CAROLINA AKIKO SATO CABRAL DE ARAÚJO

**Perfil metabólico e hormonal de ovelhas superalimentadas submetidas
à hipercetonemia e hiperlipidemia, e tratadas com somatotropina
recombinante bovina (r-bST)**

São Paulo

2014

CAROLINA A. S. CABRAL DE ARAÚJO

**Perfil metabólico e hormonal de ovelhas superalimentadas submetidas à
hipercetonemia e hiperlipidemia, e tratadas com somatotropina
recombinante bovina (r-bST)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Médica Veterinária

Orientadora:

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3020
FMVZ

Araujo, Carolina Akiko Sato Cabral de
Perfil metabólico e hormonal de ovelhas superalimentadas submetidas à hipercetonemia e
hiperlipidemia, e tratadas com somatotropina recombinante bovina (r-bST) / Carolina Akiko Sato
Cabral de Araujo. -- 2014.
114 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

1. Ovelhas. 2. Ácidos Graxos Não Esterificados (AGNEs). 3. Somatotropina. 4. Tratamento.
5. β Hidroxibutirato (BHB). I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Perfil metabólico de ovelhas submetidas à hipercetonemia e tratadas metafilaticamente com somatotropina recombinante bovina (r-Bst)", protocolado sob o nº 2142/2011, utilizando 20 (vinte) ovelhas, sob a responsabilidade do Enrico Lippi Ortolani, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "01/06/2011 a 01/07/2013", protocol number 2142/2011, utilizing 20 (twenty) sheep, under the responsibility Enrico Lippi Ortolani, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 17 de maio de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Perfil metabólico de ovelhas submetidas à hipertrigliceremia e tratadas metafilaticamente com somatotropina recombinante bovina (r-Bst)", protocolado sob o nº 2140/2011, utilizando 20 (vinte) ovelhas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Metabolic profile of ewes submitted to hypertriglyceremia and metaphylatic treated with recombinant bovine somatotropin (r-Bst)", protocol number 2140/2011, utilizing 20 (twenty) ewes, under the responsibility Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 17 de maio de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ARAÚJO, Carolina Akiko Sato Cabral de

Título: Perfil metabólico e hormonal de ovelhas superalimentadas submetidas à hipercetonemia e hiperlipidemia, e tratadas com somatotropina recombinante bovina (r-bST)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar;
não apenas planejar, mas também acreditar.”
(Anatole France)*

DEDICATÓRIA

DEDICO este trabalho aos meus queridos pais Eduardo Cabral de Araújo e Ivone A. S. Cabral de Araújo, por serem minha inspiração, fonte de admiração e união, e por tornarem meus sonhos realidade.

Durante esses últimos anos, pude viver muitas experiências com meus pais que vou carregar pra sempre em minha vida. A começar pela forma mais leal e bonita do amor. Toda dedicação prestada a minha mãe por meu pai merece ser reverenciada, pois ela só aguentou muito mais tempo pelo amor e cuidado que ele tem por ela. Agradeço todos os dias por colocar em minha vida, uma pessoa como meu pai, que me ensinou a amar uma pessoa, a ser líder, a ser solidário, a ser forte e ter um coração enorme. Acredito que são essas as características para se formar uma pessoa de bom caráter e fico muito grata por isso. Apesar dos momentos difíceis, os princípios familiares e pessoais foram cada vez mais reforçados e vão sendo a cada dia aprimorados.

A minha mãe que tão quietinha mostrava sua força e sabedoria em momentos necessários. Me acompanhou em todas as fases, me ensinou muitas coisas e ainda continua a ensinar.

Aprendi muitas coisas com as adversidades. Faltam ainda muitos passos, mas posso dizer que adquiri responsabilidades antes até do que eu imaginava, mas também, adquiri paciência, maior seletividade, fé e força.

Dedico este trabalho a todos os dias, minutos e momentos que vivi com meus pais. Agradeço a todos os valores familiares que aprendi com eles. Agradeço vida que tenho graças a eles. Agradeço a vida, por ter me presenteado com essas duas pessoas para serem meus pais. Agradeço por terem me tornado uma pessoa de bom caráter e agradeço ao sonho deles depositados em mim e por mim realizado.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis” (Renato Russo).

AGRADECIMENTOS

Ah o *agradecimento*!!!! Parte mais gratificante da tese. Se estou escrevendo essa obra é porque várias pessoas e animais dedicaram boa parte de suas vidas para que tudo ocorresse da melhor forma possível. Agradecer me deixa feliz e grata, pois nesta boa caminhada, pude contar com o auxílio de pessoas queridas que acredito que fizeram isso também por gostarem de mim. Por isso, agradeço a todos vocês que me proporcionaram momentos muito agradáveis, confortantes e felizes.

Agradeço a Deus por ser meu guia e inspiração, ter me capacitado para mais uma tarefa e ter trazido pessoas de bom caráter ao meu convívio.

Agradeço aos *meus pais* pelo amor, força, incentivo e carinho em todos os passos que demos juntos que sempre nos tornaram unidos, pelos conselhos concedidos em momentos importantes, pelo apoio em todas as etapas de minha vida, pela compreensão nos momentos difíceis e alegrias durante todos esses anos.

Ao *Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani*, pela incrível competência nas funções que desempenha, pela exemplo de excelente profissional, educador, comunicador e pesquisador; pelos agradáveis dias de convivência, mesmo que escassos, mas extremamente prazerosos e divertidos. Professor Enrico, obrigada pela oportunidade e por confiar a mim mais um trabalho de sua linha de pesquisa. O grande sonho de ter sido orientada por um Professor de grande magnitude como o senhor se realizou. Mais ainda de constatar que, apesar de grandiosamente exigente, possui um grande coração.

Ao meu namorado *Cesar Adolfo Croxatto*, meu grande amor, amigo, meu companheiro de todas as horas e todos os momentos. Você fez parte de momentos muito marcantes em minha vida e me deu total apoio. Foi muito compreensivo e amoroso em todos os momentos. Além disso me faz rir, me mima e me dá muito carinho. Agradeço a Família Croxatto, Sr. Eugenio e Sra. Margarita pelo apoio e pelos momentos muito felizes que passei a viver junto com vocês. A família Tejos que me acolheu muito bem.

Agradeço a minha *Família* que de uma forma ou de outra fizeram parte da minha vida e me ajudaram a formar meu caráter.

Obrigada *Laninho, Sonja, Nestor e Julio Cesar* pelo carinho incondicional e à toda *Família Oliveira*, minha família do coração, que me proporcionam momentos felizes e prazerosos.

Agradeço a Profa. Dra., mãe e amiga, *Maria Claudia Araripe Sucupira*, que desde a época de residência como minha preceptora e Mestrado como minha orientadora, me engrandece com seus ensinamentos, conselhos e paciência. Agradeço pela confiança depositada em mim, pelo carinho, pelas risadas, e pela amizade.

Agradeço a grande e querida amiga *Clara Satsuki Mori*, pela ajuda nas análises bioquímicas e toda parte laboratorial deste estudo, funcionando até mesmo como uma co-orientadora pois se não fosse por isso, nada poderia ser conduzido ou escrito. Mas, o agradecimento vai muito além!! Obrigada pela paciência, pela ajuda, pela amizade, pelo companheirismo, pelas conversas, assuntos de vida, experiências compartilhadas, às risadas, aos almoços, enfim... a tudo. Se a vida me deu um presente em forma de amizade, com certeza, você foi um deles.

À professora e querida amiga, *Alice Maria Melville Paiva Della Libera* pela amizade, momentos felizes, momentos solidários, pelas conversas longas tão intensas e cheias de carinho que tivemos. Além disso tudo, devo à senhora, a grande mão que me abriu essas portas da FMVZ-USP para que eu pudesse entrar, estudar, trabalhar, aprimorar os conhecimentos, enfim viver momentos importantes e felizes de minha vida.

Agradeço aos meus “irmãos” Ortolani: **Rejane, Frederico, Francisco Leonardo e Leonardo Frasson** que foram importantes para que eu conseguisse lutar e completar essa árdua jornada até a defesa. Obrigada, por terem feito parte de uma fase muito importante da minha vida, pela amizade incondicional, cada qual com sua maneira individual e marcante, extremamente divertida. Os momentos que passei junto a vocês será inesquecível para mim e com certeza sentirei muitas saudades de tudo. **Humberto**, agradeço por tudo que fez e tem feito por mim. Vários foram os momentos em que divergíamos nos assuntos e acho que poucos perturbaram tanto a ele como eu, mas kkkkkk... foi ao mesmo tempo estressante e divertido. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pelas risadas, pela paciência, pelos conselhos, pelas oportunidades e conversas animadas e de crescimento pessoal. Se ganhei mais um presente desta Faculdade, com certeza foram vocês!

Agradeço ao *Enoch*, não só por ter me ajudado no experimento com as cirurgias das ovelhas, mas pela grande amizade que fizemos ao longo desses anos. Enoch, você é um grande merecedor de muito sucesso. Seu jeito amigo, ético e profissional de ser é fonte de inspiração para os colegas aqui. Muito obrigada pelo agradável convívio.

Agradeço a imensa ajuda e amizade de *Agnaldo Arcanjo dos Santos*. Muito obrigada por cuidar dos nossos animais, por ajudar nos experimentos, ajudar nas coletas, pelas conversas e risadas.

Agradeço a *Melina Marie Yasuoka*, por ser essa grande amiga, batalhadora, determinada, que me acompanha em todos os passos da minha vida, que admiro muito e que quero ter sempre ao meu lado.

Agradeço ao *Bruno Moura Monteiro* que me ajudou numa parte crucial do trabalho também. Mas acima de tudo, obrigada Bruno, pela amizade, pela paciência, pelos ensinamentos e agradáveis momentos.

Agradeço aos amigos de pós graduação: Fernanda Cyrillo, Marjorie, Raquel Raimondo, Karina Madureira, Camila Batista, Laura Henriques, Bruna Parapinski, Renata Caminha, Heloísa, Kamila, Priscilla Marques, Aline, Giovanna, Alessandra Lima, Camila Costa, Juliana Reis, Cinthia, Vinicius, Bruno Toledo, Sylvia, Pamela Lorenci, Caroline Seino, Juliana Bombardelli, Gabriella Reis, Carolina Shecaira, Rogério, Eduardo Marques, Bruno Leonardo, Fabio Sella, Ronaldo Gargano, Bruna, Fernando Nogueira, Mayara Blagitz, Tio Chico, Francisco Lima Jr., Isabella Barros, Rodolfo Gurgel pelo agradável convívio e por terem feito dos meus dias, os mais alegres.

Agradeço aos queridos amigos, médicos veterinários Ewaldo de Mattos Junior e Julio David Spagnolo por ter auxiliado nas anestésias e cirurgias das ovelhas deste estudo. Obrigada pela disponibilidade em ajudar e pela amizade. Obrigada também aos queridos amigos e funcionários Henrique (Tio), Cícero e Marquinhos pela ajuda e amizade.

Agradeço ao Laboratório de Lípidos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, ao Prof. Dr. Jorge Mancinni Filho e à Rosângela Pavan pela disponibilidade em realizar as análises e ajudar com suas experiências na condução deste trabalho. À atenção, disponibilidade e muita simpatia das pós graduandas do Laboratório de Lipídeos, Fernanda Shinagawa, Fernanda Sant’ana, Illana e Luciana.

À técnica de laboratório Luciene Lauer e ao Laboratório da Professora Inar Alves de Castro pela auxílio na emulsificação da substância utilizada neste experimento, nas dependências da FCF da USP.

Agradeço aos professores do departamento de Clínica Médica, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Profa. Dra. Viviani Gomes, Profa. Dra. Lilian Gregory, Prof. Dr. Fabio Celidonio Poglianni, Prof. Dr. Cássio Xavier de Mendonça Jr., Prof. Wilson Roberto Fernandes, pela amizade e agradável convivência, troca de informações e experiências e aos professores, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, Profa. Dra. Maria Helena Larsson, Profa. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Profa. Carla Bargi Belli, Profa. Dra. Denise Schuartz, Profa. Marcia Mery Kogika, Profa. Dra. Silvia Ricci Lucas, Profa. Mitika Hagiwara Kuribayashi pelo convívio e compartilhamento de informações e experiências.

Aos Professores do departamento de Cirurgia – VCI – Silvia Renata Gaido Cortopassi e Luis Claudio Correa e Silva pela auxílio neste experimento.

Ao Dr. Sebastião Faria Junior, da MSD Saúde Animal que gentilmente nos orientou e deu toda força com os estudos com o r-bST.

Às técnicas de Laboratório Marli, Claudia, Dinha, Samantha, Maria Helena, Maria Luiza (Maú), e a Dona Carmem pela ajuda na parte laboratorial e agradável convívio. À Cleide pelo agradável convívio, conselhos e amizade.

Às secretarias do departamento de clínica médica da FMVZ-USP, Adelaide Borges, Maria Aparecida, Silvana e Carol pelo auxílio na entrega de relatórios e na parte burocrática dos documentos durante o doutorado.

Às secretárias da diretoria da FMVZ-USP, Isabel Barbosa e Cátia Silene que gentilmente faziam o possível para nos dar um horário na atribulada agenda do Professor. Obrigada pela gentileza e amizade.

As funcionárias da Biblioteca Evadne, Elena e Stella pela colaboração na verificação das normas para publicação e produção da ficha catalográfica desta dissertação.

A todos os meus amigos do Santo Agostinho, Liliane, Julia, Ianni, Jane, Argentino, Will, Karina, Allen, Filipe, Fabi, Ruth, Daniel Lee, Mara, Lufi, Loira, Nínive, Glauco e Edson por acompanharem todos os momentos da minha vida e fazerem parte de todos eles. Amo muito! Às minhas amigas Juliana e Fernanda por estarem sempre presentes em todos os momentos também.

Ao Walter pela imensa ajuda e competência nos materiais. Obrigada pela amizade.

Aos funcionários do Hovet de Ruminantes, Luisinho, Duke, Seu Francisco e Seu Edson pela ajuda com os animais e agradável convívio.

Aos animais, por proporcionarem meu trabalho, meu amor, minha dedicação e perspectiva de futuro sempre bom.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, FMVZ – USP pela ótima fase de minha vida que passei por aqui. Pela minha formação por esses anos de Residência, Mestrado e Doutorado.

A CAPES e CNPQ, pela concessão de bolsa e auxílio.

A FAPESP pela concessão de bolsa e pelo apoio financeiro deste estudo, possibilitando sua realização.

RESUMO

ARAÚJO, C. A. S. C. **Perfil metabólico e hormonal de ovelhas superalimentadas submetidas à hipercetonemia e hiperlipidemia, e tratadas com somatotropina recombinante bovina (r-bST)** [Metabolic and Hormonal Profile of overnourished sheep submitted to Hyperketonemia and hyperlipidemia, and treated with recombinant bovine somatotropin]. 2014. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O objetivo deste trabalho consistiu em esclarecer os mecanismos bioquímicos e hormonais da ação da somatotropina recombinante bovina (r-bST), recomendada no tratamento de toxemia da prenhez (TP). Para tal, foram realizados dois experimentos nos quais induziram-se quadros de hipercetonemia ou hiperlipidemia em 39 ovelhas com elevada condição corporal tratadas ou não previamente com 160 mg de um produto comercial de r-bST, pela via subcutânea. A hipercetonemia foi provocada pela infusão IV de 5 mM/kg P.V. de beta hidroxibutirato (BHB) no decorrer de duas horas e a hiperlipidemia com injeção IV de solução 20% de óleo de peixe, perfazendo 0,54g de triacilglicerol/kg P.V. no decorrer de quatro dias. Essas quantidades infundidas lograram provocar os quadros esperados. No primeiro experimento, o tratamento com r-bST promoveu aumento significativo da gliconeogênese por meio da conversão de BHB em glicose, maiores teores de insulina, com consequente aumento da resistência insulínica, incremento na concentração de IGF1 que levou a mobilização de nitrogênio ureico para os depósitos e maior atividade de GGT. No segundo experimento, o r-bST gerou destacado aumento da gliconeogênese, pela metabolização dos AGNEs e de BHB em glicose, com maior destaque aos AGNEs, elevação dos teores de insulina e do percentual de resistência insulínica, e maior atividade da AST e GGT e bilirrubina direta e total. Assim, conclui-se que a atuação farmacológica do r-bST se baseia na vigorosa capacidade do aumento da gliconeogênese, diminuindo concomitantemente os nefastos catabólitos (AGNEs e BHB) no processo da TP. Foi realizado ainda um experimento subsidiário para comparar a capacidade diagnóstica da detecção de BHB, em sangue total, entre o kit diagnóstico enzimático (Randox[®]), padrão ouro, e tiras reativas comerciais (Precision Xceed[®]) lidas em dosímetro portátil. Foram obtidas 247 amostras de sangue das ovelhas nas quais tinham sido infundida solução de BHB, no experimento um. Duas faixas de acetoneia foram consideradas: de 0,7 a 1,5 mM caracterizada como cetose inaparente e acima deste valor como cetose clínica. A correlação entre os métodos foi alta ($r = 0,98$; $P < 0,001$). Na cetose inaparente as tiras reativas apresentaram sensibilidade de 0,97 e especificidade de 0,89 e na

cetose aparente sensibilidade de 0,99 e especificidade de 0,75, respectivamente. As tiras reativas podem ser empregadas eficientemente no diagnóstico precoce de casos de TP, com custo baixo e rápida leitura ao pé dos animais.

Palavras-chave: Ovelhas. Ácidos Graxos Não Esterificados (AGNEs). β Hidroxibutirato (BHB). Somatotropina e tratamento.

ABSTRACT

ARAÚJO, C. A. S. C. Metabolic and Hormonal Profile of overnourished sheep submitted to Hyperketonemia and hyperlipidemia, and treated with recombinant bovine somatotropin. [Perfil metabólico e hormonal de ovelhas superalimentadas submetidas à hiperketonemia e hiperlipidemia, e tratadas com somatotropina recombinante bovina (r-bST)]. 2014. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The aim of this study was to clarify the biochemical and hormonal mechanisms of action of recombinant bovine somatotropin (r-bST), recommended in the treatment of pregnancy toxemia (PT). Two experiments were conducted inducing hyperlipidemia or hyperketonemia in 39 high body condition sheep pretreated or no with 160 mg of a commercial product of r-bST subcutaneously. The hyperketonemia was caused by IV infusion of 5 mM / kg BW of beta-hydroxybutyrate (BHB) during two hours and hyperlipidemia with IV injection of a 20% fish oil solution corresponding to 0.54 g of triglyceride / kg BW in four days course. These infusions successfully caused the expected effects. In the first experiment, treatment with r-bST caused a significant increase of gluconeogenesis by converting BHB into glucose, higher levels of insulin, with consequent increased insulin resistance, increase in the concentration of IGF1 leading to mobilization of urea nitrogen for deposits and increased activity of GGT. In the second experiment, the r-bST greatly increased gluconeogenesis generated by metabolism of non esterified fatty acids (NEFA), BHB and glucose, with emphasis on NEFA, elevated levels of insulin and the percentage of insulin resistance, and increased activity of AST and GGT and bilirubin direct and total. In conclusion, the pharmacological action of r-bST is based on vigorous increase capacity on gluconeogenesis, concomitantly reducing the adverse catabolites (NEFA and BHB) in the PT process. An additional experiment was performed to compare the diagnostic capability of detecting BHB in whole blood, between the enzymatic diagnostic kit (Randox[®]), considered gold standard, and commercial test strips (Precision Xceed[®]) read in hand-held meter. 247 sheep blood samples were obtained in the first experiment in which BHB solution had been infused. Two ketonemic tracks were considered: 0.7 to 1.5 mM characterized as unapparent ketosis and above this value as a clinical ketosis. The correlation between the methods was high ($r = 0.98$, $P < 0.001$). In test strips method, ketosis unapparent showed sensitivity of 0.97 and specificity of 0.89 and in ketosis apparent

sensitivity of 0.99 and specificity of 0.75, respectively. The test strips can be used efficiently in the early diagnosis of cases of TP, with fast reading and low cost.

Keywords: Ewes. Nonsterified Fatty Acids (NEFA). β Hidroxibutyrate. Somatotropin and treatment.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 METABOLISMO ENERGÉTICO	20
2.1.1 Via glicolítica ou glicólise	21
2.1.2 Ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs	22
2.1.3 Gliconeogênese aplicada a ruminantes	23
2.1.4 Mobilização de triacilgliceróis ou lipólise	25
2.1.5 Formação de corpos cetônicos	27
2.1.6 Síntese de ácidos graxos e lipogênese	29
2.2 REGULAÇÃO DO METABOLISMO EM RUMINANTES	30
2.3 ADEQUAÇÕES DO METABOLISMO NO FINAL DE GESTAÇÃO	32
2.4 TOXEMIA DA PRENHEZ	33
2.5 TRATAMENTO DA TOXEMIA DA PRENHEZ	35
2.6 SOMATOTOPINA RECOMBINANTE BOVINA (r-bST)	36
3 ARTIGO 1 PERFIL METABÓLICO E HORMONAL DE OVELHAS SUPERALIMENTADAS SUBMETIDAS À HIPERCETONEMIA E TRATADAS COM SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (r-bST).	41
3.1 INTRODUÇÃO	42
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.4 CONCLUSÕES	62
REFERENCIAS	64
4 ARTIGO 2 PERFIL METABÓLICO E HORMONAL DE OVELHAS SUPERALIMENTADAS SUBMETIDAS À HIPERLIPIDEMIA E TRATADAS COM SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (r-bST).	67
4.1 INTRODUÇÃO	68
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	69
4.2.1 Animais, instalações e alimentação	69
4.2.2 Delineamento experimental	70
4.2.3 Indução de hiperlipidemia	70
4.2.4 Momento de avaliação dos animais	71
4.2.5 Coleta e processamento das amostras de sangue	72
4.2.6 Análise estatística	72
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.4 CONCLUSÕES	90
REFERENCIAS	92
5 ARTIGO 3 VALIDAÇÃO DE DOSÍMETRO PORTÁTIL DE BETA HIDROXIBUTIRATO NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE ACETONEMIA EM OVINOS	97
5.1 INTRODUÇÃO	97
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	99
5.3 RESULTADOS	101
5.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	104
REFERENCIAS	107
6 CONSIDERAÇÕES INTEGRADAS DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS	109
REFERÊNCIAS	111

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura representa um importante segmento da pecuária em algumas regiões brasileiras. No período de 2000 a 2011 o rebanho passou de 14,8 milhões de cabeças para 17,6 milhões de cabeças. Em 2011, a região Nordeste deteve o maior número de cabeças de ovinos, totalizando 10,11 milhões de cabeças, crescimento de 2,56% frente a 2010 (IBGE, 2011). A região Sul apresentou o segundo maior rebanho, 4,94 milhões de cabeças e crescimento de 1,23% comparado a 2010. A região Centro-Oeste apresentou o terceiro maior rebanho, 1,20 milhões de cabeças, queda de 4,62%, seguido da região Sudeste 768.210 cabeças (queda de 1,75% frente a 2010) e da região Norte com 627.563 cabeças, aumento de 7,05%. O estado do Rio grande do Sul ocupa primeira posição no número efetivo de ovinos do país, contando com 22,6% do rebanho nacional. Na sequencia, Bahia (17,7%) e Ceará (11,9%) ocupam 2a e 3a posição respectivamente. Pernambuco e Piauí ocupam 4a e 5a colocação com 9,2% cada um. Estes cinco estados representam 70,6% do efetivo nacional de ovinos do nosso país. Importante salientar que no Rio Grande do Sul, a principal finalidade do rebanho é a produção de lã, enquanto que no Nordeste é a produção de carne (IBGE, 2011).

Apesar das evidencias do crescimento e expansão dessa atividade no país, a mesma encontra-se em transição, migrando do sistema extensivo de criação para o intensivo, sendo evidente a carência de informações técnicas e de mercado que orientem corretamente a produção e comercialização de produtos ovinos.

Embora o sistema intensivo de criação favoreça o aumento de produtividade por área e animal, caso não seja adequadamente manejado, pode predispor o surgimento de muitas enfermidades, em especial as de origem metabólica, tais como fígado gorduroso (FG), cetose, toxemia da prenhez (TP) e intoxicação por cobre, enfermidades que podem acometer um número expressivo de ovinos nos principais rebanhos nacionais (ORTOLANI, 1996).

Em vistas ao crescimento do rebanho de ovinos e especial atenção nos custos de produção atribuídos a este sistema, a TP passou a ser amplificada principalmente em rebanhos de criação intensiva, sendo esporadicamente visto em rebanhos de criação extensiva. Nos Estados Unidos (EUA), os criadores se deparam com poucos casos anuais, no entanto em certos anos chegou a afetar 40% do rebanho (ANDREWS et al., 1997). De acordo com este autor, acredita-se que 2% das fêmeas em idade reprodutiva, do rebanho nacional dos EUA seja afetada anualmente pela doença. Embora o percentual de morbidade situe-se entre 1% a

2% do rebanho, a taxa de mortalidade exibe valor intimidante de 80% dentre os animais afetados (ROOK, 2000).

A TP é doença metabólica nutricional que afeta fêmeas tanto da espécie ovina quanto da espécie caprina, durante os dois últimos meses de gestação, mais comumente em animais que alberguem dois ou mais fetos, caracterizada pela hipoglicemia, aumento destacado de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no sangue, intensa formação de corpos cetônicos e lipidose hepática, que leva frequentemente tanto a morte da fêmea como dos fetos (ROOK, 2000). A TP pode ser classificada em dois tipos, a Tipo I ocorre em animais subnutridos e a Tipo II ocorre nas fêmeas alimentadas com dietas de alta densidade energética (ORTOLANI; BENESI, 1989).

Embora ovelhas muito bem nutridas apresentem escore corporal elevado, indicando acúmulo de gordura corpórea acima do adequado, tais fêmeas no final da gestação se tornam muito mais susceptíveis as várias situações de estresse, as quais provocam súbita redução no consumo de alimento, o que propicia o desenvolvimento da TP (REID, 1968; ROOK, 2000).

Fator limitante na recuperação de animais acometidos por TP está no tratamento. Este atualmente se baseia na terapia de suporte, a qual na maioria das vezes é constituída por soluções que contenham glicose ou precursores da glicose e soluções eletrolíticas. Contudo, nem sempre essas terapias produzem resultados satisfatórios, pois ovelhas como TP assim tratadas continuam mobilizando gordura corporal complicando a já presente esteatose hepática e a homeostase da glicemia (ORTOLANI, 1994).

Na década de 90, autores britânicos constataram que ovelhas com TP tratadas conjuntamente com soluções contendo glicose adicionada de somatotropina recombinante bovina (r-bST) apresentavam melhora clínica mais destacada e maior chance de sobrevivência (ANDREWS et al., 1996; SCOTT et al., 1998). Embora os resultados iniciais fossem promissores, tais pesquisadores não puderam nem entender os mecanismos de atuação da r-bST nem continuar as pesquisas com esse hormônio, visto que a Comunidade Européia proibiu determinadamente o uso desse medicamento até para uso terapêutico e de pesquisa (ORTOLANI, 2014)¹.

Desta forma, seriam necessários maiores estudos para complementar as informações geradas pelos autores britânicos supracitados, em especial para se averiguar as vantagens do uso desse hormônio na melhora do metabolismo energético de ovelhas bem condicionadas assim como das vantagens do uso de r-bST como agente metafilático na

¹ ENRICO LIPPI ORTOLANI, 2014 - Comunicação pessoal.

prevenção de TP. Devido à complexidade do tema e dos mecanismos de atuação da r-bST, revisa-se a seguir esses assuntos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO ENERGÉTICO

O organismo necessita de energia para o correto funcionamento de todos os órgãos e para manutenção da vida. Essa energia é obtida pela oxidação de cadeias de carbono, sendo a energia gerada fornecida aos diversos tecidos, sob constantes taxas de transporte e interconversões entre carboidratos, lipídeos e proteínas (HERDT, 1988).

Alguns órgãos como cérebro, medula, rins, eritrócitos e glândula mamária necessitam obrigatoriamente da glicose como substrato energético para o correto funcionamento. Por isso, o organismo precisa manter as concentrações de glicose sempre disponíveis na circulação sanguínea (HERDT, 1988).

Diferente dos monogástricos e humanos que obtém a glicose da digestão de carboidratos da dieta e absorção intestinal, ou que ainda, mobilizam as reservas de glicogênio para o suprimento energético, os ruminantes obtém energia sob a forma de glicose essencialmente da gliconeogênese a partir do propionato e de precursores que não são carboidratos (lactato, aminoácidos, glicerol) (ASCHENBACH et al., 2010).

A ingesta dos ruminantes sofre ação das bactérias fermentativas do rúmen, portanto pouca glicose, se conseguir, passar pelos pré estômagos e estomago, consegue ser absorvida no intestino (HERDT, 1988). A fermentação que ocorre no rúmen transforma os carboidratos da ingesta em ácidos graxos voláteis ou ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), o acetato, o propionato e o butirato. Destes três, apenas o propionato serve como precursor para síntese de glicose em ruminantes (BERGMAN, 1990). O acetato, não é um composto glucogênico, e sim, fonte para formação de lipídeos. No processo da gliconeogênese a enzima piruvato carboxilase, é uma enzima chave, a qual é ativada pela formação do acetil CoA gerado pela beta hidroxibutirato gerado pela beta oxidação (KANEKO et al., 1997).

Antes de seguirmos adiante, é importante revermos as principais rotas metabólicas para melhor compreensão de todo mecanismo envolvido na geração de energia pelo ruminante em condições normais ou em condições adversas.

2.1.1 Via glicolítica ou glicólise

Nos monogástricos, o amido, principal fonte de carboidrato da dieta deve ser hidrolisado até glicose. A glicose pode ser transportada livremente na corrente sanguínea, em concentrações bem controladas. Ao adentrarem as células podem seguir rota aeróbica e ser oxidada a CO_2 e H_2O ou seguirem por rota anaeróbica e formar lactato (MARZZOCO; TORRES, 2007). O processo de glicólise está ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Esquema da via glicolítica simplificada

Fonte: Marzzoco e Torres (2007).

Uma vez dentro das células a glicose é fosforilada até glicose-6-fosfato (G-6-P) e catalisada pela enzima hexoquinase de forma irreversível. A G-6-P ao contrario da glicose

não pode ultrapassar a membrana plasmática, o que garante sua manutenção no interior das células (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Ocorre então, a isomerização da G-6-P para frutose 6 fosfato (F-6-P) por ação da enzima fosfoglicoisomerase e então nova isomerização catalisada pela enzima fosfofrutoquinase 1 (FFK 1) de forma irreversível formando a frutose-1,6-bifosfato (F-1,6-P). A F-1,6-P é clivada em diidroxiacetona fosfato e gliceroaldeído 3 fosfato por ação da enzima aldolase. Essas duas moléculas são isômeras e portanto diidroxiacetona fosfato pode se converter em gliceroaldeído 3 fosfato possibilitando então que todos os carbonos da glicose sejam transformados em piruvato. A partir daqui e da isomerização supracitada, todas as reações ocorrem de forma (MARZZOCO; TORRES, 2007).

As duas moléculas de gliceroaldeído 3 fosfato são novamente fosforiladas formando duas moléculas de 1,3-bifosfoglicerato catalisada pela enzima gliceroaldeído 3 fosfato desidrogenase. A enzima fosfoglicerato quinase então catalisa a reação 1,3-bifosfoglicerato para 3-fosfoglicerato. Por intermédio da fosfoglicerato mutase a 3-fosfoglicerato se transforma em 2-fosfoglicerato. Em seguida a enolase promove a formação do fosfoenolpiruvato e então a formação de piruvato ocorre de forma irreversível pela ação da enzima piruvato quinase (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Como já citado anteriormente, o piruvato pode então sofrer oxidação anaeróbica formando então lactato como produto final ou sofrer, oxidação aeróbica e ser transformado em Acetil-CoA (KANEKO et al., 1997).

2.1.2 Ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs

O acetil-CoA formado na via glicolítica aeróbica é o ponto de convergência do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Vários aminoácidos também produzem piruvato, logo acetil-CoA ao serem degradados. Os ácidos graxos também produzem acetil-CoA, porém sem a formação intermediária de piruvato (MARZZOCO; TORRES, 2007).

O ciclo do ácido cítrico (Figura 2) se inicia com a condensação do acetil-CoA com oxaloacetato formando uma molécula de citrato por meio da reação catalisada pela enzima citrato sintase. O Citrato então é isomerizado à isocitrato que sofre ação da enzima isocitrato desidrogenase e gera α ceto-glutarato (MARZZOCO; TORRES, 2007).

O α ceto-glutarato é transformado para succinil CoA por ação da enzima α ceto-glutaratodesidrogenase. A succinil CoA é convertida a succinato pela enzima succinato sintetase. O succinato é oxidado a fumarato pela enzima succinato desidrogenase. O fumarato é hidratado a malato pela fumarase e a malato desidrogenase oxida malato a oxaloacetato (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Figura 2 - Esquema simplificado do Ciclo do ácido cítrico

Fonte: Marzocco e Torres (2007).

2.1.3 Gliconeogênese aplicada a ruminantes

Gliconeogênese, é a transformação de piruvato ou de precursores da glicose em glicose, e esta processa-se no sentido oposto ao da glicólise utilizando quase todas suas enzimas, com exceção daquelas que catalisam reações irreversíveis (MARZZOCO; TORRES, 2007). O fígado é o principal órgão responsável pela gliconeogênese, já que enzimas chave da transformação de precursores glucogênicos, encontram-se somente neste órgão (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Quase toda a glicose produzida pelo ruminante é proveniente da via gliconeogênese (ASCHENBACH et al., 2010). O propionato, que é o maior precursor da glicose no metabolismo de ruminantes é absorvido pela parede ruminal e segue até o fígado para ser convertido à glicose. O propionato entra nos hepatócitos para ser convertido até piruvato pelas reações ilustradas na figura 3.

Figura 3 - Esquema simplificado da gliconeogênese em ruminantes

Fonte: Marzocco e Torres (2007).

O propionato converte-se a propionil CoA por intermédio da enzima Propionil CoA carboxilase. Propionil CoA transforma-se a metil malonil CoA pela enzima Metil malonil CoA mutase. Metil malonil CoA por sua vez converte-se a piruvato (KANEKO et al. 1997).

A reação antes catalisada pela piruvato quinase que transformava fosfoenolpiruvato para piruvato, agora é substituída por duas reações, catalisadas pela piruvato carboxilase e pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase produzindo oxaloacetato. O oxaloacetato passa para o citosol, e por ação da fosfoenolpiruvato carboxiquinase é convertido a fosfoenolpiruvato. Este é transformado em frutose-1,6-bifosfato pelas enzimas que também compõem a glicólise, que

assim como catalisam reações reversíveis, podem operar a via no sentido inverso (MARZZOCO; TORRES, 2007).

A frutose-1,6-bifosfato converte-se em frutose-6-fosfato. Em lugar da reação irreversível catalisada pela enzima FFK 1 ocorre uma reação de hidrólise pela frutose-1,6-bifosfatase. A frutose-6-fosfato pode se isomerizar para glicose-6-fosfato.

No lugar de outra reação irreversível promovida pela glicoquinase, entra em ação a glicose-6-fosfatase presente exclusivamente em fígado e rins, que converte a glicose-6-fosfato à glicose (MARZZOCO; TORRES, 2007).

O glicerol, pode ser utilizado como substrato gliconeogênico e então, é fosforilado à glicerol-3-fosfato pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase e oxidado a diidroxiacetona fosfato que segue pelas reações da via gliconeogênese relatada.

2.1.4 Mobilização de triacilgliceróis ou lipólise

A mobilização de triacilgliceróis (TAG) está sujeita a ação das lipases, especialmente da Lipase Hormônio Sensível (LHS) do adipócito. A enzima promove a hidrólise do TAG em ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e glicerol (Figura 4).

Figura 4 - Degradação de Triacilgliceróis

Fonte: Marzzoco e Torres, (2007).

O glicerol não pode ser reaproveitado no adipócito devido à ausência da enzima glicerol quinase, a qual converte o glicerol em glicerol-3-fosfato. Por isso, glicerol segue para o fígado, que possui a enzima citada, e que transforma glicerol em diidroxiacetona fosfato da via gliconeogênese (VERNON, 2005).

Os AGNEs são liberados dos adipócitos e conduzidos pela corrente sanguínea ligados pela albumina, até o fígado ou músculo para serem utilizados como substrato energético. Os AGNEs não são utilizados por tecidos como cérebro e hemácias pois estes órgãos utilizam obrigatoriamente a glicose como fonte de energia.

Quando chegam até o fígado ou tecido muscular, os AGNEs entram nas células e são convertidos à sua forma ativa e irreversível, o acil-CoA por intermédio da enzima acil-CoA sintetase associada a membrana externa da mitocôndria. A membrana interna da mitocôndria é impermeável a acil-CoA. Sendo assim, este composto necessita acoplar-se a um carreador para ser oxidado no interior da mitocôndria e gerar energia. O grupo acila da acil-CoA, portanto, liga-se a carnitina-acil transferase que por sua vez, possui duas isoformas, denominadas I e II que se localizam na face externa e interna da mitocôndria respectivamente. Desse modo e de forma reversível, a carnitina acil transferase conduz o grupamento acila dos ácidos graxos para o interior da mitocôndria onde será submetida à oxidação.

A acil-CoA presente no interior da mitocôndria é oxidada pela via denominada β oxidação ou Ciclo de Lynen (Figura 5). Numa sequência de 4 reações, a acil-CoA é oxidada à acetil-CoA, produzindo FADH_2 e NADH .

Figura 5 - Via da Beta oxidação ou Ciclo de Lynen. A única reação irreversível é aquela catalisada pela acil-CoA desidrogenase

Fonte: Marzzoco e Torres, (2007).

O acetil-CoA gerado na β oxidação pode seguir por duas rotas alternativas, na primeira delas, o acetil-CoA pode combinar-se com oxaloacetato e ser oxidado até CO_2 e H_2O na via do ciclo do ácido cítrico. Na segunda alternativa o acetil-CoA pode ser convertido à corpos cetônicos e assim serem utilizados como opção no suprimento de energia aos tecidos.

2.1.5 Formação de corpos cetônicos

Em condições normais, pequena quantidade de acetil-CoA é transformada em acetoacetato e BHB (corpos cetônicos) nos hepatócitos. A acetona, terceiro corpo cetônico mais comum, é formado a partir da descarboxilação espontânea do acetoacetato (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Estes corpos cetônicos, são formados na matriz mitocondrial pela condensação de três moléculas de acetil-CoA em duas etapas. A primeira, duas moléculas de acetil-CoA formam acetoacetil-CoA, catalisada pela enzima tiolase. A reação do acetoacetil-CoA com uma terceira molécula de acetil-CoA forma a 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA (HMG-CoA). A clivagem deste composto origina acetoacetato que por sua vez produz BHB e acetona (MARZZOCO; TORRES, 2007) (Figura 6).

Figura 6 - Esquema simplificado da cetogênese

Fonte: Marzzoco e Torres, (2007).

Os corpos cetônicos são liberados na corrente sanguínea para serem utilizados por tecidos extra hepáticos como fonte de energia. O aproveitamento do BHB fica condicionado à sua conversão a acetoacetato por meio da enzima β -hidroxibutirato desidrogenase. O acetoacetato em tecidos extra hepáticos, receberá uma CoA de succinil-CoA catalisada pela enzima β -cetoacil-CoA-transferase formando acetoacetil-CoA e succinato. A acetoacetil-CoA volta para ciclo da Beta oxidação, e por ação da tiolase é clivada em 2 moléculas de acetil-CoA que podem ser oxidadas no ciclo do ácido cítrico (Figura 7).

Figura 7 - Esquema simplificado da utilização de Beta Hidroxibutirato por tecidos extra hepáticos

Fonte: Marzzoco e Torres, (2007).

2.1.6 Síntese de ácidos graxos e lipogênese

A síntese de triacilglicerol (TAG) ocorre em grande proporção no fígado e mínima porcentagem no tecido adiposo. Acetil-CoA e malonil-CoA vão funcionar como grandes doadores de cadeias de carbono para síntese desses compostos (MARZZOCO; TORRES, 2007). A malonil CoA é formada pela carboxilação de um acetil-CoA catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase. A ativação desta enzima constitui ponto importante de regulação da síntese de ácidos graxos (Figura 8).

Malonil CoA e Acetil CoA vão sofrer uma série de reações para o alongamento da cadeia de acordo com o ácido graxo a ser formado. Além disso, para síntese de triacilglicerol é necessária uma molécula de glicerol para completar tal formação. No tecido hepático, glicerol-3-fosfato, a forma ativada do glicerol, é obtido pela fosforilação do glicerol catalisada pela glicerol quinase (MARZZOCO; TORRES, 2007). O glicerol, por intermédio da glicerol-3-fosfato acil transferase (GPAT) vai se juntar as cadeias de ácidos graxos que estão se formando, que por fim, culminam na produção do TAG.

Figura 8 - Esquema resumido de formação de triacilglicerol em hepatócito de ruminantes

Fonte: Marzzoco e Torres, (2007).

2.2 REGULAÇÃO DO METABOLISMO EM RUMINANTES

Muitas vezes, a gliconeogênese e a cetogênese estão diretamente relacionadas entre si, ou seja, quando uma aumenta a outra também aumenta. A compreensão dessa relação é imprescindível no estudo das doenças de caráter metabólico que afetam os ruminantes. Acredita-se que o oxaloacetato seja o principal fator de regulação que relacionam os processos de gliconeogênese e cetogênese (HERDT, 1988).

Quando a demanda por glicose aumenta nos ruminantes, o oxaloacetato presente na mitocôndria é requerido para produção desta fonte de energia. No caso do animal estar bem nutrido, esse requerimento é prontamente atendido por via gliconeogênese. Entretanto, caso este ruminante esteja submetido à longo período de privação alimentar, não haverá oxaloacetato em quantidades suficientes para se condensar com acetil CoA para subsequente formação de energia via ciclo do ácido cítrico, e então, acetil CoA se acumula na mitocôndria e inicia formação de corpos cetônicos (HERDT, 1988).

Apesar desta teoria ter sido fundamental no entendimento da cetose em ruminantes, haviam ainda lacunas na compreensão do mecanismo desencadeador de tal afecção. Uma das lacunas procurou ser preenchida com a hipótese de que, os corpos cetônicos eram formados

em quantidades excessivas de acordo com o volume de acetil CoA formado. Esse acetil CoA era gerado excessivamente pela oxidação de grandes quantidades de TAG (HERDT, 1988).

As pesquisas sugeriram que o mecanismo de entrada dos ácidos graxos para o interior da mitocôndria constituiria outro ponto crucial de regulação do metabolismo, mais especificamente da cetogênese. Caso os ácidos graxos não fossem estimulados a entrar nas mitocôndrias, não seriam gerados acetil CoA para síntese de corpos cetônicos a serem utilizados como fonte de energia em situações de privação alimentar (HERDT, 1988).

O transporte dos ácidos graxos para as mitocôndrias é controlado indiretamente pela disponibilidade da glicose para o organismo. Em períodos onde ocorre grande demanda por glicose o transporte de ácidos graxos é estimulado para suprimento energético, no entanto, em ocasiões onde a disponibilidade é mitigada, esse transporte é inibido (HERDT, 1988).

Os ácidos graxos que não são oxidados podem ser reesterificados e formar TAG (HERDT, 1988) já que o excesso de ácidos graxos no interior das células é tóxico e pode causar danos ao tecido (VERNON, 2005). Os TAG formados em tecido hepático são exportados do fígado sob a forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e assim, podem prover ácidos graxos para outros tecidos como, por exemplo, glândula mamária, para serem metabolizados e utilizados como energia por estes tecidos (HERDT, 1988).

Em situações de balanço energético negativo, quando há necessidade de rápido aporte de glicose para os tecidos, o processo de formação de TAG e lipoproteínas fica inibido. O glicerol necessário para incorporação às cadeias de ácidos graxos reesterificados, sofre um desvio de rota e segue para incorporação em gliconeogênese, ciclo do ácido cítrico e subsequente formação de energia. De acordo com Marzzoco e Torres (2007), o glicerol contribui com 5% da glicose do organismo de um ruminante quando este se encontra bem nutrido, enquanto que em situações de balanço energético negativo o glicerol pode contribuir com 23% da glicose produzida.

O excesso de corpos cetônicos no organismo exerce *feed back* negativo para a liberação de ácidos graxos no tecido adiposo. Esse mecanismo sofre influência hormonal, e a insulina exerce efeito na supressão da mobilização de gordura corporal. O papel da insulina e do glucagon no metabolismo de ruminantes parece ser semelhante ao dos monogástricos porém com ações reduzidas em magnitude. De forma geral, os ruminantes parecem demonstrar certa resistência à insulina comparada aos monogástricos. Isso pode ser atribuído ao fato do ruminante não possuir a glicólise como via referencial de produção de glicose e sim, a gliconeogênese.

O glucagon parece atuar no fígado aumentando taxas de gliconeogênese a partir do propionato e de aminoácidos e assim, aumentando o suprimento de glicose para os tecidos. Entretanto, a atuação do glucagon parece ser pontual ao fígado, com pouca ou nenhuma ação sobre outros tecidos do organismo. A insulina parece atuar de forma favorável em tecido adiposo estimulando a utilização da glicose e acetato na síntese de ácidos graxos (ETHERTON; EVOCK, 1986). Em outros tecidos, a insulina promove a utilização da glicose e a incorporação de aminoácidos em proteínas (BERGMAN, 1990). Altas concentrações de insulina estimulam a formação de TAG enquanto que baixas concentrações direcionam TAGs pra fora do tecido adiposo para tecido muscular esquelético, glândula mamária e outros tecidos. O efeito da insulina no tecido hepático de ruminantes ainda não é totalmente compreendido. A insulina atua como redutor das concentrações de glicose no tecido hepático de ovelhas (WEST; PASSEY, 1967) Parece que a relação entre insulina e glucagon é mais importante do que suas concentrações isoladamente. Concentrações reduzidas desta relação é que exercem influência sobre a cetogênese nos ruminantes (HERDT, 1988).

2.3 ADEQUAÇÕES DO METABOLISMO NO FINAL DE GESTAÇÃO

O período final da gestação em ovelhas constitui período crítico. As adaptações metabólicas desta fase fisiológica (homeorrese) são de grande magnitude e se não forem bem orquestradas, podem culminar no desenvolvimento de uma serie de problemas, alguns desses fatais a saúde (BELL, 1995).

Neste período, os requerimentos por glicose e aminoácidos por parte dos fetos aumentam em grande proporção. Desta forma, o metabolismo materno sofre adaptações do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Ao final da gestação, a ovelha prenhe aumenta consumo de alimentos, e esse aumento se eleva de acordo com o numero de fetos que carrega (WILSON et al., 1983). O aumento do plano nutricional atende a demanda por glicose necessária ao desenvolvimento fetal.

Sendo assim as taxas de gliconeogênese hepática aumentam consideravelmente, porém, há redução da utilização da glicose por tecidos periféricos (BELL, 1995).

As concentrações de AGNEs e corpos cetônicos, tendem a ser um pouco mais altas durante este período de final de gestação mesmo em ovelhas alimentadas de acordo com os requerimentos nutricionais para esta fase gestacional (PETERSON et al., 1994). Entretanto, as

concentrações destes metabólitos passam a ser exacerbadas em casos de restrição voluntária ou involuntária por alimentos. Há elevação da utilização de AGNEs e BHB pelos tecidos periféricos.

No final da gestação, há aumento na transformação de aminoácidos em proteínas independente dos teores de proteína na dieta das ovelhas prenhes. O aumento da ingestão protéica na dieta de ovelhas prenhes ao final da gestação demonstrou que houve redução das concentrações de ureia sanguínea sugerindo redução do catabolismo hepático de aminoácidos.

Ocorre também neste período, resistência à ação da insulina, demonstrada pela diminuição da utilização da glicose pelos tecidos e pela redução de resposta da insulina frente à lipólise e mobilização de AGNEs (PETERSON et al., 1994).

2.4 TOXEMIA DA PRENHEZ

A TP é uma doença de caráter metabólico e nutricional que afeta ovelhas ou cabras prenhes geralmente albergando 2 ou mais fetos e causada por distúrbio no metabolismo de carboidratos e lipídeos ao final da gestação (REID, 1968). A doença é mais comum em ovelhas que cabras, e pode afetar fêmeas magras (com escore de condição corporal < 2 na escala de 5 pontos – TP tipo I) ou fêmeas gordas (com escore de condição corporal ≥ 4), as quais trataremos neste trabalho (ROOK, 2002).

A patogenia da TP tipo II ainda não está totalmente elucidada (ANDREWS, 1997). Acredita-se que a fêmea prenhe de múltiplos fetos, ao final da gestação, desenvolva uma inabilidade em mobilizar a glicose requerida pelos fetos e para sua própria manutenção (MARTENIUK; HERDT, 1988).

No terço final de gestação, ocorre cerca de 80% do crescimento dos fetos que além de competirem por espaço abdominal na fêmea prenhe, passam a requerer mais nutrientes para seu desenvolvimento. Essa condição leva ao balanço energético negativo resultante do aumento da demanda energética devido ao rápido crescimento fetal e insuficiente ingestão (GONZALEZ; SILVA, 2006). Neste momento, a susceptibilidade das fêmeas em desenvolverem TP é muito variável, e isso provavelmente seja atribuído à reduzida eficiência hepática na geração de glicose, frente a outras fêmeas menos susceptíveis (ANDREWS et al., 1997).

A redução do plano nutricional na ovelha prenhe ocasiona hipoglicemia e consequente mobilização de gordura corporal. Assim os lipídeos são mobilizados e grandes quantidades de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) chegam ao fígado para serem oxidados. Entretanto, a oxidação dos AGNEs no fígado fica condicionada ao adequado aporte de oxaloacetato proveniente do propionato da dieta. Como a fêmea encontra-se em balanço energético negativo, esse metabólito sofre redução de suas concentrações. O Acetil-coA gerado na oxidação dos AGNEs, ao invés de se condensar com oxaloacetato para gerar glicose, desvia sua rota para formação de corpos cetônicos: acetoacetato, BHB e acetona que são solúveis e podem se difundir livremente no sangue e daí serem utilizados como suprimento energético em diversos tecidos (REID, 1968; DE FRONZO et al., 1969; ANDREWS et al., 1997; ROOK, 2000). A acetona é volátil, o acetoacetato é instável e pode transformar-se quimicamente em acetona e dióxido de carbono (CO_2) e o BHB é o corpo cetônico mais estável no organismo sendo o principal corpo cetônico encontrado em casos de cetose (PAYNE; PAYNE, 1987).

Ao final da gestação, o requerimento por glicose aumenta de forma espetacular por cada um dos fetos, chegando a cerca de 30 a 40 gramas de glicose por dia (ROOK, 2000). Para assegurar adequado suprimento energético o tecido adiposo é mobilizado em larga escala. O balanço energético negativo e o aumento da mobilização de gordura superam a capacidade de metabolização do fígado devido a intensidade do processo, os hepatócitos passam a ser ineficientes em exportar ácidos graxos como constituintes de lipoproteínas de baixa densidade (KLEPPE et al., 1988), e parecem incapazes de aumentar a oxidação dos ácidos graxos e diminuir as taxas de esterificação (LOMAX et al., 1983), podendo causar lipidose hepática e consequente dano às funções hepáticas (SCHULUMBOHN; HARMEYER, 2004). A lipidose interfere drasticamente com a capacidade dos hepatócitos de gerar glicose, pelo processo de gliconeogênese, desencadeando num quadro fatal de hipoglicemia (BRICKNER et al., 2009).

Sendo assim, os corpos cetônicos acumulam-se no organismo causando quadros de cetonemia e cetonúria, os quais são característicos em ovelhas toxêmicas no final da gestação (ORTOLANI, 1996). Harmeyer e Schlumbohn (2006) demonstraram que ovelhas prenhes de dois fetos apresentam maiores concentrações de BHB no final da gestação e início da lactação que no período seco. Além disso, mostraram que isso não acontecia em ovelhas prenhes de apenas um feto sugerindo que, a adaptação metabólica ao final da gestação de gêmeos fosse aumentada em relação as fêmeas prenhes de um único feto. Esses autores também sugeriram que, à medida que os corpos cetônicos vão se acumulando no organismo, a capacidade de

utilização destes pelos tecidos vai diminuindo acarretando efeitos adversos no organismo e surgimento de sintomas clínicos.

Outra hipótese no distúrbio do metabolismo energético de ovelhas prenhes de múltiplos fetos seria de que, esses animais possuem ação da insulina prejudicada, ou seja, resistência insulínica (MERTENIUK; HERDT, 1988; ROOK, 2002). Marteniuk e Herdt (1988) inferem similaridade de quadros de TP tipo II e diabetes mellitus tipo II em humanos onde coexistem hiperlipidemia e hiperinsulinemia (BRUNZELL, 1981). Wastney et al (1983) observaram que, ovelhas prenhes de dois fetos no terço final de gestação, em balanço energético negativo que não apresentaram resistência insulínica, apresentaram diminuição dos teores da glicose produzida enquanto que fêmeas com resistência a insulina, mantiveram as concentrações de glicose durante o período final da gestação.

Em face a hipoglicemia instalada, as glândulas adrenais são estimuladas a produzir o cortisol e assim perpetuar o stress que o animal já se encontra. O aumento das concentrações de cortisol sanguíneo estimulam ainda mais a resistência insulínica pelos tecidos. O cortisol então contribui ainda mais para inibição da utilização da glicose pelos tecidos de fêmeas com TP (SARGISON, 2007).

2.5 TRATAMENTO DA TOXEMIA DA PRENHEZ

O tratamento da TP baseia-se na administração de fontes de energia para a fêmea prenhe ou ainda, na remoção de fatores que estariam aumentando os requerimentos por energia nestas ovelhas afetadas (BROZOS et al., 2010). Em animais hospitalizados, o tratamento intensivo requer a cateterização do animal e infusão de 5 a 7 gramas de glicose a cada 3 ou 4 horas até completa recuperação (ROOK, 2000).

Outra alternativa de tratamento em medicina veterinária intensiva consiste na administração de 100 a 200 mL de propilenoglicol duas vezes ao dia (ROOK, 2000). Andrews et al. (1997) recomenda a dose de 60 mL de propilenoglicol duas vezes ao dia para causar menos efeitos adversos. A melhor alternativa parece ser a de começar a tratar a fêmea com doses de 150 mL e 200 mL duas vezes ao dia durante o primeiro dia de tratamento e depois seguir com 60 mL duas vezes ao dia, nos dias subsequentes.

Administração oral de solução de dextrose e eletrólitos em dose de 160 mL por animal, 3 a 4 vezes ao dia durante 4 a 6 dias de tratamento também teve eficácia relatada por Sargison (2007).

Outras substâncias também foram utilizadas como precursores de glicose que também tiveram alguma eficácia, como, o glicerol, propionato sódico e lactato sódico, porém, não com eficácia como o propilenoglicol. Além disso, altas doses dessas substâncias interferem na microbiota ruminal podendo predispor o animal a quadros de acidose láctica ruminal (ROOK, 2000).

Em fêmeas que se encontram em estágios iniciais da doença e de preferência na última semana de gestação pode-se induzir o parto destes animais com a administração de prostaglandina 2 alfa (PGF₂α). Se as fêmeas não se encontrarem ao certo na última semana de prenhez mas acerca dos 140 dias de gestação, o parto poderá ser induzido com 15 a 20 mg de dexametazona, 10 mg de betametazona ou ainda 2,5 mg de flumetazona tomando o cuidado de observar a ovelha nas próximas 40 a 45 horas (ROOK, 2000).

Nos casos de gestação avançada, a remoção dos fetos pode ser realizada pela cesareana, entretanto, o prognóstico nesses casos é ruim. A taxa de sobrevivência de fêmeas toxêmicas submetidas a cirurgia para remoção dos fetos dificilmente ultrapassa 60% e pode ser menor caso os fetos se encontrem mortos no útero em processo de autólise (BROUNTS et al., 2004).

A somatotropina recombinante bovina (r-bST) surge como alternativa satisfatória no tratamento da TP em ovinos. O r-bST, surgiu com maior expressividade na década de 1980, por promover o particionamento de nutrientes acerca das principais vias metabólicas. Estudos de Andrews et al (1996) e Scott et al. (1998) demonstraram resultados favoráveis com o uso desta substância no combate aos efeitos da TP, no entanto, as pesquisas tiveram que ser interrompidas já que, o uso de promotores de crescimento foi proibido pela comunidade europeia e alguns locais dos EUA. O uso do r-bST ficou restrito apenas para fins de pesquisa (BAUMAN; CURRIE, 1980).

2.6 SOMATOTOPINA RECOMBINANTE BOVINA (r-bST)

A somatotropina bovina (bST), também chamada de hormônio do crescimento, é produzida pela hipófise anterior modulando direta ou indiretamente o crescimento,

desenvolvimento e funções reprodutivas (BAUMAN, 1992). A bST difere da somatotropina humana (hST) devido a sequência de aminoácidos da cadeia que a compõem, além disso, a estrutura dimensional entre bST e hST é diferente e os receptores para somatotropina nos tecidos humanos não são compatíveis a bST. Entretanto, a bST possui estrutura semelhante a somatotropina ovina sendo ativa nesta espécie animal (BAUMAN, 1992).

Os estudos com bST tiveram início em 1937 quando pesquisadores russos demonstraram que o uso do extrato hipofisário em vacas promove incremento da produção leiteira (ETHERTON; BAUMAN, 1998). Em seguida, constatou-se a existência de efeitos da bST sobre tecido muscular, adiposo, glândula mamária e no uso de nutrientes absorvidos no trato gastrointestinal (BAUMAN; CURRIE, 1980; BINES; HART, 1982). Posteriormente, Bauman (1992) relatou que a bST atuava como mobilizador agudo de reservas corporais em animais com balanço energético negativo desviando esta energia para a produção leiteira.

Com o desenvolvimento da biotecnologia e do advento da tecnologia do DNA recombinante foi possível nos anos 80, a síntese da somatotropina recombinante bovina (r bST), igualmente potente a bST em sua forma natural, passando a ser empregado para incrementar a produção leiteira das vacas em escala massal (BAUMAN, 1992). Assim, as pesquisas acerca deste composto se hipertrofiaram a partir desta década favorecendo o melhor entendimento do mecanismo de ação desse hormônio.

A somatotropina possui efeito somatogênico e metabólico (ETHERTON; BAUMAN, 1998). Por estimular a produção hepática de IGF-1 (insulin growth factor-1) a r- bST atua indiretamente na proliferação celular e no crescimento, assim como na partição e uso dos nutrientes, em especial da gordura e proteína nos tecidos muscular e adiposo. E de acordo com Etherton e Bauman (1998), é demonstrado que a somatotropina possui efeito na partição de nutrientes entre tecido muscular e adiposo que conduz à diferenciação ou alteração no crescimento destes tecidos. Em animais de crescimento a bST atua mobilizando gordura dos depósitos para posterior metabolismo e síntese de proteína na musculatura. Sendo assim, a somatotropina é capaz de direcionar os nutrientes para determinados tecidos de acordo com a necessidade.

No quadro 1 são demonstrados os efeitos biológicos da somatotropina em animais de produção durante crescimento e lactação (ETHERTON; BAUMAN, 1998).

Quadro 1 – Efeitos biológicos da somatotropina recombinante bovina em animais de produção durante o crescimento e lactação

Tecido	Processo Fisiológico Afetado
Músculo Esquelético (crescimento)	↑ Síntese de proteínas ↑ Incorporação de proteínas ↑ Utilização de glicose e aminoácidos ↑ Eficiência parcial da utilização de aminoácidos
Ossos (crescimento)	↑ Acréscimo mineral paralelamente ao crescimento tecidual
Tecido mamário (lactação)	↑ Síntese de leite com composição normal ↑ Utilização de nutrientes para síntese do leite ↑ Aumento da atividade das células secretórias ↑ Manutenção das células secretórias ↑ Circulação sanguínea consistente com a mudança na síntese do leite
Tecido Adiposo	↓ Utilização da glicose e oxidação da glicose ↓ Síntese lipídica se o balanço energético for positivo ↑ Lipólise basal se o balanço energético for negativo ↓ Estimulo do metabolismo do glicogênio sobre a insulina e síntese lipídica ↑ Estimulo lipolítico das catecolaminas ↑ Habilidade da insulina em inibir a lipólise ↓ Transcrição do ácido graxo sintetase ↓ Hipertrofia do adipócito
Fígado	↑ Produção de glicose ↓ Habilidade inibitória da insulina sobre a gliconeogênese
Intestino	↑ Absorção de cálcio e fósforo requeridos para produção de leite e ossos ↑ Habilidade da 1,25-vitamina D3 estimular a proteína de ligação do cálcio ↑ Proteína de ligação do cálcio
Efeitos Sistêmicos	↑ Circulação de IGF-1 ↓ Circulação da proteína de ligação IGF-2 ↓ Oxidação de aminoácidos e uréia sanguínea nitrogenada ↓ Liberação de glicose ↓ Oxidação da glicose ↓ Resposta ao teste da tolerância à glicose ↑ Oxidação do AGNE se o balanço energético for negativo ↑ Débito cardíaco devido ao aumento da produção de leite ↑ Resposta imune

Fonte: Etherton e Bauman, (1998).

O hormônio de crescimento possui também efeito lipolítico. A injeção de somatotropina em animais domésticos evidenciou aumento temporário das concentrações de

AGNE no sangue devido a aumento de lipólise do tecido adiposo, sendo menos intenso este processo em vacas leiteiras com balanço energético positivo e de grande magnitude em balanço negativo acompanhada de aumento da oxidação hepática de AGNE preservando outros nutrientes importantes como a glicose e aminoácidos (PEEL; BAUMAN, 1987).

Os mecanismos pelos quais a bST altera o metabolismo de lipídeos, está envolvido com a responsividade do tecido adiposo à sinais homeostáticos e também, exerce ação como antagonista da insulina pois acredita-se que haja alteração nas vias metabólicas de ação deste hormônio (ETHERTON; BAUMAN, 1998).

Segundo revisão de Etherton e Bauman (1998), foi constatado que vacas leiteiras tratadas com bST apresentam aumento da utilização de glicose e diminuição da oxidação da glicose por todos os tecidos do organismo. Para Peel e Bauman (1987), durante o tratamento com bST pode ser observada redução da oxidação da glicose capaz de prover cerca de 30% a mais de glicose requerida para síntese da lactose láctea.

O uso de bST incrementa a gliconeogênese hepática (PEEL; BAUMAN, 1987; ETHERTON; BAUMAN, 1998). Peel e Bauman, (1987) constataram aumento da capacidade de produção da glicose a partir do propionato ruminal e do glicerol, proveniente da mobilização de TAG dos tecidos adiposos. Além disso, o tratamento com bST reduz a habilidade da insulina em inibir gliconeogênese, devido a uma redução da resposta hepática a este último hormônio (ETHERTON; BAUMAN, 1998). Além disto, o bST aumenta a oxidação do AGNE gerando no processo maior gliconeogênese, com a vantagem de não estimular a cetogênese e não provocar acúmulo de triacilglicerol (lipídeos) no tecido hepático (BAUMAN; VERNON, 1993).

Em animais em crescimento é atribuído ao bST maior eficiência da deposição dos aminoácidos absorvidos nos tecidos, redução nos teores sanguíneos de uréia e menor perda urinária de nitrogênio. Esse decréscimo nas concentrações de uréia reflete uma diminuição na oxidação dos aminoácidos pelo organismo (ETHERTON; BAUMAN, 1998).

Em vista dos evidentes distúrbios no metabolismo de carboidratos e lipídeos que se instalam nas fêmeas que desenvolvem a TP e dos efeitos da r-bST sobre estes aspectos, alguns pesquisadores testaram o uso do hormônio de crescimento no tratamento desta enfermidade (ANDREWS et al., 1996; SCOTT et al., 1998).

Andrews et al. (1996) testaram tratamento com r-bST em ovelhas com a TP instalada. Todos os animais diagnosticados com TP receberam tratamento suporte constituído por, injeção intravenosa de 100 mL de solução dextrose a 50% uma a duas vezes ao dia de acordo com a gravidade do caso, acrescido de 60 mL de propilenoglicol duas vezes ao dia. Os

animais com TP foram divididos em dois grupos, o primeiro que recebeu tratamento com r-bST na dose de 0,15 mg/kg de PV e o segundo, grupo controle, que não recebeu a r-bST. Estes pesquisadores não encontraram diferenças entre os grupos já que as taxas de sobrevivência entre os dois grupos foram similares, supondo que a r-bST não seria benéfica no tratamento da TP quando tratamento suporte fosse administrado conjuntamente. Atribuem mesmo efeito nestas taxas à adequada conduta no tratamento suporte administrada aos dois grupos. Assim, variáveis metabólicas também não diferiram entre os dois grupos. Esperava-se que os teores de glicose e BHB sofressem alterações em vista do suposto efeito diabetogênico e lipolítico promovido pela r-bST, no entanto, isso não ocorreu.

Scott et al. (1998) utilizaram 40 ovelhas prenhes de múltiplos que naturalmente desenvolveram a TP. Submeteram todas as ovelhas, a um tratamento de suporte que constituiu da administração oral de 160 mL de solução concentrada de dextrose e eletrólitos três vezes ao dia. Dividiram-se os animais em dois grupos, controle e tratado com bST por meio de uma única injeção subcutânea de 160 mg de r-bST de liberação lenta e o grupo controle recebeu o placebo. Os autores obtiveram maior taxa de recuperação (58,8% x 34,8%) e mais cordeiros ao nascimento (32,6% x 19,4%) em animais do grupo tratado versus controle. Os possíveis mecanismos de ação da bST não foram descritos por estes autores.

O contraste dos resultados sugere que maiores estudos sejam empreendidos para realmente constatar se a bST tem ou não ação positiva no tratamento da TP em ovelhas. Estudo recente utilizando tratamento com dose reduzida de bST no início da lactação de vacas leiteiras de alta produção indicaram que esta terapia reduziu a incidência de cetose nestes animais em relação ao grupo controle (GULAY et al., 2007). Até o momento ainda não foram realizadas pesquisas que estudassem um provável efeito metafilático da bST prevenindo a TP em pequenos ruminantes por meio do incremento da oxidação de AGNE, reduzindo de alguma forma a produção de corpos cetônicos, aumento da gliconeogênese, aumento do apetite, diminuição da utilização de glicose pela musculatura aumentando em contrapartida a disponibilidade deste nutriente nos tecidos extra-hepáticos como descrito por Gulay et al. (2007).

3 ARTIGO 1 PERFIL METABÓLICO E HORMONAL DE OVELHAS SUPERALIMENTADAS SUBMETIDAS À HIPERCETONEMIA E TRATADAS COM SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (r-bST) *Metabolic and hormonal profile of overnourished sheep submitted to hypercetonemia and treated with recombinant bovine somatotropin (r-bST).*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi esclarecer mecanismos bioquímicos e hormonais da ação da somatotropina recombinante bovina (r-bST), recomendada no tratamento de TP, por meio de indução experimental de quadro de hiperacetonemia em ovelhas com elevada condição corporal. Dezoito ovelhas Santa Inês, não prenhes e não lactentes com elevado escore de condição corporal, foram submetidas a indução de acetonemia com a infusão de solução Beta Hidroxibutirato (BHB) 5mM / kg de PV dos ovinos durante 2 horas. Três dias antes da indução, as ovelhas foram divididas em dois grupos, o primeiro foi tratado com injeção de 160mg de r-bST via subcutânea e o segundo, submetido a aplicação de solução salina isotônica (Controle) por mesma via. Foram coletadas amostras de sangue para dosagem plasmática de glicose e séricas de ácidos graxos não esterificados (AGNEs), beta hidroxibutirato (BHB), triacilgliceróis, colesterol, ureia, creatinina, proteína total, albumina, atividades de AST e GGT, insulina e IGF-1. O estudo obteve êxito na indução de hiperacetonemia com a infusão endovenosa de BHB. O excesso de BHB infundido gerou, em ambos os grupos, temporariamente uma diminuição nos teores de AGNEs, indicando uma menor lipólise. O r-bST causou aumento nos teores séricos de BHB, insulina, AGNEs, IGF 1, proteína total e globulina, de atividade de GGT e do percentual de resistência insulínica; assim como menores concentrações de colesterol, ureia e valores de relação albumina/globulina. O r-bST aumentou a transformação de BHB em glicose e a mobilização de nitrogênio ureico para os depósitos do organismo, por ação do IGF1. O trabalho identificou que o r-bST promoveu destacada gliconeogênese esclarecendo um dos mecanismos de ação do tratamento com este hormônio na TP.

Palavras-chave: Beta hidroxibutirato. Gliconeogênese. Insulina. Ovelhas. Tratamento.

3.1 INTRODUÇÃO

A cetose em ovelhas ocorre com mais frequência antes do parto e está associada a uma doença chamada Toxemia da Prenhez (TP). A TP é doença metabólica nutricional que afeta fêmeas durante os dois últimos meses de gestação, mais comumente em animais que albergam dois ou mais fetos e é caracterizada pela hipoglicemia, aumento destacado de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no sangue, intensa formação de corpos cetônicos e lipidose hepática, que leva frequentemente tanto a morte da fêmea como dos fetos (ROOK, 2000).

Essas fêmeas no final da gestação se tornam muito mais susceptíveis as várias situações de estresse, as quais provocam súbita redução no consumo de alimentos (REID, 1968; ROOK, 2000). Tais situações de súbito balanço energético negativo leva a uma intensa lipólise com enorme mobilização de AGNE, os quais vão ao fígado para serem metabolizados. Contudo, devido à intensidade do processo os hepatócitos nem sempre conseguem esterificar os AGNE aí presentes, concorrendo num quadro de lipidose hepática, assim como uma marcante oxidação dos AGNE poderá levar a destacada geração de corpos cetônicos. A lipidose interfere drasticamente com a capacidade dos hepatócitos de gerar glicose, pelo processo de gliconeogênese, desencadeando num quadro fatal de hipoglicemia (ROOK, 2000).

Se não corrigido, o distúrbio, em tempo hábil, a fêmea apresentará um complexo quadro clínico, caracterizado por sintomas nervosos, levando a morte tanto do conjunto de fetos como da ovelha. A detecção precoce de animais que desenvolvam TP é importante já que o sucesso do tratamento é comprometido pelo estado avançado de comprometimento clínico do animal (ORTOLANI, 1994).

Outro fator limitante na recuperação de animais acometidos por TP está no tratamento. Este se baseia na terapia de suporte, na maioria das vezes constituído por soluções que contenham glicose ou precursores da glicose e soluções eletrolíticas. Contudo, nem sempre essas terapias produzem resultados satisfatórios, pois ovelhas como TP assim tratadas continuam mobilizando gordura corporal complicando a já presente esteatose hepática e a homeostase da glicemia (ORTOLANI, 1994).

Na década de 90, autores britânicos constataram que ovelhas com TP tratadas conjuntamente com soluções contendo glicose adicionada de somatotropina recombinante bovina (r-bST) apresentavam melhora clínica mais destacada e maior

chance de sobrevivência (ANDREWS; HOLLAND-HOWES; WILKINSON, 1996; SCOTT et al., 1998; PEZZAROLI et al., 2013).

Embora os resultados iniciais fossem promissores, tais pesquisadores não puderam nem entender os mecanismos de atuação da r-bST nem continuar as pesquisas com esse hormônio, visto que a Comunidade Européia proibiu determinantemente o uso desse medicamento até para uso terapêutico e de pesquisa (ORTOLANI, 2014)².

Este estudo teve como objetivo esclarecer mecanismos bioquímicos e hormonais da ação da somatotropina recombinante bovina (r-bST), recomendada no tratamento de TP, por meio de indução experimental de quadro de hipercetonemia em ovelhas com elevada condição corporal.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 18 ovelhas Santa Inês, não prenhes e não lactentes entre 2 e 7 anos de idade com media de 50,0 kg de peso corporal. As fêmeas passaram inicialmente por 30 dias em período de adaptação, foram mantidas em baias coletivas e receberam alimentação constituída de 40 % de feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylum*) e 60 % da matéria seca de ração comercial concentrada contendo 15 % de proteína bruta e 70% de NDT.

Três dias antes do inicio do estudo, as ovelhas foram divididas aleatoriamente em dois grupos, perfazendo: 1) grupo controle, submetido à aplicação de 0,65mL de solução salina isotônica, subcutânea, na fossa isquiorretal e 2) grupo r-bST, tratado com aplicação única de 160 mg ou 0,65mL de r-bST de forma semelhante a descrita para o grupo Controle.

Três dias após tratamento, os ovinos foram submetidos a protocolo de indução de acetonemia segundo modelo conduzido por Harmeyer e Schlumbohm (2003), porém, com adaptações. O protocolo consistiu de 2 horas de infusão com solução D-BHB (Alfa Aesar[®], Johnson Matthey Company, Heysham, England) na razão de 5 mM para cada kg de peso vivo dos ovinos na veia jugular. A solução de BHB era preparada diluindo o reagente, que possuía peso molecular de 126,09 gramas (g), em 360 mL de água

² ENRICO LIPPI ORTOLANI: comunicação pessoal

deionizada. O reagente era ajustado e pesado de acordo com o peso do animal. Assim, levando-se em consideração a média de peso dos animais de 50 kg, a solução continha em média 250 mmol de D-BHB. Calculando para o peso molecular do reagente, eram necessários em média 31,5 g de D-BHB para 360 mL de água deionizada.

A solução de BHB inicialmente atingia pH básico com valores em torno de 9,75 a 10,40. Com auxílio de pHmetro de bancada a solução teve seu pH ajustado para 7,4 com ácido clorídrico (HCl) 5 molar. Assim eram necessárias apenas algumas gotas de HCl 5M para correção do pH.

Para infusão contínua e melhor manejo dos animais durante a indução, foi implantada na veia jugular direita um cateter de plástico (Intracat™, BD). Tal solução foi administrada a uma velocidade de 0,01 mM/kg de PV por minuto, perfazendo um total de 120 minutos de infusão. Durante as duas horas de infusão, amostras de sangue eram coletadas por venipunctura da jugular externa esquerda a cada 20 minutos perfazendo assim 6 momentos de coleta (T1 ao T6). O momento inicial T0 correspondeu ao momento antes do início da infusão para verificar os níveis basais de BHB dos animais. Para evitar discrepâncias entre os diferentes momentos de alimentação dos animais, estes foram submetidos a 18 horas de jejum antes do início do estudo. Ao término da indução foram realizadas seis coletas adicionais realizadas após 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos do término da indução, T7 ao T12, respectivamente, para verificar a eliminação da substância no organismo dos animais.

Foram coletadas amostras de sangue em tubos com sistema a vácuo (Vacutainer®, BD, New Jersey, USA) contendo anticoagulante fluoreto de sódio e sem anticoagulante para obtenção de soro. Os tubos foram homogeneizados imediatamente após a coleta e mantidos refrigerados em recipiente de isopor com gelo até serem processados em laboratório. Posteriormente os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 697 g para separação do plasma que foi armazenado a menos 20°C até análise por meio de kits laboratoriais. Foram utilizados kits comerciais Randox® (Randox Laboratories Ltd., Co. Antrim, UK) e mensurados em analisador bioquímico automatizado (modelo Daytona, Randox Laboratories Ltd., Co. Antrim, UK).

A estatística descritiva dos dados, representada pelas médias aritméticas e os coeficientes de variação (CV) de cada tratamento, foi obtida pelo programa SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias de cada tempo foram realizados utilizando o *Guide Data Analise*.

As variáveis bioquímicas foram analisadas como medidas repetidas no tempo, referentes aos momentos de coleta dos dados (tempo) de acordo com cada tratamento. Quando a premissa de esfericidade não foi respeitada ($P < 0,05$), as probabilidades de tempo (P tempo) e das interações dos tratamentos com o tempo (P trat*tempo) foram corrigidas pelo teste de Greenhouse-Geisse Epsilon, utilizando-se o comando *Repeated* gerado pelo procedimento *GLM*. A comparação entre as médias dos grupos dentro de cada tempo (P) foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means* (LSMeans).

Foram estimadas as correlações de Pearson onde foram considerados intervalos de 0,00 a 0,30 como correlação de baixa intensidade; de 0,31 a 0,60 de média intensidade e 0,61 a 1,00 de alta intensidade (SAMPAIO, 1998). Foi utilizado o nível de significância de 5% para todos os testes realizados. Para a tabulação dos dados e confecção dos gráficos foi utilizado o programa Microsoft Windows Excel, versão 2007.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo alcançou o objetivo de promover hiperacetonemia em ovelhas pela administração endovenosa de D (-) Beta hidroxibutirato (D-BHB) com consequente aumento das concentrações de BHB sanguíneo no decorrer da infusão com duração de duas horas (Gráfico1). O D-BHB representa 85% do total de BHB circulante no sangue, ou em torno de 55% do total de corpos cetônicos de um ovino normal (LENG; ANNISON, 1964). Vinte minutos antes do término da infusão com D-BHB, considerado momento de pico de concentração, foram obtidos valores máximos que atingiram 3,0 mM de BHB no grupo controle e 3,9 mM de BHB no grupo r-bST . Valores acima de 1,6 mM de BHB sanguíneo caracterizam quadros de cetose, típicos de TP, em ovinos (BALIKCI; YILDIZ; GURDOGAN, 2009; LACETERA et al. 2001).

No decorrer no experimento os teores médios de D-BHB foram significativamente superiores nas ovelhas tratadas previamente com r-bST ($P < 0,0365$) (Gráfico 1). Isso deve ter ocorrido, pois o r-bST estimulou a lipólise e aumentou significativamente os teores de AGNEs (Gráfico 6), que por seu turno devem ter sido oxidados incrementando a chance de gerar corpos cetônicos no processo.

É importante frisar que embora em ambos os grupos os teores de BHB foram acima dos valores de referência e compatíveis com quadros de acetonemia, esse catabólito não interferiu no consumo de alimentos oferecidos.

Gráfico 1 – Concentrações médias de Betahidroxibutirato sanguíneo para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat P < 0,0365; tempo P < 0,0001; trat x tempo P > 0,2059)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

De acordo com Leng e Annison, (1964) que estudaram os efeitos *in vitro* e *in vivo* do metabolismo do D-BHB em diferentes tecidos ovinos, boa parte desses convertem D-BHB em acetil-CoA e CO₂. O acetil-CoA pode em condições normais combinar-se com o oxaloacetato e entrar no ciclo de Krebs, e em seguida na rota reversa da via glicolítica, gerando glicose-6-Fosfato (G-6-P) no fígado, e por consequência aumentando a glicemia (HERDT, 1988). Tal fato foi constatado no presente experimento, ou seja, a infusão de D-BHB gerou, em ambos os grupos aumento na glicemia. Porém, duas horas após o término da infusão, a glicemia foi superior no grupo r-bST (P < 0,01) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Concentrações médias de Glicose sanguínea para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P > 0,51$; tempo $P < 0,0111$; trat x tempo $P < 0,0009$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 3 – Coeficiente de correlação do BHB sanguíneo com a Glicose sanguínea para o grupo tratado com r-bST (n=9) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = -0,48$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Em condições normais, o tratamento com r-bST em ruminantes aumenta ligeiramente a glicemia, por meio do aumento de gliconeogênese e maior ação do glucagon, utilizando para tal diferentes rotas metabólicas e substratos (ETHERTON; BAUMAN, 1998). O presente resultado indica que o r-bST estimulou a transformação de BHB em glicose, visto que existiu um coeficiente de correlação negativo ($r = -0,48$; $P < 0,0001$) nesse tratamento (Gráfico 3), não ocorrendo o mesmo no animais controle

($r = -0,16$; $P > 0,25$). Tal resultado indica que o r-bST influenciou possivelmente na formação de Acetil-CoA, via transformação do BHB, que serviu de substrato para geração de glicose (LENG; ANNISON, 1964; HERDT, 1988). O presente resultado confirma o efeito constatado, que o r-bST aumenta a atividade da enzima acetilCo-A sintetase em vacas e cabras (BAUMAN; VERNON, 1993; ETHERTON; BAUMAN, 1998; BALDWIN; KNAPP, 1993). Além disso, o r-bST aumenta a atividade da enzima piruvato desidrogenase gerando a formação de piruvato e de oxaloacetato, a partir de aminoácidos e carboidratos (KNAPP, et al., 1992; MARZZOCO; TORRES, 2007). Essa ação bioquímica é fundamental no tratamento da cetose, pois o maior limitante para a geração de glicose via acetilCoA é a falta de oxaloacetato, o qual se combina com a AcetilCo-A formando citrato e entrando no ciclo de Krebs (1966). Porém, o possível aumento da síntese oxaloacetato, por intermédio do uso de r-bST, deve ter revertido essa carência de oxaloacetato e aumentado assim a transformação de BHB em glicose, melhorando o processo de gliconeogênese.

Estudo nacional recente, avaliou o uso de r-bST em ovelhas prenhes com condições corporais entre 2 e 3, submetidas à jejum por cinco dias no final de gestação, e identificou que nas fêmeas tratadas os teores de BHB foram inferiores ao grupo controle (PERAZZOLI et al., 2013). Embora os autores não discutam, o r-bST deve ter tido idêntico efeito, ao observado no presente trabalho, na melhora da metabolização do BHB, sugerindo que esse tratamento funcionaria tanto na toxemia da prenhez tipo I (subnutrição da gestante; condição corporal grau 2) como tipo II (supernutrição).

Gráfico 4 – Concentrações médias de Insulina sanguínea para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat P < 0,0001; tempo P < 0,0001; trat x tempo P < 0,0001)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

O tratamento com r-bST também aumentou de forma substantiva a secreção e os teores plasmáticos de insulina nos primeiros três dias após a aplicação ($P < 0,0001$), porém tal efeito foi inibido logo em seguida à infusão de BHB ($P < 0,0001$), sumindo tal influência após a 2ª hora do término de injeção. Semelhante resultado foi obtido por Takehiro, et al. (2005) em ratos infundidos com BHB. Esses autores constataram que temporariamente altos teores de BHB afetaram diretamente a produção de insulina, nas ilhotas de Langerhans, devido a um bloqueio no oferecimento de NADHP para a síntese deste hormônio.

Ovelhas com Toxemia da Prenhez, geralmente apresentam hipoglicemia associada à elevada concentração de corpos cetônicos na corrente sanguínea (ROOK, 2002). O útero grávidico, comumente albergando múltiplos fetos, provoca considerável demanda por energia o que consequentemente gera uma falha no oferecimento de glicose. Era de se supor que o significativo aumento de insulina no presente estudo, pudesse promover uma hipoglicemia nos animais tratados com r-bST, em relação ao grupo controle. Porém, esse efeito não foi constatado, provavelmente porque o hormônio de crescimento exógeno promove também liberação de glucagon, o qual é um reconhecido agente gliconeogênico (ETHERTON; BAUMAN, 1998).

Os protocolos de tratamento de um ruminante com cetose preconizam o uso de glicose ou substâncias que gerem gliconeogênese ou que estimulem a formação deste

açúcar (RADOSTITS et al., 2007). Os altos teores de insulina plasmáticos associados às elevadas taxas glicêmicas, promovidas pelo r-bST, sugerem que a taxa de passagem de glicose sanguínea às células é relevante, sem promover queda nos teores de glicose neste fluido. Assim duas hipóteses acerca deste fato, poderiam ser levantadas: a de que a gliconeogênese fosse contínua, por efeito do glucagon, ou a possibilidade da glicose ser pouco transferida às células devido à maior resistência insulínica. Para avaliar essa última hipótese foi conduzido um teste de resistência insulínica nos ovinos, segundo preconizações técnicas de Balogh et al. (2008), levando-se em consideração além dos teores de glicose, AGNEs, insulina e as concentrações de BHB.

Gráfico 5 – Valores estimados da sensibilidade dos tecidos à insulina por meio do teste RQUICKI_{BHB} (Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index_{BHB}), segundo Balough et al. (2008). (trat P < 0,001)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Como era de se esperar, o r-bST provocou diminuição na sensibilidade dos tecidos à insulina (Gráfico 5), em outras palavras, aumento da resistência insulínica. Tal fato ocorreu, pois ao mesmo tempo o r-bST promove aumento concomitante dos teores sanguíneos de insulina, glicose e AGNEs, os quais em conjunto com o BHB injetado representam o denominador da fórmula proposta por Balogh et al. (2008).

Tal resultado deve ser analisado com cuidado, pois Bines; Hart (1981) e Bauman (1999) constataram em vacas em lactação que o tratamento com r-bST aumenta a resistência insulínica nos tecidos periféricos como a musculatura, mas incrementa a captação de glicose pelo órgão-alvo: a glândula mamária. Estudos com ovelhas

indicaram que o tratamento prolongado com r-bST, durante a gestação, pode aumentar a capacidade de transporte placentária de nutrientes, indicando que a placenta na ovelha gestante seria órgão-alvo, semelhante à glândula mamária na vaca (HARDING et al., 1997). Estudos com ovelhas no terço final de gestação indicaram que cerca de 40% da glicose sanguínea é transportado para a unidade placentário-fetal, independente da ação insulínica, visto que no útero gravídico os receptores para glicose são insulino-independentes (PRIOR; CHRISTINSON, 1978; DUELHLMEIER et al., 2013). Assim, espera-se que a parte da glicose gerada de forma exuberante após a infusão de BHB, por meio da modulação de r-bST, seja direcionada ao útero, aliviando o quadro de TP. Outro fato da doença que fortalece essa hipótese é que embora na TP ocorra frequentemente o estado de hipoglicemia, o quadro reverso, ou seja, hiperglicemia só passa a acontecer após a morte dos fetos pela doença.

Gráfico 6 – Concentrações médias de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) sanguíneo para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P < 0,0047$; tempo $P < 0,0001$; trat x tempo $P > 0,3465$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 7 – Coeficiente de correlação do AGNEs sanguíneo com o BHB sanguíneo para o grupo tratado controle (n=9) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = -0,36$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 8 – Coeficiente de correlação do AGNEs sanguíneo com o BHB sanguíneo para o grupo tratado com r-bST (n=9) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = -0,48$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

No gráfico 6 fica evidente que o tratamento com r-bST provocou, no decorrer do experimento ($P < 0,005$) um estímulo na lipólise e consequente aumento nos teores de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) no sangue, em relação ao grupo controle. O r-bST é um reconhecido hormônio lipolítico, que atua independente da alta concentração de insulina, que normalmente é lipogênico. É digno de nota que também o grupo controle no momento T0 também apresentava teores altos de AGNEs, porém inferior ao

grupo r-bST, devido ao jejum de 18 horas e provavelmente pelo estresse dessa condição visto que ambas condições estimulam a lipólise (HERDT, 1988). Porém, quando da infusão de BHB os AGNEs diminuíram temporariamente nos dois tratamentos ($P < 0,0001$), tendo um comportamento quadrático. Assim como, quanto maiores os teores de BHB menores os de AGNE ($P < 0,0001$) (Gráficos 7 e 8). Especula-se que a lipólise tenha diminuído durante a infusão de BHB, pois o organismo reconheceu a presença de uma fonte de extra de energia, o BHB, diminuindo de alguma forma a atividade das lipases. Tal fato foi devidamente relatado por Herdt (1988) numa revisão sobre metabolismo energético em ruminantes, em que relata a diminuição da atividade das lipases em balanço energético positivo.

Gráfico 9 – Concentrações médias de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) sanguíneo para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P > 0,841$; tempo $P < 0,0015$; trat x tempo $P < 0,3810$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 10 – Coeficiente de correlação do AGNEs sanguíneo com o Triacilgliceróis sanguíneo para o grupo tratado com r-bST (n=9) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = 0,45$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

O r-bST não interferiu nos teores de triacilglicerol (TAG) sanguíneo em relação ao grupo controle ($P < 0,84$), porém em ambos os grupos esses valores diminuíram em relação ao decorrer do experimento ($P < 0,015$) (Gráfico 9). Estudando-se relação entre os ácidos graxos não esterificados e as concentrações de triacilglicerol sanguíneas encontrou-se uma correlação positiva ($r = 0,454$; $P < 0,001$; Gráfico 10) apenas no grupo tratado com r-bST, não existindo significância no grupo controle ($r = -0,019$; $P > 0,84$).

A geração do TAG está ligada a entrada de AGNEs no fígado, que por sua vez se relaciona com o grau de lipólise (NELSON; COX, 2002). No grupo r-bST inicialmente a lipólise se apresentava provavelmente alta por ação deste hormônio, Herdt, (1988), porém com a infusão de BHB ocorreu uma aparente diminuição no processo, devido a entrada de fonte energética extra, sendo mais intenso nos animais tratados com hormônio do crescimento.

Gráfico 11 – Concentrações médias de colesterol total sanguíneo para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P > 0,209$; tempo $P < 0,025$; trat x tempo $P < 0,015$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

No gráfico 11 estão expostos os resultados de colesterol total no sangue. Não existiu diferença entre os tratamentos ($P > 0,21$), porém ocorreu diminuição significativa nos valores no decorrer do experimento em ambos os grupos ($P < 0,025$).

O hormônio de crescimento (GH) tem um papel inibidor nos teores séricos de colesterol (OSCARSSON et al., 1996; RUDLING et al., 1992). Acredita-se que o r-bST exerça efeito sobre a HMG-CoA redutase que atua na produção de colesterol, inibindo essa enzima (OSCARSSON et al., 1996; RUDLING et al., 1992). Na oxidação mitocondrial dos AGNEs é formado acetilCoA, e na condensação de três moléculas dessa substância forma-se o composto denominado 3 Hidroxi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) (MARZZOCO; TORRES 2007). Esse composto pode formar corpos cetônicos ou colesterol. Dessa forma, tudo indica que no grupo r-bST ocorra menor formação de colesterol favorecendo assim a via produtora de corpos cetônicos.

Gráfico 12 – Concentrações médias de IGF-1 sanguíneo para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P < 0,007$; tempo $P > 0,1593$; trat x tempo $P < 0,026$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

O presente trabalho confirmou os dados clássicos que o r-bST aumenta de forma significativa os teores de IGF-1 ($P < 0,007$), em relação ao grupo controle. O IGF-1 reconhecidamente modula o metabolismo proteico no organismo com efeitos anabólicos favorecendo a retenção de nitrogênio, aumentando a captação de aminoácidos e a síntese proteica, cujos produtos finais são transferidos principalmente para a musculatura e o fígado, diminuindo assim a produção de uréia no grupo r-bST (Gráfico 13; $P < 0,003$) (BAUMAN, 1999). De fato, quando se avaliou a relação entre as concentrações de IGF-1 e ureia sanguínea constatou-se que ocorreu uma alta correlação negativa entre as variáveis ($r = -0,64$; $P < 0,001$) das fêmeas tratadas com r-bST e no grupo controle ($r = -0,37$; $P < 0,001$). O uso de r-bST provoca em ovinos queda nos teores de ureia sanguínea (MIN et al., 1997). Baixos teores de ureia sanguínea podem ser indicativas de menor proteólise, pois o catabólito resultante da degradação de proteínas é a amônia, a qual é convertida no fígado à ureia. Por outro lado, no processo anabólico as diversas fontes de nitrogênio são utilizadas para a síntese de proteína, diminuindo a produção de ureia (PAYNE; PAYNE, 1987).

Gráfico 13 – Concentrações médias de ureia sanguínea para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P < 0,003$; tempo $P < 0,014$; trat x tempo $P < 0,017$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 14 – Coeficiente de correlação entre ureia sanguínea e IGF-1 sanguíneo para o grupo tratado com r-bST (n=9) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = -0,644$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

O tratamento de r-bST em ovelhas prenhes pode aumentar a transferência de aminoácidos da mãe para o feto estimulando que boa parte destes seja oxidado para produção de energia neste último (HARDING et al., 1997). Parte dessa energia poderia ser utilizada para promover ganho de peso do feto, porém resultados controversos em

relação a essa variável são descritos em várias espécies tratadas com r-bST durante a gestação (HARDING et al., 1997).

Gráfico 15 – Concentrações médias de albumina sanguínea para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P > 0,211$; tempo $P < 0,0001$; trat x tempo $P < 0,030$)

Fonte: (ARAÚJO, 2014).

Menores teores de albumina foram constatados no decorrer da infusão de BHB ($P < 0,0001$) nos dois tratamentos, assim como ocorreu uma diminuição das concentrações no grupo r-bST, em relação ao controle, quando se considerou a interação tempo X tratamento ($P < 0,03$) (Gráfico 15). Sabe-se que altos teores sanguíneos de BHB favorecem a síntese de proteína muscular, a qual é incrementada quando do uso do hormônio de crescimento (MÖLLER et al., 2007). Possivelmente, pequena parte da concentração de albumina sanguínea poderia ser utilizada para síntese de proteína muscular, frente a um estímulo do BHB. Porém, o metabolismo da albumina, tanto na sua síntese como na sua degradação, é bastante lento, visto que a sua taxa de reposição varia de 7 a 28 dias (PAYNE; PAYNE, 1987; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997).

Gráfico 16 – Concentrações médias de proteína total sanguínea para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P > 0,32$; tempo $P < 0,0001$; trat x tempo $P > 0,964$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

A avaliação dos dados obtidos dos valores de proteína total sanguínea (Gráfico 16) identificou que o tempo promoveu uma diminuição nos teores deste metabólito ($P < 0,0001$), porém não existiu diferença entre os tratamentos ($P > 0,32$).

Gráfico 17 – Concentrações médias de globulina sanguínea para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P < 0,0001$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Os teores de globulina foram maiores no grupo r-bST que no controle ($P < 0,0001$) (Gráfico 17).

A relação albumina/globulina foi maior no grupo controle que no tratado com r-bST ($P < 0,009$) (Gráfico 18)

Existiu altíssimo coeficiente de correlação positivo ($r = 0,963$; $P < 0,001$) entre os teores de albumina e globulina séricas no grupo r-bST (Gráfico 19).

Gráfico 18 – Valores médios da relação albumina-globulina sanguíneos para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P < 0,0001$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 19 – Coeficiente de correlação entre albumina sanguínea e globulina sanguínea para o grupo tratado com r-bST (n=9) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = 0,963$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

O uso de hormônio de crescimento tende a diminuir os teores de albumina, acompanhado de um aumento nas concentrações de globulina e de proteína total séricas (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997), fatos verificados no presente experimento, com exceção da proteína sérica.

Gráfico 20 – Atividade da enzima aspartato amino transferase (AST) para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P > 0,878$; tempo $P > 0,091$; trat x tempo $P > 0,721$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 21 – Atividade da enzima gama glutamil transferase (GGT) para os grupos Controle (n=9) e r-bST (n=9) ao longo do experimento (trat $P < 0,008$; tempo $P > 0,347$; trat x tempo $P > 0,111$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

A infusão com BHB não provocou grandes alterações nas atividades das enzimas hepáticas, visto que não existiu diferença entre tempos na AST ($P > 0,10$); (Gráfico 20) e na GGT ($P > 0,35$) (Gráfico 21). O tratamento com r-bST não interferiu na atividade de AST ($P > 0,87$), porém aumentou a da enzima GGT ($P < 0,008$) em relação ao grupo controle. Trabalho nacional analisando o tratamento de r-bST em bovinos machos sadios identificou que a atividade sérica da GGT aumentou por influencia do medicamento, porém sem atingir valores anormais e sem uma explicação plausível do fenômeno (VIEIRA et al., 2010).

O trabalho em questão esclareceu alguns pontos obscuros dos mecanismos de ação efetiva do r-bST no tratamento de ovelhas com TP, não devidamente compreendidos por vários autores que o testaram (ANDREWS; HOLLAND-HOWES; WILKINSON, 1996; SCOTT et al., 1998; PEZZAROLI et al., 2013). Assim, o conjunto dos resultados permite recomendar que a medicação com r-bST em ovelhas gordas com hiperacetonemia seja empreendida principalmente, pois possibilita que a partir do excesso de corpos cetônicos, aparentemente danosos, ocorra um aumento de gliconeogênese, diminuindo o déficit de glicose para ovelhas com TP e seus fetos, sem gerar aparentes efeitos colaterais.

3.4 CONCLUSÕES

O presente experimento permitiu concluir os seguintes fatos:

- A infusão de 250 mmol de D-BHB provocou hipercetonemia em ambos os grupos, no decorrer de duas horas.
- O excesso de D-BHB infundido gerou, em ambos os grupos, temporariamente uma diminuição nos teores de AGNEs, indicando uma menor lipólise.
- O uso de r-bST causou as seguintes alterações bioquímicas e hormonais que a diferenciaram do grupo controle: aumento nos teores séricos de BHB, de insulina, de AGNEs, de IGF 1, de proteína total e globulina, de atividade de GGT e do percentual de resistência insulínica; assim como menores concentrações de colesterol, ureia e valores de relação albumina/globulina.
- O r-bST aumentou a transformação de BHB em glicose e a mobilização de nitrogênio ureico para os depósitos do organismo, por ação do IGF1.

- o trabalho identificou que o r-bST provocou uma destacada gliconeogênese esclarecendo um dos mecanismos de ação do tratamento com este hormônio na TP.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, A. H.; HOLLAND-HOWES, V. E.; WILKINSON, J. I. D. Naturally occurring pregnancy toxemia in the ewe and treatment with recombinant bovine somatotropin. **Small Ruminant Research**, v. 23, p. 191-197, 1996.
- BALDWIN, R.L.; KNAPP, J.R. Recombinant bovine somatotropins effects on patterns of nutrient utilization in lactating dairy cows. **American Journal of Clinics and Nutrition**. v. 58, p. 282-286, 1993. Suppl. 1.
- BALIKCI, E.; YILDIZ, A.; GURDOGAN, F. Investigation on some biochemical and clinical parameters for pregnancy toxemia in akkaraman ewes. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n. 7, p. 1268-1273, 2009.
- BALOGH, O.; SZEPES, O.; KOVACS, K.; KLUCSAR, M.; REICZIEGEL, J.; ALCAZAR, J.A.; KERESZTES, M.; FEBEL, H.; BARTYIK, M.; FEKETE, S.G.; FESUS, L.; HUSZENICZA, G. Interrelationship of growth hormone alil polymorphysm, insulin resistance, Milk production and reproductive performance in Holstein Friesian cows. **Veterinarni Medicin**, v. 53, p. 604-616, 2008.
- BAUMAN, D. E.; VERNON, R. G. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. **Annals Reviews of Nutrition**, v. 13, p. 437-461, 1993.
- BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to commercial application. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, n. 2-3, p. 101-116, 1999.
- BINES, J. A.; HART, J. C. Metabolic limits to milk production, especially roles of growth hormone and insulin. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 1375-1389, 1982.
- ETHERTON, T. D.; BAUMAN, D. E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 745-761, 1998.
- GERLOFF, B. J.; HERDT, T. H.; EMERY, R. S. Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 8, p. 845-850, 1986.
- HARDING, J. E.; EVANS, P. C.; GLUCKMAN, P. D. Maternal growth hormone treatment increases placental diffusion capacity but not fetal or placental growth in sheep. **Endocrinology**, v. 138, n. 12, p. 5352-5358, 1997.
- HARMEYER, J.; SCHLUMBOHM, C. Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1953-1962, 2003.
- HAYIRLI, A. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in post partum dairy cattle. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 749-774, 2006.

- HERDT, T.H. Fuel homeostasis in the ruminant. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal and Practice**, v. 4, n. 2, p. 213-232, 1988.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- KNAPP, J. R.; FREETLY, H. C.; REIS, B. L.; CALVERT, C. C.; BALDWIN, R. L. Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 4, p. 1025-1035, 1992.
- KREBS, H. A. Bovine ketosis. **Veterinary Record**, v. 78, p. 187, 1966.
- LACETERA, N; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; NORDONE, A. Effects of subclinical pregnancy toxemia response in sheep. **Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1020-1024, 2001.
- LENG, R. A.; ANNISON, E. F. The metabolism of D(-)- β -Hydroxybutyrate in Sheep. **Biochemistry Journal**, v. 90, p. 494-469, 1964.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386p.
- MIN, S. H.; MACKENZIE, D. D.; MCCUTCHEON, S. N.; BREIER, B. H.; GLUCKMAN, P. D. Comparative effects of recombinant ovine placental lactogen and bovine growth hormone on galactopoiesis in ewes **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 4, p. 640-645, 1997.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidation of Fatty acids. In: NELSON, D. L.; COX, M. M (Ed). **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. New York: Freeman, 2005. p. 600-622.
- ORTOLANI, E. L. Doenças carenciais e metabólicas em caprinos: urolitíase e toxemia da prenhez. In: ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA, 3.; 1994, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 1994, 197 p.
- PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The metabolic profile**. Oxford: Oxford University Press, 1987. 179 p.
- PEZZAROLI, D.; FEIJÓ, J. O.; FERREIRA, M. B.; DEL PINO, F. A. B.; CORREA, M. N.; RABASSA, V. R. Efeito da administração de somatotrofina Bovina (Boostin) sobre o nível plasmático de betahidroxibutirato no periparto em ovelhas submetidas a indução de cetose subclínica. **A Hora Veterinária**, v. 33, n. 195, p. 9-11, 2013.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; CONSTABLE, J. H. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pig and horses**. 10. ed. Edinburgh: Elsevier, 2007. 1877 p.
- REID, R. L. The physiopathology of undernourishment in pregnant ewe, with reference to pregnancy toxemia. **Advances Veterinary Science**, v. 12, p. 163-238, 1968.

ROOK, J. S. Pregnancy toxemia of ewes, does and beef cows. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal And Practice**, v. 16, n. 2, p. 203-317, 2000.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada a experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221 p.

SCOTT, P. R.; SARGINSON, D.; PENNY, C. D. Evaluation of recombinant bovine somatotropin in the treatment of ovine pregnancy toxemia. **The Veterinary Journal**, v. 155, p. 197-199, 1998.

TAKEHIRO, M.; FUJIMOTO, S.; SHIMODAHIRA, M.; SHIMONO, D.; MUKAI, E.; NABE, K.; RADU, R.G.; KOMINATO, R.; ARAMAKI, Y.; SEINO, Y.; YAMADA, Y. [Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate inhibits glucose-induced insulin release from pancreatic islets by decreasing NADH contents](#). **American Journal of Physiology, Endocrinology And Metabology**, v. 288, p. 372-380, 2005.

4 ARTIGO 2 PERFIL METABÓLICO E HORMONAL DE OVELHAS SUPERALIMENTADAS SUBMETIDAS À HIPERLIPIDEMIA E TRATADAS COM SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (r-bST). *Metabolic and hormonal profile of overnourished sheep submitted to hyperlipidemia and treated with recombinant bovine somatotropin (r-bST).*

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo esclarecer os mecanismos bioquímicos e hormonais da ação da somatotropina recombinante bovina (r-bST), recomendada no tratamento de Toxemia da Prenhez (TP), por meio de indução experimental de quadro de hiperlipidemia em ovelhas com elevada condição corporal. Vinte e uma ovelhas foram divididas em 2 grupos, sendo o primeiro constituído por 11 ovelhas que foram submetidas a aplicação de solução salina isotônica por via subcutânea perfazendo grupo Controle, e o segundo, constituído por 10 fêmeas tratadas de forma similar, com injeção de 160 mg de somatotropina recombinante bovina (r-bST). Três dias depois das injeções, todas as fêmeas foram submetidas a infusão endovenosa de óleo de peixe a 20% correspondendo a 0,54g triglicérides/Kg PV no decorrer de quatro dias a cada 4 horas. Coletas de sangue foram obtidas, trinta dias (D-30) e três dias (D-3) antes do início do estudo e da aplicação do produto, imediatamente antes da infusão (T0), a cada 8 horas, totalizando 12 coletas durante o período de infusão e três coletas posteriores ao término da infusão, às 12 horas (T13), 24 horas (T14) e sete dias (D7) após. A infusão de grande quantidade de solução de óleo de peixe, provocou hiperlipidemia em ambos os grupos, no decorrer do experimento. O r-bST causou aumento nos teores de AGNEs, de BHB, de glicose, de insulina, de triacilglicerol, de IGF-1, de Bilirrubina Direta e Bilirrubina Total, do percentual de resistência insulínica, e das atividades de AST e GGT; assim como menores concentrações de colesterol, ureia e proteína total. O tratamento com r-bST aumentou a transformação dos AGNEs em BHB, e do BHB em glicose, a qual também foi incrementada pela metabolização dos AGNEs. Este estudo identificou que o r-bST provocou destacada gliconeogênese, além da redução das concentrações de AGNEs e de corpos cetônicos, esclarecendo assim os mecanismos de ação do tratamento com este hormônio na TP.

Palavras-chave: Ácidos graxos não esterificados (AGNEs). Beta Hidroxibutirato (BHB). Glicose. Metabolização. Tratamento.

4.1 INTRODUÇÃO

O final da gestação em ovelhas é um período crítico já que cerca de 80% do desenvolvimento fetal ocorre durante este período (ROOK, 2000). A demanda por energia por parte dos fetos torna-se exacerbada e em certas ocasiões, excede a capacidade de suprimento energético por parte da mãe. Quando isso ocorre, o tecido adiposo passa a ser recrutado para contribuir com a requisição energética e assim, ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e corpos cetônicos são gerados para atender essa demanda (VAN SAUN, 2000).

Inicialmente, este mecanismo regulatório torna-se bastante favorável para os tecidos materno e fetais, entretanto o excesso de AGNEs pode exercer efeito deletério ao organismo (VERNON, 2005). O fígado do ruminante remove AGNEs da circulação sanguínea, na proporção em que eles vão sendo produzidos (EMERY et al., 1992). Em períodos de grande mobilização de gordura corporal e subsequente captação hepática dos AGNEs, o fígado secreta o excesso destes compostos sob forma de triacilgliceróis (TAG). Contudo, devida a intensidade do processo, os hepatócitos tornam-se ineficientes em exportar ácidos graxos como constituintes de lipoproteínas de baixa densidade (KLEPPE et al., 1988), e parecem incapazes de aumentar a oxidação dos ácidos graxos e diminuir as taxas de esterificação (LOMAX et al., 1983), concorrendo ao quadro de lipidose hepática, assim como uma marcante oxidação dos AGNEs poderá levar a destacada geração de corpos cetônicos. A lipidose interfere drasticamente com a capacidade dos hepatócitos de gerar glicose, pelo processo de gliconeogênese, desencadeando num quadro fatal de hipoglicemia (BRICKNER et al., 2009).

A TP tipo II é doença metabólico nutricional que afeta fêmeas tanto da espécie ovina quanto da espécie caprina, durante os dois últimos meses de gestação, mais comumente em animais que alberguem dois ou mais fetos, caracterizada pela hipoglicemia, aumento destacado de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no sangue, intensa formação de corpos cetônicos e lipidose hepática, que leva frequentemente tanto a morte da fêmea como dos fetos (ROOK, 2000).

Na década de 90, pesquisadores britânicos constataram que ovelhas com TP tratadas com somatotropina recombinante bovina (r-bST) apresentavam melhora clínica destacada e maior chance de sobrevivência aos efeitos da TP (ANDREWS et al., 1996; SCOTT et al., 1998). O r-bST possui efeito na partição de nutrientes entre tecido

muscular e adiposo que conduz à diferenciação ou alteração no crescimento destes tecidos (ETHERTON; BAUMAN, 1998). A somatotropina é capaz de direcionar os nutrientes para determinado tecido de acordo com a necessidade (BAUMAN, 1992).

Embora os resultados iniciais fossem promissores, os pesquisadores que trabalharam com o efeito do r-bST em fêmeas toxêmicas, citados anteriormente, não puderam entender ao certo, os mecanismos de atuação do r-bST e tampouco puderam continuar as pesquisas com esse hormônio, visto que a Comunidade Européia proibiu determinantemente o uso desse medicamento para uso terapêutico (ORTOLANI, 2014)³.

Este estudo teve como objetivo esclarecer os mecanismos bioquímicos e hormonais da ação da somatotropina recombinante bovina (r-bST), recomendada no tratamento de TP, por meio de indução experimental de quadro de hiperlipidemia em ovelhas com elevada condição corporal.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Animais, instalações e alimentação

Foram utilizadas 21 ovelhas adultas, não-prenhes e não lactentes, da raça Santa Inês, com média de 54,0 Kg de peso corporal, alimentadas a fim de que mantivessem condição corporal superior a 3,5, com média de escore de 4. Estes animais foram alocados em baias coletivas nas dependências do Centro de Pesquisa de Doenças Nutricionais e Metabólicas de Ruminantes da FMVZ – USP.

Os animais receberam, por 90 dias, dieta composta por 40 % da matéria seca de feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylum*) e 60 % de ração comercial concentrada contendo 20% de proteína bruta e 75% de NDT. Tal alimentação foi favorável que os animais mantivesse um alto escore de condição corporal (ECC) superior a 3,5, com média 4, numa escala de 0 a 5, proposta por Russel, (1984). Os animais receberam água *ad libitum* e sal mineralizado próprio para ovinos.

³ ENRICO LIPPI ORTOLANI: comunicação pessoal

4.2.2 Delineamento experimental

Do total de 21 ovelhas, 11 foram separadas aleatoriamente para comporem o primeiro grupo (controle) e as outras 10 ovelhas, utilizadas para comporem o segundo grupo (tratado com r-bST).

Todos os animais foram submetidos à adaptação prévia de 60 dias nas dependências da FMVZ-USP, pesados, vermifugados e devidamente identificados antes do período experimental.

Três dias antes do início da indução experimental os animais do grupo tratado foram medicados com dose única de 160 mg de r-bST comercial (Boostin[®] - MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil), aplicada por via subcutânea, perfazendo um volume de 0,65 mL do produto comercial. A aplicação de r-bST ocorreu antes da alimentação matinal, à esquerda da fossa isquiorretal. Os ovinos pertencentes ao grupo controle receberam idêntico volume de solução salina aplicada pela mesma via, no mesmo momento.

4.2.3 Indução de hiperlipidemia

Todos os 20 animais foram submetidos à indução de hiperlipidemia de acordo com metodologia proposta por Mashek et al. (2005). Para tal, foi realizada infusão intravenosa de solução lipídica (óleo de peixe) contendo altos teores de ácidos graxos de cadeia longa (MASHEK et al., 2005).

A solução foi infundida por 240 minutos ao dia, perfazendo total de quatro dias de infusão lipídica. Foi administrado um total de 0,54 g de triacilglicerol (TAG) por kg de peso vivo (PV) por dia. Tal fluxo foi medido por bomba de controle de fluxo (Digibomb[®]). Como exemplo, uma ovelha de 60 kg recebeu 32,3 g de TAG ao dia que equivale a 2% de seu peso vivo de uma dieta contendo 2,7% de TAG na matéria seca (NRC, 2001). 32,3 g de TAG corresponderiam a 162 mL da solução lipídica administrada ao dia. Ao término do tratamento obteve-se solução com 20% de TAG.

Momentos antes da indução experimental proposta, foram implantados nos animais um cateter plástico (Intracat™, BD) na veia jugular esquerda, a fim de permitir a infusão do composto.

Dezoito horas antes da indução lipídica foi estabelecido jejum alimentar, sem restrição ao oferecimento de água. A partir do momento que se iniciou a indução lipídica, foi restabelecida a dieta.

4.2.4 Momento de avaliação dos animais

Para avaliação dos animais e determinação do perfil metabólico, foram realizados exames clínicos e coleta de sangue.

A coleta de sangue foi conduzida nos seguintes momentos: Momento basal [M-30] – 30 dias anteriores ao período do estudo experimental. Momento [M-3] imediatamente antes da aplicação de r-bST ou solução fisiológica, de acordo com o grupo experimental.

Momento [M0] – Imediatamente antes do início da indução experimental.

Momentos durante a indução: M1; M2; M3; M4; M5; M6; M7; M8; M9; M10; M11; M12 a cada 8 horas até completar os quatro dias de indução, ou seja, após 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88 e 96 horas de M0 perfazendo, portanto os quatro dias de período indutivo.

Momentos após o término da indução: M13 – 12 horas após o término da indução; M14 – 24 horas após o término da indução e MD7 - 7 dias após o término das induções.

No momento experimental [M0], os animais foram pesados para determinar a dosagem da substância lipídica a ser administrada a cada animal.

4.2.5 Coleta e processamento das amostras de Sangue

Amostras de sangue foram coletadas por venipunctura de jugular externa em tubos de coleta à vácuo sem anticoagulante para a obtenção de soro, e em tubos com anticoagulante contendo fluoreto de sódio para a obtenção de plasma.

As amostras de sangue total nos tubos sem anticoagulante foram mantidas à temperatura ambiente e centrifugadas a 697g por 15 minutos, para obtenção do soro, que foi aliquoteado em tubos eppendorfs® e congelados a menos 20 °C. As amostras de soro foram descongeladas em temperatura ambiente uma única vez e utilizadas para determinação das concentrações das seguintes variáveis bioquímicas e hormonais: ácidos graxos não esterificados (AGNEs), β -hidroxibutirato (BHB), proteína total, uréia, triacilglicerol (TAG), colesterol total, insulina, IGF-1 e atividades das enzimas AST, GGT.

As amostras coletadas com anticoagulante fluoreto de sódio foram prontamente resfriadas a 4 °C e posteriormente centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos para obtenção de plasma. Estas amostras foram congeladas a menos 20 °C para posterior determinação de glicose.

As análises bioquímicas foram realizadas em analisador bioquímico automático marca RANDOX® com kits específicos para cada variável.

As determinações hormonais de insulina e IGF-1 foram realizadas por eletroquimioluminescência em equipamento Immulite 1 (Siemens, modelo 1000, São Paulo, SP, Brasil).

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP.

4.2.6 Análise estatística

A estatística descritiva dos dados, representada pelas médias aritméticas e os coeficientes de variação (CV) de cada tratamento, foi obtida pelo programa SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). Os testes de normalidade dos resíduos e

homogeneidade das variâncias de cada tempo foram realizados utilizando o *Guide Data Analise*.

As variáveis bioquímicas foram analisadas como medidas repetidas no tempo, referentes aos momentos de coleta dos dados (tempo) de acordo com cada tratamento. Quando a premissa de esfericidade não foi respeitada ($P < 0,05$), as probabilidades de tempo (P_{tempo}) e das interações dos tratamentos com o tempo ($P_{\text{trat*tempo}}$) foram corrigidas pelo teste de Greenhouse-Geisser Epsilon, utilizando-se o comando *Repeated* gerado pelo procedimento *GLM*. A comparação entre as médias dos grupos dentro de cada tempo (P) foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means* (LSMeans).

Foram estimadas as correlações de Pearson onde foram considerados intervalos de 0 a 0,30 como correlação de baixa intensidade; de 0,31 a 0,60 de média intensidade e 0,61 a 1,00 de alta intensidade (SAMPAIO, 1998). Foi utilizado o nível de significância de 5% para todos os testes realizados. Para a tabulação dos dados e confecção dos gráficos foi utilizado o programa Microsoft Windows Excel, versão 2007.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações sanguíneas de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e de Beta Hidroxibutirato (BHB) estão ilustradas nos Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 - Concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe (trat < 0,0001; tempo P < 0,0001; trat x tempo P < 0,0001)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 2 - Concentrações séricas de Beta hidroxibutirato de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat P < 0,0001; tempo P < 0,0001; trat x tempo P < 0,011)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Os teores globais de AGNEs foram maiores no grupo r-bST que no controle (P < 0,0001). Com o decorrer da infusão de óleo de peixe ocorreu um aumento nos teores de AGNEs no grupo controle e uma concomitante diminuição no grupo r-bST (P < 0,0001). O maior aumento de AGNEs no grupo r-bST era esperado visto que esse

hormônio provoca destacado aumento da atividade das lipases, em especial da lipase hormônio sensível (LHS) (BAUMAN; VERNON, 1993), acrescendo dessa forma, ácidos graxos na corrente, os quais foram intencionalmente incrementados no experimento com infusão de óleo de peixe.

É importante frisar que a infusão de óleo de peixe determinou em ambos os grupos que os teores de AGNEs fossem superiores aos valores de referência (0,01 a 0,35 mM), a partir do tempo 0 no grupo r-bST, atingindo valores médios seis vezes superiores ao teor máximo de referência, e no dia 7 no controle, ligeiramente superior ao teor máximo de referência (KANEKO et al., 1997).

O excesso de AGNEs constitui substrato para cetogênese (MASHEK et al., 2005). Assim, o tratamento com r-bST provocou o aumento dos teores de BHB sanguíneo tornando esta variável maior neste grupo que no controle ($P < 0,0001$). No decorrer do experimento as concentrações de BHB tiveram um comportamento quadrático no grupo r-bST ($P < 0,0001$; Gráfico2). Esse resultado indica a evidente cetogênese inicial e temporária provocada pelo r-bST, com clara diminuição deste processo antes mesmo do término da infusão de óleo de peixe. Os ácidos presentes no óleo de peixe (eicosapentanóico-EPA e o docosahexa enóico-DHA) são geralmente oxidados pelos hepatócitos e o r-bST aumenta significativamente o grau de oxidação de AGNEs, incrementando a chance de gerar corpos cetônicos em casos extremos de hiperlipidemia, como ocorrido no presente desafio (KNAPP et al., 1992; PIRES; GRUMER, 2007).

O r-bST pode em determinadas situações aumentar a cetogênese (MÖLLER; JÖRGENSEN, 2009). Contudo, num resultado, surpreendente, o r-bST também atuou na transformação do BHB provavelmente em acetoacetato e Acetil CoA que terminaram por aumentar a produção de glicose. Em trabalho anterior, foi verificado que a transformação hepática de acetato em glicose fica aumentada mais de duas vezes em ruminantes tratados com r-bST, por meio da maior atividade das enzimas piruvato desidrogenase e piruvato carboxilase (KNAPP et al., 1992). A enzima carboxilase também aumenta a geração de oxaloacetato, proveniente do metabolismo do propionato, rota esta também estimulada pelo tratamento do r-bST (KNAPP et al., 1992). Segundo Krebs (1966), na cetose ocorre uma formação exagerada de corpos cetônicos, pois o AcetilCoA extra gerado durante a oxidação dos AGNEs não encontra quantidade suficiente de oxaloacetato para entrar no ciclo de Krebs, se transformando assim em acetoacetato e em outros corpos cetônicos. Em outras palavras, o r-bST favorece o

tratamento da cetose, pois mesmo após um aumento temporário da quantidade de BHB, gera no processo provavelmente mais oxaloacetato que diminui em seguida o BHB, sendo este transformado em glicose (Gráfico 6; $P < 0,001$).

Duehlmeier et al. (2013) relataram que a ação da enzima Succinil CoA 3 cetoacetico CoA transferase, que atua no mecanismo cetolítico e transforma corpos cetonicos em energia, fica prejudicada em ovelhas toxêmicas ou com alto risco de desenvolver TP. Como no presente trabalho, comprovou-se a transformação em BHB em glicose sugere-se que o r-bST atue também favoravelmente na atividade da enzima Succinil CoA 3 cetoacetico CoA transferase.

Gráfico 3 - Concentrações plasmáticas de Glicose de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat $P < 0,0001$; tempo $P < 0,0001$; trat x tempo $P < 0,011$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Os teores de glicose foram bem superiores no grupo r-bST que no controle ($P < 0,0001$), existindo variação em ambos os grupos no decorrer do experimento ($P < 0,011$) (Gráfico 3).

Ocorreram altas correlações entre as seguintes variáveis no grupo r-bST: AGNEs X BHB ($r = 0,61$; Gráfico 4); AGNEs X GLICOSE ($r = 0,70$; Gráfico 5) e BHB X GLICOSE ($r = 0,60$; Gráfico 6). Os presentes resultados são representativos da grande influencia do r-bST na mobilização de AGNEs que adentram o hepatócito para entrarem no metabolismo energético oxidativo mitocondrial, no fígado. Esse processo de transferência é controlado pela enzima Carnitina palmitoil transferase I (CPT I). De

acordo com a literatura clássica o r-bST diminui a ação da CPT I, principalmente quando há quantidade expressiva de propionato, proveniente do rúmen (KNAPP et al., 1992; DRAKLEY et al., 2001). Por outro lado, a CPT I se torna mais ativa caso exista um excesso de suprimento de AGNEs no fígado ou quando os teores de propionato estão diminuídos (DRAKLEY et al., 2001). No presente experimento, embora não se tenha determinado as concentrações plasmáticas de propionato, estima-se que tenham sido baixas, pois os animais ficaram 18 h em jejum alimentar, simulando a falta de apetite que é evidente nos casos de toxemia da prenhez. Além disso, a infusão de óleo de peixe provocou marcante anorexia temporária por no mínimo um dia. Assim, nessas condições de excesso de AGNEs e provavelmente baixos teores de propionato existiu uma expressiva oxidação dos AGNEs, evidenciada pelo aumento no BHB (Gráficos 2 e 4). O r-bST teve um efeito indireto no aumento da oxidação dos AGNEs, pois gerou um aumento muito significativo destes compostos devido a maior lipólise promovido por ação deste hormônio, fato que não existiu nas ovelhas controle (Gráfico 1).

Gráfico 4 – Coeficiente de correlação do AGNEs sanguíneo com o BHB sanguíneo para o grupo tratado com r-bST (n=10) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = 0,61$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 5. Coeficiente de correlação do AGNEs sanguíneo com a glicose sanguínea para o grupo tratado com r-bST (n=10) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = 0,695$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 6 - Coeficiente de correlação do BHB sanguíneo com a glicose sanguínea para o grupo tratado com r-bST (n=10) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = 0,60$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

No grupo controle as seguintes relações foram obtidas: AGNEs X BHB ($r = -0,003$; $P > 0,96$) ; AGNEs X Glicose ($r = 0,111$; $P > 0,13$) ; BHB X Glicose ($r = -0,256$; $P > 0,001$). Com exceção da última delas, que teve baixa correlação negativa, as demais não foram significativas. Isso implica dizer que o metabolismo oxidativo mitocondrial hepático dos AGNEs foi pouco realizado no grupo controle gerando o mínimo de gliconeogênese, o que reforça a tese que o r-bST modulou de forma eficiente

esta rota metabólica. Resultados semelhantes aos aqui obtidos foram descritos por Mashek et al., (2005) que injetou óleo de peixe em vacas leiteiras submetidas a jejum e também encontrou pequena geração de BHB e mínima gliconeogênese.

Gráfico 7 - Concentrações séricas de Insulina de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat P < 0,0001; tempo P < 0,0001; trat x tempo P < 0,011)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Os teores de insulina sanguíneos estão bastante aumentados no grupo r-bST, diminuindo gradativamente no decorrer do experimento ($r = 0,51$ $P < 0,0001$; Gráfico 7). Logo após a primeira infusão de óleo de peixe ocorreu um aparente aumento nos teores médios de insulina no grupo controle, o qual diminuiu sensivelmente nos próximos dois tempos voltando ao padrão inicial. Comparado com o primeiro experimento os teores de insulina no presente trabalho atingiram valores muito maiores. Provavelmente, isso ocorreu, pois os teores de glicose sanguíneos foram quase o dobro no presente trabalho e existiu um efeito duplo na estimulação da síntese de insulina pela hiperglicemia ($r = 0,50$ $P < 0,001$ Gráfico 8) e pela hiperlipidemia ($r = 0,51$ $P < 0,001$; Gráfico 9). A título de comparação os valores, nas ovelhas controle, da correlação entre os teores de glicose e insulina ($r = -0,36$ $P < 0,01$) e AGNEs e insulina ($r = -0,17$ $P < 0,02$) foram negativos e pouco expressivos do ponto de vista biológico.

Gráfico 8 - Coeficiente de correlação entre insulina sanguínea e a glicose sanguínea para o grupo tratado com r-bST (n=10) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = 0,50$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 9 - Coeficiente de correlação de AGNEs sanguíneo com a insulina sanguínea para o grupo tratado com r-bST (n=10) ao longo do experimento ($P < 0,001$; $r = 0,51$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

De forma interessante, existiu uma correlação positiva, de média intensidade, ($r = 0,51$; $P < 0,001$ Gráfico 9) entre os teores de AGNEs e de insulina no grupo r-bST. Estudo anterior infundindo AGNEs em grande quantidade em ratos encontrou idêntico resultado, identificando que o excesso de lipídios causa além do aumento de secreção de

insulina uma diminuição na taxa de depuração do mesmo hormônio (BALENT et al., 2002).

Tal resultado sugere que a infusão de óleo de peixe provocou temporariamente um quadro de diabetes tipo II em que coexistem hiperlipidemia e hiperinsulinemia (BRUNZELL, 1981). Essa hiperinsulinemia deve ter provocado um rápido bloqueio das lipases diminuindo gradativamente o teor de AGNEs no grupo tratado com r-bST. Além disso, a concentração de AGNEs foi diminuída pela ação do r-bST, em mecanismos supracitados.

A mesma relação AGNEs X Insulina no grupo controle apresentou coeficiente de correlação negativa e de baixa intensidade ($r = -0,174$; $P < 0,02$) indicando que neste grupo não foi gerado um quadro temporário de diabetes tipo II. Por outro lado, isso leva a pensar que o pequeno aumento de insulina possa ter exercido o mínimo efeito nas lipases gerando menor quantidade de AGNEs livre na corrente.

Gráfico 10 - Concentrações séricas de Triacilgliceróis de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat $P < 0,001$; tempo $P < 0,001$; trat x tempo $P < 0,001$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Maiores concentrações de triacilglicerol (TAG) foram obtidas no grupo r-bST, que no grupo controle, existindo uma diminuição em decorrer ao tempo em ambos tratamentos (Gráfico 10). Este resultado deve ser analisado com cuidado, pois o TAG representa ao mesmo tempo a quantidade de triacilglicerol produzido e secretado pelo fígado, como o injetado na forma de óleo de peixe.

Como as mudanças nas concentrações de TAG foram inferiores no grupo controle, sugere-se que a permanência desta substância injetada no sangue deva ter sido menor. Resultado similar foi encontrado no trabalho de Mashek et al., (2005) que injetou o mesmo óleo em vacas leiteiras. Os mesmos autores estudando a quantidade total de glicerol sanguíneo gerado no decorrer de idêntico protocolo experimental observaram pequeno aumento neste composto, indicando que o efeito das lipases na hidrólise do TAG proveniente do óleo de peixe foi relativamente baixo. Outra possibilidade é a rápida incorporação do TAG presente no óleo de peixe no tecido adiposo destas fêmeas. Animais submetidos à dieta rica em gordura, além dos requerimentos energéticos, tendem a incorporar o TAG aos adipócitos por meio da lipase lipoproteica. No caso das fêmeas tratadas com r-bST essa incorporação não deve ter ocorrido, pois hormônio que tem um efeito modulador contrário no metabolismo, ou seja, de mobilizar gorduras dos estoques e aumentar suas oxidações. Porém faltam elementos para confirmar a tese que o TAG foi rapidamente incorporado aos adipócitos no grupo controle.

As concentrações de TAG foram maiores no decorrer do experimento no grupo r-bST que no controle (Gráfico 10). Dois efeitos podem ter ocorrido: uma menor ação das lipases para desdobrar o TAG em AGNEs ou um consumo e resíntese hepática, transformando AGNEs em TAG de maior monta no processo. A chance de ocorrer a primeira hipótese é mínima, pois o AGNEs aumentou em relação ao grupo controle após a infusão de óleo de peixe (Gráfico 1) e devido ao fato que o r-bST aumenta de fato a ação das lipases (ETHERTHON; BAUMAN, 1993; BAUMAN; VERNON, 1998).

A hipótese de resíntese de TAG é fundamentada pela ação do r-bST aumentar a atividade da enzima glicerol-3-fosfato acil transferase, a qual estimula a transformação de AGNEs em TAG, o qual é envelopado e liberado no sangue na forma de lipoproteínas (VLDL) (VERNON, 2005). Tal hipótese é amparada pela análise da relação AGNEs X TAG ($r = 0,603$; $P < 0,0001$) (Gráfico 11) que apresentou coeficiente de correlação positivo e relativamente alto. Em contrapartida, essa mesma relação no grupo controle foi baixa e negativa ($r = -0,195$; $P < 0,006$).

Gráfico 11 - Coeficiente de correlação de AGNEs sanguíneo com a insulina sanguínea para o grupo tratado com r-bST (n=10) ao longo do experimento ($P < 0,0001$; $r = 0,603$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 12. Concentrações séricas de colesterol de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat $P < 0,001$; tempo $P < 0,001$; trat x tempo $P < 0,134$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

As concentrações de colesterol total sérico de ovelhas tratadas com r-bST foram menores em relação ao grupo controle ($P < 0,001$; Gráfico 12). O hormônio de crescimento (GH) possui efeito supressivo nos teores séricos de colesterol (OSCARSSON et al., 1996; RUDLING et al., 1992). De acordo com esses autores, seres humanos tratados com somatotropina recombinante humana apresentaram

diminuição do risco de desenvolverem doença coronária pela redução dos teores de colesterol total. Na oxidação mitocondrial dos AGNEs é formado acetilCoA. A condensação de três moléculas de acetil-CoA forma o composto denominado 3 Hidroxi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) (MARZZOCO; TORRES 2007). A partir dessa última molécula ou pode ser gerado os corpos cetônicos ou colesterol. Para que seja formado o colesterol há necessidade da ação da HMG-CoA redutase a qual em seres humanos tem sua atividade diminuída pela ação do r-bST. Possivelmente, a ação do r-bST tenha sido exercida, no presente trabalho, sobre a enzima HMG-CoA, pois ocorreu correlação negativa de baixa intensidade entre BHB e colesterol sérico para o grupo r-bST ($r = -0,28$; $P < 0,001$), sugerindo que a produção de corpos cetônicos foi favorecida em comparação com a do colesterol.

Gráfico 13 - Valores estimados da sensibilidade dos tecidos à insulina por meio do teste $RQUICKI_{BHB}$ (Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index_{BHB}), segundo Balogh et al. (2008). (trat $P < 0,001$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Assim como no primeiro estudo, ovelhas tratadas com r-bST submetidas ao desafio de hipertriacilgliceremia com óleo de peixe também apresentaram menor sensibilidade dos tecidos à ação da insulina. Como já comentado em experimento anterior o r-bST promove certa resistência insulínica periférica (ETHERTON; BAUMAN, 1998).

Os altos teores plasmáticos de insulina, de glicose, de BHB e de AGNEs, que fazem parte do denominador da fórmula do $RQUICKI_{BHB}$, principalmente no grupo r-bST, favoreceram muito para que o teste $RQUICKI_{BHB}$ tenha redundado em resultados

que indicaram alta resistência insulínica. Essa interpretação deve ser analisada com cuidado. No tratamento da toxemia da prenhez é fundamental que seja corrigido o déficit energético, em especial para a sobrevivência dos fetos. Tradicionalmente, a insulina regula a passagem de glicose para os tecidos musculares em geral e adiposo, sendo que a insulina se liga aos receptores insulino-dependentes GLUT 4 (HOLMAN e SANDOVAL, 2001). Porém, tal qual aos tecidos da glândula mamária em que a insulina não exerce o controle da passagem de glicose, devido a presença de receptores insulino-independentes GLUT 1 e 3, o útero gravídico contém estes mesmos receptores (DUELHLMEIER et al., 2013). Além disso, cerca de 40 % da glicose gerada pela gliconeogênese é desviada para a nutrição das unidades placentó-fetais no final de gestação de ovelhas (PRIOR; CHRISTINSON, 1978). Devido a imprecisão da quantidade de glicose consumida nos tecidos insulino-dependentes e insulino-independentes em ovelhas com TP, fica difícil a interpretação, com exatidão, do real valor de resistência insulínica nestas fêmeas gestantes, sendo provavelmente menor do que a estimada pelo teste.

Gráfico 14 - Concentrações médias de glicose urinária de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat P < 0,0001; tempo P < 0,0001; trat x tempo P < 0,0001)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Como era esperado, as concentrações séricas de IGF-1 aumentaram para o grupo tratado com r-bST em relação ao controle (Gráfico 14). É bastante reconhecido que o r-bST estimula a síntese hepática de IGF-1 (BAUMAN, 2000; BINES E HART, 1982).

Os resultados obtidos refletiram mais a influência da aplicação do r-bST que a infusão de óleo de peixe, o qual aparentemente não interferiu na síntese desse hormônio. O ponto positivo do aumento de concentração de IGF-1, no grupo tratado com r-bST, é que segundo estudo de Fladeby et al. (2003) constatou-se que este hormônio tem papel importante na ativação e aumento de receptores GLUT 1 (insulino-independentes), os quais estimulam a entrada de glicose produzida para a unidade placentário-fetal e para a glândula mamária, favorecendo o tratamento da TP.

Gráfico 15 - Concentrações médias de ureia sérica de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat P < 0,042; P tempo < 0,0001; trat x tempo P < 0,005)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Sabe-se que o hormônio de crescimento também exerce efeito no metabolismo de proteínas, promovendo retenção de nitrogênio e acréscimo de proteínas ao tecido muscular (ETHERTHON; BAUMAN, 1998). No início do tratamento com r-bST nas ovelhas deste estudo, este efeito pode ser observado pela diminuição dos valores de ureia sanguínea. Entretanto, contrário ao que foi observado no experimento anterior onde pôde ser observado evidente efeito do r-bST sobre a retenção de nitrogênio, o excesso de lipídeos na corrente sanguínea não sustentou esse efeito. Campanile et al., (1998) relataram que dietas com baixa concentração proteica interferem nos teores de ureia sanguínea. As concentrações de ureia se elevam até que atingem pico de concentração em casos de dietas deficientes em proteína, porém passam a diminuir com a permanência deste tipo de dieta por longos períodos.

A partir do momento de infusão de óleo de peixe, pôde-se observar efeito semelhante descrito por Campanile et al. (1998) nas ovelhas do grupo Controle.

Gráfico 16 - Concentrações médias de proteína sérica de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat $P < 0,04$; tempo $P > 0,08$; trat x tempo $P > 0,06$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 17 - Atividade de Aspartato aminotransferase (AST) de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat $P < 0,04$; tempo $P > 0,001$; trat x tempo $P > 0,002$)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 18 - Atividade de gama glutamiltransferase de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat P < 0,0002; tempo P < 0,015; trat x tempo P > 0,063)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 19 - Concentrações médias séricas de Bilirrubina Direta de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat P < 0,0001; tempo P > 0,0001; trat x tempo P > 0,0005)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Gráfico 20 - Concentrações médias séricas de Bilirrubina Total de ovelhas do grupo Controle (n=11) e do grupo tratado com r-bST (n=10), submetidas à infusão com óleo de peixe. (trat P < 0,0004; tempo P > 0,0001; trat x tempo P > 0,0001)

Fonte: ARAÚJO, (2014).

A infusão com óleo de peixe promoveu aumento nas atividades das enzimas hepáticas (Gráficos 17 e 18) e nas concentrações de bilirrubina direta e bilirrubina total (Gráficos 19 e 20). As concentrações de AST ($P < 0,04$), GGT ($P < 0,0002$), Bilirrubina Direta ($P < 0,0001$) e Bilirrubina Total ($P < 0,0004$) foram maiores para o grupo tratado com r-bST do que para o grupo Controle. É importante frisar que os valores de AST se encontravam dentro do valor superior da tabela de referência para a espécie, porém no decorrer das primeiras horas de infusão do óleo de peixe os teores de bilirrubina direta e total estiveram ligeiramente acima da referida tabela, por motivos inexplicáveis (KANEKO et al., 1997). O conjunto desses resultados sugere que a infusão com óleo de peixe possa pelo aumento da concentração de AGNEs provocar algum dano temporário hepático, visto que o excesso AGNEs pode provocar dano tóxico aos hepatócitos (HARRIS, 2005).

Por outro lado, existiu uma forte influência do tratamento com r-bST e de menor grau da infusão de peixe sobre a atividade da GGT, que foi muito superior ao limite das tabelas de referência para ovinos (20 - 52 U/L) no grupo r-bST, e em alguns momentos maior que esse limite no grupo controle (Gráfico 18). Possivelmente, o mesmo efeito citado acima dos AGNEs, tenha provoca o aumento de atividade da GGT, porém em trabalho nacional com uso de r-bST em bovinos normais também foi constatado um aumento desta enzima hepática, sem uma explicação plausível (VIEIRA et al., 2010).

Nesse caso especial a GGT deve ser analisada com cuidado. A atividade dessa enzima se incrementa no soro muito mais por meio da sua síntese hepática que do extravasamento celular provenientes de necrose. Situações ou medicamentos que provoquem hiperplasia biliar aumentam de forma significativa sua atividade em ruminantes (KANEKO et al., 1997). Assim, é necessário estudar se o tratamento com dose usual de r-bST não leva ao aumento da atividade de GGT, como foi constatado por Vieira et al., (2010), por exemplo por hiperplasia biliar de menor monta.

O presente trabalho foi fundamental para esclarecer mecanismos obscuros relacionados à ação efetiva do r-bST no tratamento de ovelhas com TP, não devidamente esmiuçados por vários autores que o testaram (ANDREWS et al., 1996; SCOTT et al., 1998; PEZZAROLI et al., 2013). Assim, o conjunto dos resultados permite recomendar que a medicação com r-bST em ovelhas gordas com hiperlipidemia seja realizada, pois possibilita que a partir do excesso de AGNEs e de BHB gerado no seu metabolismo, substâncias estas reconhecidamente danosas, atuassem como substrato para aumento da gliconeogênese, diminuindo o déficit de glicose para ovelhas com TP e seus fetos, gerando contudo alguns efeitos colaterais de menor monta.

4.4 CONCLUSÕES

O presente experimento permitiu concluir os seguintes fatos:

- A infusão de grande quantidade solução de 20% de óleo de peixe, no decorrer de cinco dias, provocou hiperlipidemia em ambos os grupos, no decorrer do experimento.
- O uso de r-bST causou as seguintes alterações bioquímicas e hormonais que a diferenciaram do grupo controle: aumento nos teores séricos de AGNEs, de BHB, de glicose, de insulina, de TAG, de IGF 1, de BD e BT, do percentual de resistência insulínica, e das atividade de AST e GGT; assim como menores concentrações de colesterol, ureia e proteína total.
- O tratamento com r-bST aumentou a transformação dos AGNEs em BHB, porém o BHB foi reconvertido e teve como destino final a produção de glicose, a qual também foi incrementada pela metabolização dos AGNEs; tanto a hiperglicemia como os altos teores de AGNEs estimularam a síntese de insulina.

- o trabalho identificou que o r-bST provocou uma destacada gliconeogênese, além da redução das concentrações de AGNEs e de corpos cetônicos, esclarecendo assim os mecanismos de ação do tratamento com este hormônio na TP.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, A. H.; HOLLAND-HOWES, V. E.; WILKINSON, J. I. D. Naturally occurring pregnancy toxemia in the ewe and treatment with recombinant bovine somatotropin. **Small Ruminant Research**, v. 23, p. 191-197, 1996.

BALENT, B.; GOSWAMI, G.; GOODLOE, G.; ROGATSKY, E.; RAUTA, O.; NEZAMI R.; MINTS L.; ANGELETTI R. H.; STEIN D.T. Acute elevation of NEFA causes hyperinsulinemia without effect on insulin secretion rate in healthy human subjects. **Annals of New York Academy Science**, v. 965, p. 535-543, 2002.

BALOGH, O.; SZEPES, O.; KOVACS, K.; KULCSAR, M.; REICZIGEL, J.; ALCAZAR, J. A.; KERESZTES, M.; FEBEL, H.; BARTYIK, J.; FEKETE, S. GY.; FESUS, L.; HUSZENICZA, G.Y. Interrelationships of growth hormone AluI polymorphism, insulin resistance, milk production and reproductive performance in Holstein-Friesian cows. **Veterinarni Medicina**, v. 53 n. 11, p. 604–616, 2008.

BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 9, p.1514-1529, 1980.

BAUMAN, D. E. Bovine Somatotropin: review of an emerging animal technology. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3432-3451, 1992.

BAUMAN, D. E.; VERNON, R. G. Effects of Exogenous bovine Somatotropin on Lactation. **Annuals Reviews of Nutrition**, v. 13, p. 437-461, 1993.

BAUMAN, D.E. Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. In: Cronje P. B. (ed). **Ruminant Physiology: digestion; metabolism; growth and reproduction**. Wallingford, UK. 2000. pp. 311–328.

BINES, J. A.; HART, J. C. Metabolic limits to milk production, especially roles of growth hormone and insulin. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 1375-1389, 1982.

BRICKNER, A. E.; PIRES, J. A.; GRESSLEY, T. F.; GRUMMER, R. R. Effects of abomasal lipid infusion on liver triglyceride accumulation and adipose lipolysis during fatty liver induction in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4954-4961, 2009.

BRUNZELL, J.D. Obesity, diabetes and hypertriglyceridemia. In: BJORNTORP, P.; CAIRELLA, M.; HOWARD, A.N. (Eds.), **Recent Advances in Obesity Research** (12^a ed.), London: John Libbey, 1981, pp. 239-247.

CAMPANILE, G.; DE FILIPPO, C.; DI PAOLO, R.; TACCONE, W.; ZICARELLI, L. Influence on dietary protein on urea blood levels in blood and milk of buffalo cows. **Livestock Production Science**, v. 55 n. 2, p. 135-143, 1998.

DUHLMEIER, R.; FLUEGGE, I.; SCHWERT, B.; GANTER, M. Insulin sensitivity during late gestation in ewes affected by pregnancy toxemia and in ewes with high and low susceptibility to this disorder. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 359-366, 2013.

DUHLMEIER, R.; HACKER, A.; WIDDEL, A.; VON ENGELHARDT, W.; SALLMANN, H. P. Mechanisms of insulin-dependent glucose transport into porcine and bovine skeletal muscle. **American Journal of Physiology and Regulation Integrity Compendium Physiology**, v. 289, R187–R197, 2005.

EMERY, R. S.; LIESMAN, J. S.; HERDT, T. H. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. **Journal of Nutrition**, v. 122 (Supl. 3), p. 832-837, 1992.

ETHERTON, T. D.; BAUMAN, D. E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 745-761, 1998.

FLADEBY, C.; SKAR, R.; SERCK-HANSEN, G. Distinct regulation of glucose transport and GLUT1/GLUT3 transporters by glucose deprivation and IGF-I in chromaffin cells. **Biochemistry and Biophysics**, v. 1593, p. 201-208, 2003.

GULAY, M. S.; LIBONI, M.; HAYEN, M. J.; HEAD, H. H. Supplementing Holstein cows with low doses of bovine somatotropin prepartum and postpartum reduces calving-related diseases. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5439-5445, 2007.

HARRIS, E. H. Elevated liver function tests in Type 2 diabetes. **Clinical Diabetes**, v. 23 n. 3, p. 115-119, 2005.

HENZE, P. K.; BICKHARDT, H. F.; SALLMAN, H. P. Spontaneous pregnancy toxemia (ketosis) in sheep and the role of insulin. **Zentralbl Veterinary Medical Advance**, v. 45, p. 255-266, 1998.

HERDT, T. H. Fuel homeostasis in the ruminant. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal And Practice**, v. 4, n. 2, p. 213-232, 1988.

HOLMAN, G. D.; SANDOVAL, I. V. Moving the insulin-regulated glucose transporter GLUT4 into and out of storage. **Trends Cell Biology**, v. 11, p. 173-179, 2001.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA**. [2007]. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 23 mar. 2010.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

KLEPPE, B. B.; AIELLO, R. J.; GRUMMER, R. R.; ARMENTANO, L. E. Triglyceride accumulation and very low density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 7, p. 1813-1822, 1988.

KNAPP, J. R.; FREETLY, H. C.; REIS, B. L.; CALVERT, C. C.; BALDWIN, R. L. Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 4, p. 1025-1035, 1992.

LISBOA, J. A. N.; BENESI, F. J.; MARUTA, C. A.; CARPIGIANE, C. M. Tempo de viabilidade de amostras de sangue venoso bovino destinadas ao exame hemogasométrico quando mantidas sob conservação em água gelada. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 271-276, 2001.

LOMAX, M. A.; DONALDSON, I. A.; POGSON, C. L. The control of fatty acid metabolism in liver cells from fed and starved sheep. **The Biochemical Journal**, v. 214, n. 2, p. 553-560, 1983.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386p.

MASHEK, D. G.; BERTICS, S. J.; GRUMMER, R. R. Effects of intravenous triacylglycerol emulsions on hepatic metabolism and blood metabolites in fasted dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 1, p. 100-109, 2005.

MØLLER, N., JØRGENSEN, J. O. L. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. **Endocrine Reviews**, v. 30 n. 2, p.152-177, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidation of Fatty acids. In: NELSON, D. L.; COX, M. M (Ed). **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. New York: Freeman, 2005. p. 600-622.

NOVAIS, E. P. F.; RECKZIEGEL, G. C.; PALERMO, J. G. C.; MOSCARDINI, A. R. C.; MUSTAFA, V. S.; CASTRO, M. B.; BORGES, J. R. J.; GODOY, R. F. Biópsia hepática no diagnóstico de esteatose hepática em ovinos. **Ciencia Animal Brasileira**, Suplemento 1. Trabalho apresentado no 8º Congresso Brasileiro de Buiatria, Belo Horizonte, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washington, DC, National Academics Press, 2001.

OSCARSSON, J.; OTTOSSON, M.; JOHANSSON, J.; WIKLUND, O.; MARIN, P.; BJÖRNTORP, P.; BENGTSSON, B. Two weeks of daily injections and continuous infusion of recombinant human growth hormone (gh) in gh-deficient adults. ii. effects on serum lipoproteins and lipoprotein and hepatic lipase activity. **Metabolism**, v. 45, n. 3, p. 370-377, 1996.

ORTOLANI, E. L. Intoxicações metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica. In: SILVA SOBRINHO, A. G.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L.; SUSIN, I.; SILVA, J. I. C.; TEIXEIRA, J. C.; BORBA, M. F. S. **Nutrição de ovinos**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. p. 241-246.

ORTOLANI, E. L. Doenças carenciais e metabólicas em caprinos: urolitíase e Toxemia da Prenhez, In: ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA, 3., 1994. Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 1994, 197 p.

ORTOLANI, E. L.; BENESI, F. J. Ocorrência de toxemia da prenhez em cabras (*Capra hircus*) e ovelhas (*Ovis aires*) criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 26, n. 2, p. 229-234, 1989.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The metabolic profile**. Oxford: Oxford University Press, 1987. 179 p.

PEEL, C. J.; BAUMAN, D. E. Somatotropin and lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 474-486, 1987.

PIRES J.A.A.; SOUZA, A.H.; GRUMMER, R. R. Induction of Hyperlipidemia by Intravenous Infusion of Tallow Emulsion Causes Insulin Resistance in Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n.6, p. 2735-2744, 2007.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; CONSTABLE, J. H. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pig and horses**. 10. ed. Edinburgh: Elsevier, 2007. 1877 p.

REID, R. L. The physiopathology of undernourishment in pregnant ewe, with reference to pregnancy toxemia. **Advances Veterinary Science**, v. 12, p. 163-238. 1968.

ROOK, J. S. Pregnancy Toxemia of ewes, does and beef cows. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal and Practice**, v. 16, n. 2, p. 203-317. 2000.

[RUDLING, M.](#), [NORSTEDT, G.](#), [OLIVECRONA, H.](#), [REIHNÉR, E.](#), [GUSTAFSSON, J. Å.](#), [ANGELIN, B.](#) Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 89, n.15, p. 6983-6987, 1992.

RUSSEL, A. J. F. Body condition scoring of sheep. **In Practice**, v. 6, p. 91-93, 1984.

SILVA, L. C. L. C.; STOPIGLIA, A. J.; FANTONI, D. T. Técnica de biópsia hepática em equino por laparoscopia. Hepatic biopsy in horses by laparoscopy. **Ciência Rural**, v. 32, n.3, p. 459-465, 2002.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada a experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221p.

SCOTT, P. R.; SARGINSON, D.; PENNY, C. D. Evaluation of recombinant bovine somatotropin in the treatment of ovine pregnancy toxemia. **The Veterinary Journal**, v. 155, p. 197-199, 1998.

SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Hyperketonemia impairs glucose metabolism in pregnant and non pregnant ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 350-358, 2004.

VAN SAUN, R. J. Pregnancy toxemia in a flock of sheep. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 21, n. 10, p. 1536-1539, 2000.

VERNON, R. G. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 460-469, 2005.

5 ARTIGO 3 VALIDAÇÃO DE DOSÍMETRO PORTÁTIL DE BETA HIDROXIBUTIRATO NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE ACETONEMIA EM OVINOS. *Validation of a hand-held meter to determine β -hydrobutirate concentration and predict ketonemia in sheep.*

RESUMO

O presente trabalho objetivou validar o uso de dosímetro portátil para determinar a concentração sanguínea de Beta-hidroxibutirato (BHB) em e verificar o valor preditivo da mensuração de BHB no diagnóstico da cetonemia inaparente e clínica. Dezenove ovelhas mestiças da raça Santa Inês, híginas, não prenhez e não lactantes foram submetidas a 2 horas de infusão endovenosa de solução de BHB. Foram obtidas 247 amostras de sangue em 5 horas de estudo. Foi verificada alta correlação entre o dosímetro e o padrão ouro ($r = 0,98$, $P < 0,001$). Considerando o valor de 0,8 mmol/L e 1,60 mmol/L de BHB sanguíneo como valores indicativos para Cetose inaparente e Cetose clínica em ovinos, o dosímetro portátil apresentou sensibilidade de 0,97 e especificidade de 0,89 e sensibilidade de 0,99 e especificidade de 0,75, respectivamente. O equipamento portátil pode ser útil no diagnóstico precoce de casos de toxemia da prenhez.

Palavras-chave: Cetose. Beta hidroxibutirato. Dosímetro portátil. Diagnóstico.

5.1 INTRODUÇÃO

O final da gestação e início da lactação, correspondem ao período de maior exigência metabólica e consequentemente aumento do risco de ocorrência de toxemia da prenhez (TP) e cetose (CT) em ovelhas (BRITO et al., 2006). Nessa fase, ocorre grande variação dos metabolitos sanguíneos, entre eles o beta-hidroxibutirato (BHB), corpo cetônico que pode estar elevado na corrente sanguínea devido à mobilização das

reservas corporais, na tentativa de manter o aporte energético para o animal, em especial quando de um balanço energético negativo, sendo que fêmeas com gestação múltipla são mais predispostas à tais quadros metabólicos (ORTOLANI, 2004).

A monitoração das concentrações de BHB nessa fase é útil na detecção da Cetose inaparente possibilitando diagnóstico precoce e maior taxa de sucesso no tratamento. Os testes laboratoriais bioquímicos utilizando kits comerciais são considerados padrão ouro para determinação das concentrações BHB, no entanto as determinações quantitativas de corpos cetônicos na urina (Teste de Rhotera e Combur test) por meio de fitas reativas são utilizadas com frequência no diagnóstico de cetose. No teste de Rhotera as fitas tem como reagente o nitroprussionato de sódio que identifica principalmente o corpo cetônico acetoacetato e em menor quantidade a acetona, porém não detecta BHB, o principal corpo cetônico em casos de CT e TP (KANEKO et al., 2008). O teste Rothera pode ser alterado por alguns fatores como medicamentos, função renal, coleta de urina dificultosa, tempo de contato entre a fita e a urina (KUPCZYŃSKI; CUPOK, 2007).

Atualmente existe no mercado um sensor portátil (Optium Xceed®, Abbott Laboratories, São Paulo, Brasil) que vem sendo utilizado para a determinação de corpos cetônicos e da glicemia em sangue humano, sendo recentemente validado para cães e gatos (HOENIG et al., 2008) e vacas leiteiras (VOYVODA; ERDOGAN, 2010), possuindo a vantagem de quantificar especificamente o BHB em amostras de sangue. As fitas para determinação do BHB podem utilizar sangue total capilar, ou sangue venoso e arterial coletado com anticoagulante desde que o teste seja realizado até 30 minutos pós-coleta, facilitando a utilização desse método a campo, assim como sua utilização em estudos experimentais (VOYVODA; ERDOGAN, 2010).

Panousis et al. (2012) avaliaram as concentrações de BHB no sangue total venoso comparando o sensor portátil e o método enzimático padrão em ovinos, concluindo que as concentrações de BHB não diferiram na comparação entre métodos. Entretanto, são necessários estudos mais detalhados e desafiadores para a avaliação desse método, assim propomos a indução da cetonemia em ovelhas e verificação dos valores de BHB antes, durante e após a indução, podendo acompanhar ao longo da indução diferentes concentrações de BHB. O presente trabalho teve por objetivo validar o uso do dosímetro portáti (Precision Xceed®) para determinar a concentração de BHB por comparação com o teste enzimático utilizado como padrão ouro e verificar o valor preditivo da mensuração de BHB no diagnóstico da cetose em ovinos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 19 ovelhas mestiças da raça Santa Inês, não prenhes e não lactentes, múltiparas, e com peso vivo médio de 50,9 kg. As fêmeas passaram inicialmente por um período de adaptação de 30 dias sendo mantidas em baias coletivas e receberam dieta constituída de 50 % de feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylum*) e 50 % de concentrado comercial (Fri-Ovinos 22/70, Nutreco Fri-ribe Nutrição Animal S.A., Pitangueiras-SP, Brasil) oferecida na proporção de 2,7% do peso vivo, com base na matéria seca.

Para obtenção de amostras com diferentes concentrações de BHB, os ovinos foram submetidos a protocolo de indução de cetonemia segundo modelo conduzido por Harmeyer e Schlumbohm (2003) adaptado para nosso estudo.

O protocolo consistiu de 2 horas de infusão endovenosa com solução D-BHB (Sodium 3-hydroxybutyrate, Alfa Aesar®, Heysham, England) na razão de 5 mmol para cada kg de peso corpóreo diluído em água deionizada e com pH ajustado para 7,4. A quantidade do BHB era calculada de acordo com o peso do animal em quantidade fixa de água deionizada (360 mL). Por exemplo, um animal de 50 kg recebia 250 mM de BHB ou 31,5 g de BHB.

Para infusão contínua e melhor manejo dos animais durante a indução, foi implantada na veia jugular direita um cateter de plástico (Intracat™, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA). Tal solução foi administrada a uma velocidade de 0,01 mmol/kg de PC por minuto, perfazendo um total de 120 minutos de infusão. Durante as duas horas de infusão, amostras de sangue eram coletadas por venipuntura da jugular externa esquerda a cada 20 minutos perfazendo assim sete momentos de coleta (T1 ao T6). O momento inicial T0 correspondeu ao momento antes do início da infusão para verificar os níveis basais de BHB dos animais. Para evitar discrepâncias entre os diferentes momentos de alimentação dos animais, estes foram submetidos a 18 horas de jejum antes do início do estudo. Ao término da indução foram realizadas seis coletas adicionais realizadas após 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos do término da indução, T7 ao T12, respectivamente, para verificar a eliminação da substância no organismo dos animais.

Uma amostra de 4 mL de sangue foi coletado em tubos com sistema à vácuo contendo anticoagulante fluoreto de sódio (Vacutainer®, Becton, Dickinson and

Company, New Jersey, USA), sendo homogeneizados por inversão completa repetidas vezes imediatamente após a coleta e mantidos em refrigeração (4° a 6 °C) por período máximo de 2 horas até serem processados. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 697 g para separação do plasma que foi armazenado a 20 °C negativos até análise.

A técnica utilizada como teste ouro foi o método colorimétrico enzimático descrito por Willianson et al. (1962) que determina a concentração de BHB por meio da redução do nucleotídeo difosfopiridina (DPN) pelo D (-) 3-Hidroxibutirato na presença da enzima D (-) 3 Hidroxibutirato desidrogenase. Esta enzima catalisa a reação de forma reversível formando acetoacetato + DPNH + H⁺. Para determinação do BHB foram utilizados kits comerciais (D-3-Hydroxybutyrate, Randox Laboratories Ltd., Co. Antrium, UK) com auxílio de analisador bioquímico automatizado (Daytona, Randox Laboratories Ltd., Co. Antrium, UK).

O outro método utilizado para detecção do BHB mediante dosímetro portátil da marca Optium Xceed® (Abbott Laboratories, São Paulo, Brasil). Imediatamente após a primeira coleta, uma segunda amostra de sangue venoso foi coletada por punção jugular em seringas descartáveis de 3 mL contendo 0,1 mL de heparina sódica, homogeneizado e imediatamente colocada uma amostra na tira reativa indicada para o aparelho. O princípio da mensuração do BHB pelo dosímetro portátil utiliza a técnica de enzimas eletroquímicas. Quando a amostra de sangue é colocada na tira reagente própria para o teste, o BHB reage com a substância química da tira produzindo uma pequena corrente elétrica. Esta corrente então é medida e o sensor mostra o resultado. O tamanho da corrente provocada refere à quantidade de BHB na amostra (ABBOTT LABORATORIES, 2006).

Considerando o protocolo de indução e os diferentes momentos de coleta foram obtidas 247 amostras (19 ovelhas; 13 momentos de coleta) com diferentes concentrações de BHB quantificado pelas duas supracitadas técnicas. Os resultados foram comparados por meio de teste T pareado de Student. Foi realizada análise de regressão e calculados os coeficientes de determinação e o coeficiente de correlação de Pearson.

Foram estabelecidos dois limiares dos valores de BHB. Para avaliar condições de cetose inaparente utilizamos o valor de 0,80 mmol/L (BALIKCI et al., 2009) sendo que animais com valores iguais ou maiores foram considerados positivos e animais com valores menores foram considerados negativos. Para avaliar condições de cetose clínica

em ovinos consideramos o valor de BHB de 1,60 mmol/L (LACETERA et al., 2001). A partir destes valores foi possível estabelecer a sensibilidade, especificidade do dosímetro portátil em relação ao teste enzimático, considerado padrão ouro.

5.3 RESULTADOS

O valor médio da concentração de BHB utilizando o método laboratorial foi de 1,254 mmol/L ($\pm 0,089$) enquanto que o dosímetro portátil apresentou média superior de 1,904 mmol/L ($\pm 0,156$). A concentração de BHB utilizando o padrão ouro variou de 1,050 a 3,940 mmol/L enquanto que os resultados do dosímetro portátil variaram de 1,000 a 7,100 mmol/L.

A análise estatística mostrou diferença significativa entre os valores do método laboratorial e os valores obtidos no equipamento portátil ($P < 0.05$), que foi provavelmente decorrente deste maior valor constante obtido pelo dosímetro.

A figura 1 apresenta a correlação linear entre os dois testes, onde podemos verificar uma fortíssima correlação entre o dosímetro portátil e o padrão ouro ($r = 0,98$; $P < 0,05$). Os resultados do dosímetro podem ser corrigidos de acordo com o padrão ouro através da equação $y = 1,7094x - 0,239$, onde y é o valor obtido no dosímetro portátil e x é o resultado esperado no método laboratorial ($r^2 = 0,9593$).

Figura 1 - Correlação entre o dosímetro portátil e o os kits laboratoriais

Fonte: ARAÚJO, (2014).

Considerando o valor de 0,80 mmol/L de BHB como indicativo de Cetose inaparente que poderia acarretar quadro de TP, a tabela 1 apresenta os resultados comparativos entre os dois testes. Considerando os dados da tabela 1 obtivemos resultados de sensibilidade de 0,9726 (0,9313 a 0,9925; 95% de intervalo de confiança); especificidade de 0,8911 (0,8135 a 0,9444; 95% de intervalo de confiança); Valor Preditivo Positivo de 0,9281 (0,8750 a 0,9636; 95% intervalo de confiança); Valor Preditivo Negativo de 0,9574 (0,8946 a 0,9883; 95% intervalo de confiança) para determinação de BHB utilizando o dosímetro portátil em comparação com o padrão ouro.

Tabela 1 - Número de casos de animais positivos ou negativos para cetose subclínica (considerando limiar de 0,80 mmol/L) nos dois testes analisados. São Paulo, 2014

Métodos de determinação de			
BHB	Padrão ouro		Total
Dosímetro portátil	+	-	
+	142	11	153
-	4	90	94
Total	146	101	247

Fonte: ARAÚJO, (2014).

A tabela 2 apresenta a comparação entre os dois métodos utilizando o valor de 1,60 mmol/L de BHB como indicativo de cetose clínica em ovinos. Obtivemos resultados de sensibilidade de 0,9882 (0,9362 a 0,9997; 95% intervalo de confiança); especificidade de 0,7531 (0,6793 a 0,8174; 95% intervalo de confiança); Valor Preditivo Positivo de 0,6774 (0,5876 to 0,7586; 95% intervalo de confiança); Valor Preditivo Negativo de 0,9919 (0,9555 to 0,9998; 95% intervalo de confiança) para determinação de BHB utilizando o dosímetro portátil em comparação com o padrão ouro.

Tabela 2 - Número de casos de animais positivos ou negativos para cetose clínica (considerando limiar de 1,60 mmol/L) nos dois testes analisados. São Paulo, 2014

Métodos de determinação de			
BHB	Padrão ouro		Total
Dosímetro portátil	+	-	
+	84	40	124
-	1	122	123
Total	85	162	247

Fonte: ARAÚJO, (2014).

5.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A gestação em ovinos é um período crítico já que, nesta fase, ocorrem importantes alterações fisiológicas, modificações no manejo e cada vez mais se têm selecionado ovelhas capazes de gerar dois ou mais produtos por parição para incrementar os índices produtivos (ORTOLANI, 1994). A TP é uma doença preocupante neste âmbito, pois gera significativo impacto econômico. A principal característica bioquímica da TP é a elevação na produção de corpos cetônicos, em especial o BHB que é o mais estável no organismo dos ruminantes. Muitos estudos foram desenvolvidos acerca dos teores de BHB que melhor identificam fêmeas com risco de desenvolverem TP ou com TP já instaladas. Nas fêmeas consideradas com risco eminente de desenvolverem a doença, esses valores situam-se entre 0,60 e 0,80 mmol/L (LACETERA et al., 2001; KÚLCAR et al., 2006; BALIKCI et al., 2009; PANOUSIS et al., 2012).

Os resultados de sensibilidade e especificidade do dosímetro portátil quando consideramos o limiar de 0,80 mmol/L de BHB sanguíneo confirmam os encontrados por outros pesquisadores (KUPCZYNSKI; CUPOK, 2007; OETZEL; MCGUIRK, 2007; IWERSEN et al. 2009; VOYVODA; ERDOGAN, 2010; PANOUSIS et al., 2012) nos quais a especificidade e sensibilidade do equipamento portátil variaram de 97% a 100% e 85% a 100%, respectivamente. Verificou-se que com a utilização do dosímetro portátil foram detectados quatro casos considerados falso negativos, ou seja, que apresentaram valores superiores a 0,80 mmol/L no equipamento portátil mais possuíam concentrações inferiores ao limite estabelecido no teste ouro. Por outro lado em 11 ocasiões verificamos casos de resultados falsos positivos, onde os valores do dosímetro portátil foram superiores a 0,80 mmol/L mas inferiores a este valor no teste ouro.

Com relação à concentração de 1,60 mmol/L, foi detectado apenas um caso falso negativo demonstrando alta sensibilidade do dosímetro portátil. Por outro lado em 40 ocasiões verificamos casos de resultados falsos positivos, onde os valores do dosímetro portátil foram superiores a 1,60 mmol/L mas inferiores a este valor no teste ouro, sendo verificada uma menor especificidade para este equipamento quando de caso de cetose clínica, uma vez que seus resultados tendem a ser levemente superiores ao do padrão ouro. Os resultados deste estudo provaram que o dosímetro portátil utilizado pode fornecer uma medida rápida e de razoável acurácia na detecção dos teores de BHB no

sangue total, podendo ser útil como teste diagnóstico na predição de quadros de cetose inaparente e cetose clínica.

Existem divergências quando aos valores de BHB sanguíneo indicativos de cetose inaparente ou clínica. Kulcsár et al. (1988), observou ao trabalhar com fêmeas Merino gestantes de um feto ($n= 41$) e gemelares ($n= 57$), que fêmeas prenhes de um feto apresentaram baixos teores de BHB em relação ao grupo de fêmeas gestantes de gêmeos. De acordo com este autor a hipercetonemia foi detectada quando os níveis de Beta Hidroxi Butirato ultrapassavam 1,60 mmol/L, níveis os quais foram observados em 27 fêmeas apenas do grupo de gemelares. Balikci et al. (2009) consideram que animais com cetose inaparente obtiveram valores de BHB acima de 0,70 mmol/L, e com cetose clínica acima de 3,00 mmol/L. Por outro lado Lacetera et al. (2001) considera em seu trabalho que animais com cetose inaparente apresentaram índices de 0,70 mmol/L e com cetose clínica 1,60 mmol/L. Em contrapartida, Dawson et al. (1999) relatam que teores de BHB acima de 0,85 mmol/L indicam deficiência de energia no rebanho.

O dosímetro portátil Optium Xceed demonstrou ser eficaz na mensuração do BHB no sangue total em ovinos. Muitos testes são disponíveis e vem sendo lançados no mercado constantemente com objetivo de facilitar e auxiliar o médico veterinário no diagnóstico clínico. O teste ideal para utilização a campo nos estudos acerca de enfermidades com esse caráter deve fornecer rapidez, rentabilidade, praticidade, facilidade de manipulação, sensibilidade, especificidade, confiança dos resultados e ser barato. O Optium Xceed apresenta como vantagens o reduzido tempo despendido para fornecimento do resultado (10 segundos), a reduzida quantidade de sangue necessária para a análise (1,5 μ L de sangue total) e a ausência da necessidade de calibração do equipamento ou ajuste para performance dos resultados (PANOUSIS et al., 2012).

O dosímetro portátil apresentou resultados válidos de BHB e compatíveis com o teste laboratorial padrão, podendo ser indicado para utilização na espécie ovina, apresentando, no entanto, valores superiores ao padrão, os quais podem ser corrigidos pela equação apresentada neste estudo.

Considerando 0,80 mmol/L de BHB no sangue como preditivo de cetose inaparente e 1,60 mmol/L de BHB no sangue como preditivo de cetonemia o dosímetro portátil apresentou valores diagnósticos com sensibilidade e especificidade eficientes.

O equipamento portátil pode trazer avanço no diagnóstico precoce de casos de toxemia da prenhez, caso seja utilizado no acompanhamento de ovelhas pré-púberes.

Estudos a campos são necessários para comprovar a eficiência desta nova técnica diagnóstica para predição de casos de toxemia da prenhez em ovelhas pré-púberes.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, A. Pregnancy toxemia in the ewe. **Practice**, v. 19, p. 306-312, 1997.
- ABBOTT LABORATORIES. **Abbott Optium Xceed Diabetes Monitoring System: User's Guide**. 2006. Disponível em: <www.abbottdiabetescare.com>. Acesso em: 04 abr. 2012.
- BALIKCI, E.; YILDIZ, A.; GURDOGAN, F. Investigation on some biochemical and clinical parameters for pregnancy toxemia in akkaraman ewes. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n.7, p. 1268-1273, 2009.
- BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, v. 70, p. 567-590, 1990.
- DAWSON, L. E. R.; CARSON, A. F.; KILPATRICK, D. J. The effect of the digestible undegradable protein concentration of concentrates and protein source offered to ewes in late pregnancy on colostrums production and lamb performance. **Animal Feed Science Technology**, v. 82, p. 21-36, 1999.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Bioquímica clínica de glicídios. In: **Introdução a bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, p.153-207.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. USA: Academic Press, 2008. 216 p.
- KULCSÁR, M.; ANKÓ, G.; MAGDY, HGI; REICZIGEL, J.; FORGASH, T.; PROHÁČZICH, A.; DELAVALD, C.; MAGYAR, K.; CHILLIARD, Y.; SOLTI, L.; HUSZENICZA, GY. Pregnancy stage and number of fetuses may influence maternal plasma leptin levels in ewes. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 54, n. 2, p. 221-234, 2006.
- HARMEYER, J.; SCHLUMBOHM, C. Hypocalcemia reduces endogenous glucose production in hyperketonemic sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1953-1962, 2003.
- KUPCZYŃSKI, R.; CUPOK, A. Sensitivity and specificity of various tests determining β -hydroxybutyrate acid in diagnosis of ketosis in cows. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 10, n. 3, 2007.
- IWERSSEN M., FALKENBERG U., VOIGTSBERGER R., FORDERUNG D., HEUWIESER W. Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 2618-2624, 2009.
- LACETERA, N; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; NORDONE, A. Effects of subclinical pregnancy toxemia response in sheep. **Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1020-1024, 2001.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; CONSTABLE, J. H. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pig and horses**. 10. ed. Edinburgh: Elsevier, 2007. 1877 p.

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

PANOUSIS, N., BROZOS, C. H., KARAGIANNIS, I., GIADINIS, N. D., LAFI, S., KRITSEPI-KONSTANTINOOU, M. Evaluation of Precision Xceed[®] meter for on site monitoring of blood β -hydroxybutyric acid and glucose concentrations in dairy sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 435-439, 2012.

VOYVODA, H.; ERDOGAN, H. Use of a hand-held meter for detecting subclinical ketosis in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 344-351, 2010.

WILLIANS, D. H; MELANBY, J.; KREBS, H. A. Enzymatic determination of D(-)- β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. **Biochemistry Journal**, v. 82, n. 1, p. 90-96, 1962.

6 CONSIDERAÇÕES INTEGRADAS DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Os dois experimentos foram conduzidos, para isoladamente, estudar o efeito de certos catabólitos indesejáveis presentes nos quadros de TP, ou seja: o excesso de corpos cetônicos, representados pelo BHB e o de lipídios no sangue, caracterizado pelo excesso de TAG (leia-se AGNEs). Ambos conseguiram desafiar as ovelhas utilizadas atingindo valores superiores aos de referência nos catabólitos supracitados, em todos os grupos. É digno de nota que no primeiro experimento a infusão de BHB gerou no momento T0 e T12 além do incremento de BHB teores relativamente altos de AGNEs. Já no segundo experimento os teores de lipídios foram altos nos dois grupos, porém o BHB só se elevou no grupo r-bST. Em outras palavras, a infusão desses catabólitos provocou um perfil bioquímico compatível com a TP.

Os estudos serviram plenamente para testar a hipótese que o r-bST teria uma ação terapêutica por meio da modulação da resposta bioquímica das ovelhas submetidos aos descritos desafios. Embora, alguém pudesse criticar que o ideal seria empregar ovelhas com TP ou fêmeas prenhes com grande risco desta enfermidade, por motivos éticos e até por uma questão de padronização experimental o modelo em questão foi favorável para se testar as hipóteses em questão. Geralmente, quadros de TP, além de terem dois tipos etiológicos, apresentam uma diversidade clínica muito marcante, quer seja pelo estágio evolutivo da doença, do número de fetos, pela condição corporal desuniforme etc. Apesar das variações individuais, os resultados obtidos principalmente, no início do experimento estiveram dentro das expectativas. Deve-se ainda lembrar ao leitor que a hipótese do trabalho não era provar que o r-bST poderia ser empregado na terapia da TP, algo já identificado por vários autores, mas sim entender os mecanismos bioquímicos e hormonais envolvidos nesta terapia (ANDREWS et al., 1996; SCOTT et al., 1998; PEZZAROLI et al., 2013).

Os presentes resultados indicaram que o r-bST pode aumentar a gliconeogênese em ovelhas gordas inicialmente submetidas ao jejum prévio de 18 horas associado à súbita anorexia de pelo menos mais 24 horas, após a infusão de óleo de peixe. Essa privação alimentar pode desencadear uma hipoglicemia de pequena monta (REID, 1968). Mesmo assim, em ambos os grupos não ocorreu hipoglicemia, mas normoglicemia no grupo controle e uma destacada hiperglicemia no grupo r-bST. Esse resultado indica que a gliconeogênese aconteceu tanto no grupo controle como no

tratado com r-bST, porém a intensidade da resposta foi extremamente superior quando os animais foram medicados com r-bST (Gráfico 3; 2º experimento).

Em termos de desafios metabólicos, o segundo experimento trouxe, sem dúvida, maiores complicações e modificações no perfil metabólicas às fêmeas, pois provocou anorexia pós-infusão, inexistente no primeiro ensaio, induziu maior síntese de insulina e gerou maiores teores de AGNEs e de glicose que influenciaram na determinação de uma resistência insulínica de maior monta, frequentemente citado na TP tipo 2, Rook, (2000), para não dizer nas variáveis estudadas do perfil hepático que se mostraram anormais para no segundo experimento.

Embora o desafio metabólico fosse maior nesse segundo ensaio, foi nele que ficou mais evidente a ação terapêutica do r-bST. O elemento mais fundamentado é a gliconeogênese, identificada pela glicemia. No 2º experimento os teores de glicose atingiram praticamente o dobro do ensaio anterior, e tudo indica que o incremento dessa atividade foi muito maior pela transformação de AGNEs em glicose (AGNEs X Glicose $r = 0,695$ Gráfico 5) que pela conversão de BHB neste açúcar (BHB X Glicose $r = 0,597$ gráfico 6). No primeiro ensaio, a infusão de BHB suprimiu em demasia os AGNEs sanguíneos no grupo r-bST e este substrato contribuiu muito pouco para a geração de glicose, visto que não existiu uma correlação significativa entre estas variáveis ($r = 0,067$ $P > 0,49$), dependendo a gliconeogênese basicamente da fonte de BHB ($r = - 0,48$ $P < 0,001$ Gráfico 3).

Independente dessas considerações, foi fundamental neste trabalho identificar que o r-bST desdobrou o AGNEs e o BHB em glicose, atuando em duas frentes na terapia da TP. A primeira delas foi gerar superávit de glicose, altamente deficitária para os fetos e para as fêmeas no final de gestação, inclusive com a hipoglicemia como principal fator etiológico da anorexia na ovelha com TP (REID, 1968). A segunda e não menos importante foi provocar a diminuição de AGNEs e de BHB no organismo, pois estes compostos são considerados danosos ao organismo, os quais são transformados em glicose.

Embora comprovadamente a r-bST atue no tratamento da TP e os presentes dados justifiquem este propósito, faltam maiores estudos para compreender possíveis efeitos colaterais deste medicamento, com destaque a função hepática e a atividade da GGT.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, A. H.; HOLLAND-HOWES, V. E.; WILKINSON, J. I. D. Naturally occurring pregnancy toxemia in the ewe and treatment with recombinant bovine somatotropin. **Small Ruminant Research**, v. 23, p. 191-197, 1996.
- ASCHENBACH, J. R.; KRISTENSEN, N. B.; DONKIN, S. S.; HAMMON, H. M.; PENNER, G. B. Gluconogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. **Life**, v. 62, n. 12, p. 869-977, 2010.
- BAUMAN, D. E.; VERNON, R. G. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. **Annuals Reviews of Nutrition**, v. 13, p. 437-461, 1993.
- BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3432-3451, 1992.
- BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 9, p. 1514-1529, 1980.
- BELL, A. W. Regulation of organic nutrients metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2804-2819, 1995.
- BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, v. 10, n. 2, p. 567-589, 1990.
- BINES, J. A.; HART, J. C. Metabolic limits to milk production, especially roles of growth hormone and insulin. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 1375-1389, 1982.
- BRICKNER, A. E.; PIRES, J. A.; GRESSLEY, T. F.; GRUMMER, R. R. Effects of abomasal lipid infusion on liver triglyceride accumulation and adipose lipolysis during fatty liver induction in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4954-4961, 2009.
- BROUNTS, S. H.; HAWKINS, J. F.; BAIRD, A. N. Outcome and subsequent fertility of sheep and goats undergoing cesarean section because of dystocia: 110 cases (1981–2001). **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 275-279, 2004.
- BRUNZELL, J. D. Obesity, Diabetes and hypertriglyceridemia. In: BJORNTORP, P.; CAIRELLA, M.; HOWARD, A.N. (Eds.). **Recent advances in obesity research**. 12. ed. London: John Libbey, 1981, p. 239-247.
- DE FRONZO, R.; TOBIN, J. D.; ANDRES, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. **American Journal of Physiology**, v. 237, n. 3, E214-E231, 1979.

- ETHERTON, T. D.; BAUMAN, D. E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 745-761, 1998.
- ETHERTON, T. D.; EVOCK, C. N. Stimulation of lipogenesis in bovine adipose tissue by insulin and insulin growth factor. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 357-362, 1986.
- GONZÁLEZ, F. D.; SILVA, S. C. Bioquímica clínica de lipídeos. In: **Introdução a bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, p. 121-151.
- GULAY, M. S.; LIBONI, M.; HAYEN, M. J.; HEAD, H. H. Supplementing holstein cows with low doses of bovine somatotropin prepartum and postpartum reduces calving-related diseases. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5439-5445, 2007.
- HARMEYER, J.; SCHLUMBOHM, C. Pregnancy impairs ketone body disposal in late gestating ewes: implications for onset of pregnancy toxemia. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 254-264, 2006.
- HENZE, P. K.; BICKHARDT, H. F.; SALLMAN, H. P. Spontaneous pregnancy toxemia (ketosis) in sheep and the role of insulin. **Zentralbl Veterinary Medical Advance**, v. 45, p. 255-266, 1998.
- HERDT, T.H. Fuel homeostasis in the ruminant. **The Veterinary Clinics Of North America. Food Animal And Practice**, v. 4, n. 2, p. 213-232, 1988.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA**. [2011]. Disponível em www.sidra.ibge.gov.br. Acesso em: 14 jul. 2014.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- KLEPPE, B. B.; AIELLO, R. J.; GRUMMER, R. R.; ARMENTANO, L. E. Triglyceride accumulation and very low density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 7, p. 1813-1822, 1988.
- LISBOA, J. A. N.; BENESI, F. J.; MARUTA, C. A.; CARPIGIANE, C. M. Tempo de viabilidade de amostras de sangue venoso bovino destinadas ao exame hemogasométrico quando mantidas sob conservação em água gelada. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 271-276, 2001.
- LOMAX, M. A.; DONALDSON, I. A.; POGSON, C. L. The control of fatty acid metabolism in liver cells from fed and starved sheep. **The Biochemical Journal**, v. 214, n. 2, p. 553-560, 1983.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386 p.

- MARTENIUK J. V.; HERDT, T. H. Pregnancy toxemia and ketosis of ewes and does. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal and Practice**, v. 4, p. 307-315, 1988.
- MASHEK, D. G.; BERTICS, S. J.; GRUMMER, R. R. Effects of intravenous triacylglycerol emulsions on hepatic metabolism and blood metabolites in fasted dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 1, p. 100-109, 2005.
- NOVAIS, E. P. F.; RECKZIEGEL, G. C.; PALERMO, J. G. C.; MOSCARDINI, A. R. C.; MUSTAFA, V. S.; CASTRO, M. B.; BORGES, J. R. J.; GODOY, R. F. Biópsia hepática no diagnóstico de esteatose hepática em ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, Suplemento 1. Trabalho apresentado ao 8º Congresso Brasileiro de Buiatria, Belo Horizonte, MG, 2009.
- ORTOLANI, E. L. Intoxicações metabólicas em ovinos: intoxicação cúprica. In: SILVA SOBRINHO, A. G.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L.; SUSIN, I.; SILVA, J. I. C.; TEIXEIRA, J. C.; BORBA, M. F. S. **Nutrição de ovinos**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. p. 241-246.
- ORTOLANI, E. L. Doenças carenciais e metabólicas em caprinos: urolitíase e Toxemia da Prenhez, In: ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA, 3., 1994, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 1994, 197 p.
- ORTOLANI, E. L.; BENESI, F. J.; Ocorrência de toxemia da prenhez em cabras (*Capra hircus*) e ovelhas (*Ovis aires*) criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 26, n. 2, p. 229-234, 1989.
- PEEL, C. J.; BAUMAN, D. E. Somatotropin and lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 474-486, 1987.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; CONSTABLE, J. H. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pig and horses**. 10. ed. Edinburgh: Elsevier, 2007. 1877 p.
- REID, R. L. The physiopathology of undernourishment in pregnant ewe, with reference to pregnancy toxemia. **Advances Veterinary Science**, v. 12, p. 163-238. 1968.
- ROOK, J. S. Pregnancy Toxemia of ewes, does and beef cows. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal and Practice**, v. 16, n. 2, p. 203-317, 2000.
- RUSSEL, A. J. F. Body condition scoring of sheep. **In Practice**, v. 6, p. 91-93, 1984.
- SARGISON, N. D. Pregnancy Toxemia. In: AITKEN, I. D. (Ed.). **Diseases of sheep**, Oxford, Blackwell Publishing, 2007. p. 359-363.
- SCOTT, P. R.; SARGINSON, D.; PENNY, C. D. Evaluation of recombinant bovine somatotropin in the treatment of ovine pregnancy toxemia. **The Veterinary Journal**, v. 155, p. 197-199, 1998.

SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Hyperketonemia impairs glucose metabolism in pregnant and non pregnant ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 350-358, 2004.

VERNON, R. G. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 460-469, 2005.

WASTNEY, M. E.; WOLFF, J. E.; BICKERSTAFF, R.; RAMBERG, C. F.; BERMAN, M. Kinetics of glucose metabolism in sheep. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 36, p. 463-474, 1983.

WEST, C.E.; PASSEY, R.F. Effect of glucose load and of insulin on the metabolism of glucose and of palmitate in sheep. **Biochemistry Journal**, v.102, p. 58-64, 1967.

WILSON, S.; MACRAE, J.C.; BUTTERY, P.J. Glucose production and utilization in non-pregnant, pregnant and lactating ewes. **British Journal of Nutrition**, v. 50, p. 503, 1983.