healthy horses. Unlike the present study, those authors reported no significant differences in the RI and PI values between the groups.

In the present study, the animals with changes in ultrasound Doppler indices had not previously shown pain, an increased digital pulse, and increased temperature of the hull wall of the pelvic limbs. These suggest that the alterations found may be the results of SARA, where there is a probability of triggering laminitis in sheep. Therefore, Doppler ultrasonography may be a useful tool for predicting and identifying peripheral vascular changes in the limbs caused by inflammation, a previously evident clinical manifestation of laminitis. However, more study is needed regarding vascular alterations in sheep, since the literature on this subject is still scarce.

5. Conclusion

It was concluded that Doppler ultrasonography was effective in monitoring the dynamics of cranial tibial arterial blood flow in sheep with experimentally induced SARA. It was possible to follow the progression of the effects of SARA in the cranial tibial artery through measurement of the EDV, PI, and RI parameters, the results of which suggested the occurrence of vasodilation during the periods of higher carbohydrate consumption by the

sheep. These changes in Doppler indices suggest that an inflammatory process is triggered by SARA that may predispose the ruminant to laminitis.

6. Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and the Foundation for Research Support of the State of São Paulo - FAPESP (# 2016 / 16631-8).

References

- Aguirre, C.N., Talavera, J., Palacio, M.J.F., 2013. Usefulness of Doppler ultrasonography to assess digital vascular dynamics in horses with systemic inflammatory response syndrome or laminitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 243, 1756–1761. <https://doi.org/10.2460/javma.243.12.1756>.
- Aiken, G.E., Strickland, J.R., 2012. Doppler ultrasonography for evaluating vascular responses to ergopeptine alkaloids in livestock, in: Perez-Marin, C.C. (Ed.), *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*. Intech, Rijeka, pp. 567–586.
- Boosman, R., Nemeth, F., Gruys, E., Klarenbeek, A., 1989. Arteriographical and pathological changes in chronic laminitis in dairy cattle. *Vet. Q.* 11, 144–155. <https://doi.org/10.1080/01652176.1989.9694213>.
- Carvalho, C.F., Chammas, M.C., Cerri, G.G., 2008. Princípios físicos do Doppler em ultrasonografia. *Cienc. Rural.* 38, 872–879. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000300047>.
- Carvalho, C.F., 2009. *Ultrassonografia Doppler em Pequenos Animais*. Rocca, São Paulo.

- Cipone, M., Pietra, M., Gandini, G., Boari, A., Guglielmini, C., Venturoli, M., 1997. Pulsed wave-Doppler ultrasonographic evaluation of the common carotid artery in the resting horse: physiologic data. *Vet. Radiol. Ultrasound.* 38, 200–206. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1997.tb00841.x>.
- Coley, B.D., 2004. Pediatric applications of abdominal vascular Doppler imaging: Part I. *Pediatr. Radiol.* 34, 757–771. <https://doi.org/10.1007/s00247-004-1228-2>.
- Douthit, T.L., Bormann, J.M., Bello, N.M., 2014. Assessing the association between hoof thermography and hoof Doppler ultrasonography for the diagnosis of lameness in horses. *J. Equine Vet. Sci.* 34, 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.06.005>.
- Gao, J., Rubin, J.M., Xiang, D., He, W., Auh, U.H., Wang, J., Ng, A., Min, R., 2011. Doppler parameters in renal transplant dysfunction. *J. Ultrasound Med.* 30, 169–175. <https://doi.org/10.7863/jum.2011.30.2.169>.
- Gay, C.C., 2002. Exame clínico em ovinos e caprinos, in: Radostits, O.M., Mayhew, I.G.J., Houston, D.M. (Eds.), *Exame Clínico e Diagnóstico em Veterinária*. Ganabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Girardi, A.M., 2016. Acidose ruminal subaguda em ovinos Santa Inês: estudo clínico, laboratorial e avaliação da laminite por termografia infravermelha e radiologia digital. 136f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.
- Gozho, G.N., Krause, D.O., Plaizer, J.C., 2006. Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers. *J. Dairy Sci.* 89, 4404–4413. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72487-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72487-0).

- Gozho, G.N., Plaizer, J.C., Krause, D.O., Kennedy, A.D., Wittenberg, K.M., 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 88, 1399–1403. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72807-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72807-1).
- Hirschberg, R.M., Mülling, C.K.W., 2002. Preferential pathways and hemodynamic bottlenecks in the vascular system of the healthy and diseased bovine claw, in: Shearer, J.K. (Ed.), *Proceedings of the 12th International Symposium on Lameness in Ruminants*, 9th–13th January 2002, Orlando, Florida, pp. 223–226.
- Jackson, P.G.G., Cockcroft, P.D., 2002. *Clinical Examination of Farm Animals*. Blackwell Science, Malden.
- Khafipour, E., Krause, D.O., Plaizer, J.C., 2009. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *J. Dairy Sci.* 92, 1060–1070. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1389>.
- Krause, K.M., Oetzel, G.R., 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126, 215–236. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.004>.
- Menzies-Gow, N.J., Bailey, S.R., Katz, L.M., Marr, C.M., Elliott, J., 2004. Endotoxin-induced digital vasoconstriction in horses: associated changes in plasma concentrations of vasoconstrictor mediators. *Equine Vet. J.* 36, 273–278. <https://doi.org/10.2746/0425164044877260>.

- Müller, H., Heinrich, M., Mielenz, N., Reese, S., Steiner, A., Starke, A., 2017. Evaluation of arterial digital blood flow using Doppler ultrasonography in healthy dairy cows. *BMC Vet. Res.* 13, 162–171. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1090-8>.
- Nagaraja, T.G., Titgemeyer, E.C., 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90, suppl. E, E17–E38. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-478>.
- 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).
- Novellas, R., Gopegui, R.R., Espada, Y., 2007. Effects of sedation with midazolam and butorphanol on resistive and pulsatility indices in healthy dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound.* 48, 276–280. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2007.00242.x>.
- Oetzel, G.R., 2003. Subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *Adv. Dairy Technol.* 15, 307–317. <https://pdfs.semanticscholar.org/7d20/cfc8424a3811934a008a9e5e19697184ad86.pdf>.
- Pawson, P., Nolan, A.M., Reid, J., Boyd, J.S., Paterson, C., 2002. Changes in the Doppler waveform of the ovine femoral artery following infusion of vasoactive agents: a preliminary study. *Res. Vet. Sci.* 73, 215–221. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00009-7).
- Plaizier, J.C., Khafipour, E., Li, S., Gozho, G.N., Krause, D.O., 2012. Subacute ruminal acidosis (SARA), endotoxins and health consequences. *Anim. Feed Sci. Technol.* 172, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.004>.

- Plaizier, J.C., Krause, D.O., Gozho, G.N., McBride, B.W., 2009. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.016>.
- Raisis, A.L., Young, L.E., Meire, H.B., Taylor, P.M., Walsh, K., Lekeux, P., 2000. Variability of Doppler ultrasound measurements of hindlimb blood flow in conscious horses. *Equine Vet. J.* 32, 125–132. <https://doi.org/10.2746/042516400777591561>.
- Riesen, S., Schmid, V., Gaschen, L., Busato, A., Lang, J., 2002. Doppler measurement of splanchnic blood flow during digestion in unsedated normal dogs. *Vet. Rad. Ultrasound.* 43, 554–560. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2002.tb01049.x>.
- Tadros, E.M., Frank, N., Horohov, D.W., 2013. Inflammatory cytokine gene expression in blood during the development of oligofructose-induced laminitis in horses. *J. Equine Vet. Sci.* 33, 802–808. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.01.001>.
- Terra, R.L., Reynolds, J.P., 2015. History, physical examination, and medical records, in: Smith, B.P. (Ed.), *Large Animal Internal Medicine*, fifth ed., Elsevier Mosby, Missouri.
- Tizard, I.R., 2017. *Veterinary Immunology*, tenth ed., Elsevier Mosby, Missouri.
- Wongaumnaykul, S., Siedler, C., Schobesberger, H., Stanek, C., 2006. Doppler sonographic evaluation of the digital blood flow in horses with laminitis or septic pododermatitis. *Vet. Rad. Ultrasound.* 47, 199–205. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2006.00128.x>.

Figure Captions

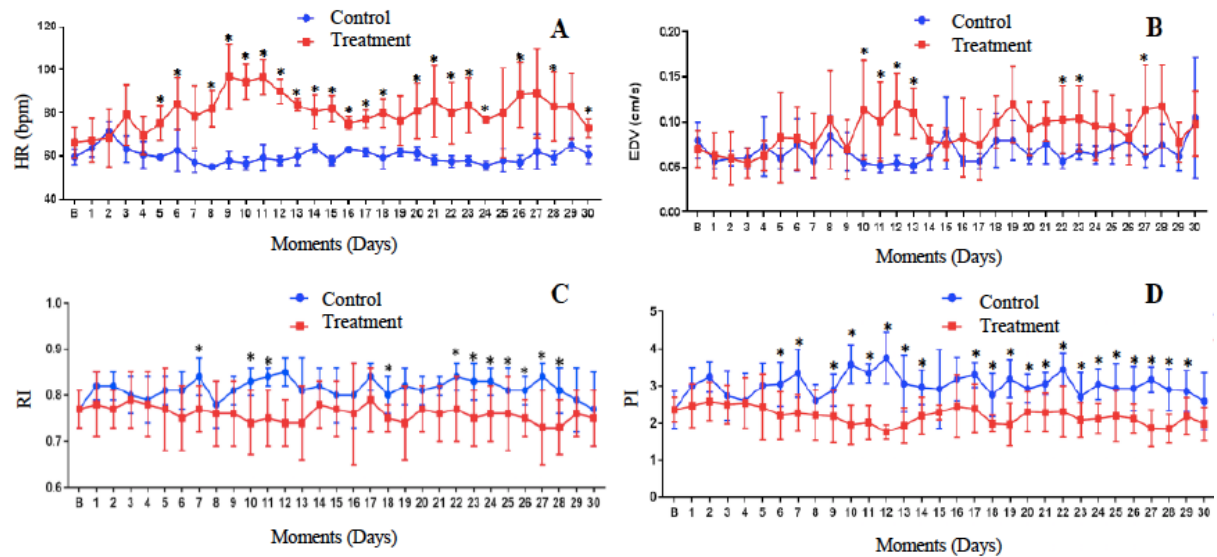


Fig. 1. Graphical representation of mean $\pm$ standard deviation of heart rate (HR), end-diastolic velocity (EDV), resistivity index (RI), and pulsatility index (PI) in the treatment (TG) and control (CG) groups (B: diet with only bulk grass/hay; 1 to 7: gradual daily inclusion of 10% concentrate feed to the diet on a dry matter (DM) basis; 8 to 30: diet with 80% concentrate feed and 20% bulk on a DM basis). (UNESP - Jaboticabal, 2019). * P < 0.05.

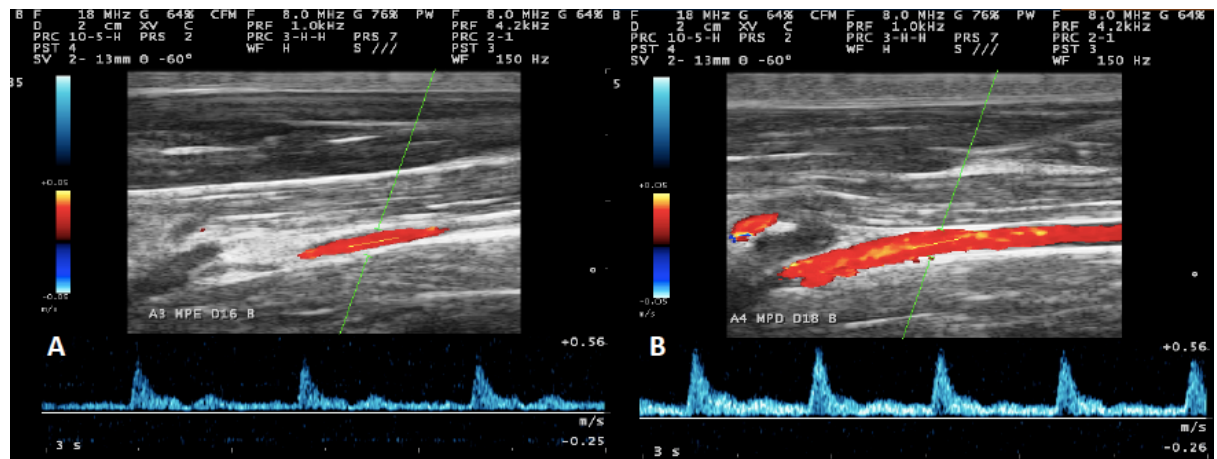


Fig. 2. (A) Triplex-mode Doppler image of the cranial tibial artery of the left pelvic limb from ewe of the control group (CG). (B) Triplex-mode Doppler image of the cranial tibial artery of right pelvic limb from ewe of the treated group (TG) on the 18th experimental day (diet with 80% concentrate feed and 20% bulk on a dry matter basis). (UNESP - Jaboticabal, 2019)