REJANE DOS SANTOS SOUSA

**Avaliação de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento da laminite
asséptica aguda decorrente de acidose ruminal por oligofrutose em bovinos**

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

São Paulo

2017

REJANE DOS SANTOS SOUSA

**Avaliação de anti-inflamatórios não esteróideais no tratamento da laminite asséptica
aguda decorrente de acidose ruminal por oligofrutose em bovinos**

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

São Paulo

2017

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. 3492
FMVZ

Sousa, Rejane dos Santos

Avaliação de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento da laminite asséptica aguda decorrente de acidose ruminal por oligofrutose em bovinos / Rejane dos Santos Sousa. -- 2017.

114 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

1. Rúmen. 2. Diagnóstico. 3. Dor. 4. Analgesia. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDAIIS NO TRATAMENTO DA LAMINITE AGUDA INDUZIDA POR QUADRO DE ACIDOSE LÁCTICA RUMINAL EM BOVINOS", protocolado sob o CEUA nº 2545300714, sob a responsabilidade de **Enrico Lippi Ortolani e equipe; Rejane dos Santos Sousa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 25/02/2015.

We certify that the proposal "EVALUATION OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN THE TREATMENT OF ACUTE LAMENESS INDUCED BY RUMINAL LACTIC ACIDOSIS RUMINAL IN CATTLE", utilizing 36 Bovines (36 males), protocol number CEUA 2545300714, under the responsibility of **Enrico Lippi Ortolani and team; Rejane dos Santos Sousa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 02/25/2015.

Vigência da Proposta: de 01/2015 a 12/2015

Área: Departamento De Clínica Veterinária

Procedência: Os animais serão comprados em fazendas circunvizinhas a Pirassununga.

Espécie: Bovino

Gênero: Machos

idade: 12 meses

N: 36

Linhagem: Mestiços de Nelore

Peso: 300

São Paulo, 18 de agosto de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUSA, Rejane dos Santos

Título: Avaliação de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento da laminite asséptica aguda decorrente de acidose ruminal por oligofrutose em bovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor 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: _____

À minha mãe Maria Lenilde e meu pai Edvaldo Nonato
Minhas irmãs Gessianne e Regina, aos (meus sobrinhos
Meus avós paternos (Socorro e Raimundo) e maternos (Maria Regina e José Clementino)

À Clayton Carlos e toda sua família.

À toda a minha família

*À vocês, que compartilharam deste meu ideal me incentivando a prosseguir na jornada,
fossem quais fossem os obstáculos. Dedico esta conquista com a mais profunda admiração e
gratidão, porque ela lhes pertence, ela é tão de vocês quanto minha.*

“Uma crise difícil pode ser mais prontamente suportada se tivermos a convicção de que a nossa existência traz consigo um propósito – uma causa para defender, uma pessoa para amar, um alvo para alcançar”.

John Maxwell

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por ter me dado coragem e força para enfrentar as dificuldades na vida, por guiar meus passos e o meu caminho, me proporcionando a companhia de pessoas extraordinárias para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani pela confiança, ensinamentos, carinho e pela autonomia a mim concedida em algumas situações que foram essenciais para meu amadurecimento e crescimento profissional. Pela oportunidade de fazer parte de uma equipe caracterizada pela competência, respeito ao próximo e acima de tudo companheira.

Ao Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva pela disponibilização das instalações e animais do Laboratório de Pesquisa de Gado de Corte (LPGC-USP – Pirassununga).

À Prof. Dra. Cristina Ferrarini Nunes Soares Hage (FZEA/USP) e sua equipe pela parceria no desenvolvimento da metodologia e avaliação das radiografias desse projeto.

Ao Hospital Veterinário da FMVZ-USP Pirassununga e todos os funcionários que ajudaram na realização desse estudo, em especial ao Médico Veterinário Ubiraem Schalch por disponibilizar as instalações e ao Sr. João Batista da Silva por ter aceitado prontamente o desafio de realizar as radiografias.

Ao Prof Dr. Eduardo Harry Birgel e Daniela Birgel (FZEA/USP) pela disponibilização do Laboratório Clínico para a realização dos hemogramas e por sempre estarem disponíveis quando necessitei.

Ao Prof Dr. Fabio Celidônio e Msc Ronaldo Gargano pela ajuda no desenvolvimento da técnica para a realização das biopsias de casco e pelas conversas enriquecedoras sobre a metodologia desse estudo.

Ao Prof Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez pela realização das lâminas histológicas que permitiram avaliar e validar a metodologia desse estudo.

Ao Prof Dr. Fernando José Benesi pela disponibilização da câmera termográfica e a Msc. Carolina Shecara pela análise das imagens termográficas.

À Msc Amanda Festa Sabes (UNESP-Jaboticabal) por ter se disponibilizado a ensinar a técnica de Zimografia para análise das metaloproteinases.

À Família Ortolani - Francisco Leonardo Costa de Oliveira, Mailson Renan Dias e Natalia Sato Minami pela extrema ajuda na realização desse projeto, sem vocês não teria conseguido chegar até aqui. Agradeço pelo agradável convívio diário, pelo companheirismo durante os longos dias de trabalho, pelos vários momentos de descontração. Saibam que trabalhar com vocês é muito gratificante, pelo carinho e respeito que temos uns pelos outros, pelo companheirismo e sobretudo pela forma como aceitamos os desafios diários, sempre com descontração.

À velha guarda da Família Ortolani: Antonio Humberto Hamad Minervino, Frederico Augusto Mazzocca Lopes Rodrigues, Carolina Akiko Sato Cabral, Leonardo Frasson dos Reis e Isadora Karolina Freitas de Sousa, por terem me recebido nessa Família e por dividimos momentos de intenso aprendizado profissional e pessoal.

Ao Sr Celso Schmidt, pela ajuda incondicional na execução desse experimento, pela amizade e pela incrível disponibilidade em ajudar. Ao Sr Paulo, Xandy, Amendoim, João, Maciano e Pedro por toda ajuda e amizade durante os longos dias de trabalho.

Aos estagiários Benedito, Barnabé, Walter e Roça pela ajuda nos dias de experimento.

À Clara Mori e Samantha Miyashiro pela amizade e por todos os ensinamentos laboratoriais e principalmente pelos laços de confiança que foi construído durante esse período. As técnicas Claudia, Maria Helena, Dona Carmen, Creide e Dinha e técnicos Dinho e Agnaildo pela ajuda durante as análises, pela amizade e bom convívio. As secretarias Adelaide Borges e Cida Freitas pela disposição em ajudar sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Raimundo Alves Barreto Júnior, por ter despertado em mim o interesse pela clínica de ruminantes, pela orientação durante o mestrado e pela amizade de lá até esse momento.

À Prof. Dr. Maria Claudia Araripe Sucupira (Macau) pela sensibilidade e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica: Prof. Dra. Viviani Gomes, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Prof. Dra. Alice Della Libera, Prof. Dra. Mitika Hagiwara, Prof. Dra. Lilian Gregory, Prof. Dr. Marcia Mery, Prof. Dra. Silvia Ricci, Prof. Dra. Carlos Eduardo Larson, Prof. Dra. Marcia Gomes, Prof. Dr. Marcio Bruneto pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados, cada disciplina foi de extrema importância para minha formação.

Aos colegas de pós-graduação: Benesetes (Carolina Shecara, Juliana Bombardelli, Gabriela Reis, Elisa Weiss e Carolina Harumi), Equipe Gregory (Enoch Meira Júnior, Eduardo Marques, Mario Reyes, Bruno Leonardo e Natalia Gaeta), Equipe Gomes (Camila Costa, Silvia Novo, Cinthia, Vinicius Baldacim, Bruno Toledo, Camila Martin, Jean Ramos, Karen Nascimento e Natalia Sobreira), Equipe Farofa (Ronaldo Gargano, Carol dos Anjos, Bruna Stanigher e Fabio Sellera), equipe Sucupira (Priscila Marques, Aline Morgado, Marcela Romanini e Debora Carvalho) e equipe Della Libera (Camila Freitas, Kamila Reis e Rodrigo Malzone) muito obrigada pelo bom convívio durante essa fase, muito gratificante conhecer pessoas tão enriquecedoras.

As minhas queridas amigas Juliana Santos e Juliana Silva, por todo o companherismo e ajuda.

Aos queridos Demetrio Godoy, Pedro Rubens, Adriano e Aurelio pela amizade.

Aos amigos de Pirassununga por terem tornado esta época inesquecível: Rafael Teixeira, Vicente Buarque, Nara Consolo, Thiago Del Valle, Elissandra Zilio, amigos da Hardroça e Piramodel

À FAPESP pela concessão de bolsa de doutorado (FAPESP-2014/20790-9) e pelo financiamento desse projeto de pesquisa (FAPESP-2014/23547-8).

A toda as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

E principalmente a todos os bovinos, que foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delimitação da área retangular, compreendendo a região da pele, banda coronária e estojo córneo para a mensuração da temperatura média de cada dígito.....	42
Figura 2. Sistema de aquisição de sinais utilizado para a avaliação da distribuição de peso...	44
Figura 3. pH ruminal dos pilotos I e II.	49
Figura 4. pH sanguíneo dos pilotos I e II.	50
Figura 5. Correlações entre o pH ruminal e o pH sanguíneo dos animais do grupo medicado e não medicado.....	51
Figura 6. Correlações entre a diferença da osmolaridade sanguínea entre o tempo basal e a 12 ^a h (mOsm/L) e o pH sanguíneo dos animais do grupo medicado e não medicado.	52
Figura 7.- Temperatura retal (° C) dos bovinos do grupo não medicado e medicado após a indução da acidose láctica ruminal por oligofrutose.	64
Figura 8.- Porcentagem de animais com movimentação ruminal no Grupo Medicado e Não Medicado.	64
Figura 9 - Porcentagem de animais com diarreia no Grupo Medicado e Não Medicado.....	65
Figura 10.- A- Termografia do membro torácico esquerdo no momento basal; B-Membro torácico esquerdo do mesmo animal após a indução da laminite. Observar aumento da área branca na região da banda coronária (seta), indicativa de maior temperatura.....	69
Figura 11.- Distribuição de peso dos membros anteriores e posteriores esquerdo e direito no momento basal.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Media e desvio padrão das variáveis ruminais de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda por sobrecarga de oligofrutose.	53
Tabela 2 - Media e desvio padrão das variáveis ruminais de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).	54
Tabela 3.- Coeficientes de correlação entre as variáveis ruminais dos animais submetidos à indução da acidose láctica ruminal por oligofrutose.	55
Tabela 4.- Media e desvio padrão das variáveis sanguíneas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda por sobrecarga de oligofrutose.	56
Tabela 5.- Media e desvio padrão das variáveis séricas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).	57
Tabela 6.- Media e desvio padrão das variáveis hematológicas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).	58
Tabela 7 - Media e desvio padrão das variáveis hematológicas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).	59
Tabela 8 - Media e desvio padrão das variáveis hemogasométricas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).	60
Tabela 9.- Media e desvio padrão das variáveis hemogasométricas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).	61
Tabela 10.- Media e desvio padrão das variáveis eletrolíticas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).	62
Tabela 11.- Media e desvio padrão das variáveis eletrolíticas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).	62
Tabela 12.- Media e desvio das variáveis clínicas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).	63
Tabela 13. Manifestações clínicas dos bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda nos grupos medicados (M) e não medicados (NM).	65

Tabela 14.- Media e desvio padrão das variáveis fecais e urinárias de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).....	66
Tabela 15.- Número de membros claudicantes identificado pela filmagem após a indução da acidose láctica ruminal.	68
Tabela 16.- Media, desvio padrão e coeficiente de variação da temperatura media (° C) dos dígitos anteriores laterais e mediais de bovinos antes e após a indução de laminite por acidose aguda.....	69
Tabela 17.- Media e desvio padrão da distribuição de peso (%) dos mesmos membros afetados no momento basal e após a indução de laminite por acidose aguda.....	70
Tabela 18.- Media e desvio padrão da distribuição de peso (%) dos membros afetados e de seu contralateral não afetado de bovinos após a indução de laminite por acidose aguda.....	71
Tabela 19.- Índices calculados para a comparação dos testes diagnósticos utilizados para o diagnóstico de laminite nos bovinos após a acidose ruminal.	73
Tabela 20.- Media e desvio padrão da temperatura retal (° C) dos bovinos após o tratamento com AINEs do grupo Controle, Flunixin, Cetoprofeno e Meloxicam	74
Tabela 21.- Porcentagem de bovinos com sensibilidade nos dígitos anteriores após o tratamento com AINEs dos grupos Controle, Flunixin, Cetoprofeno e Meloxicam.	75
Tabela 22.- Porcentagem de bovinos com escore de claudicação maior ou igual a dois nos grupos Controle, Flunixin, Cetoprofeno e Meloxicam.	75
Tabela 23.- Porcentagem de bovinos com modificação na distribuição de peso após os tratamentos com AINEs segundo o teste de plataforma de força, de acordo com os conceitos de Neveux et al. (2006).	76
Tabela 24.- Media e desvio padrão da concentração de cortisol (nmol/L) dos grupos Controle, Flunixin, Cetoprofeno e Meloxicam, após a indução da laminite.	77
Tabela 25.- Mediana em horas do retorno a alimentação/ruminação e do estado mental nos grupos estudados.	77
Tabela 26.- Concentração de pepsinogênio sérico (U/Tirosina) dos grupos Controle, Flunixin, Cetoprofeno e Meloxicam.	78

RESUMO

SOUSA, R. S. Avaliação de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento da laminite asséptica aguda decorrente de acidose ruminal por oligofrutose em bovinos [Evaluation of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of aseptic acute laminitis caused by rumen acidosis after oligofructose overload in cattle]. 2017 114p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Objetivou-se avaliar as alterações ruminais e sistêmicas da indução de acidose ruminal e laminite em zebuínos por meio do oferecimento de oligofrutose bem como caracterizar o quadro de laminite, comparar métodos diagnósticos e avaliar a eficácia entre tratamentos com três anti-inflamatórios não esteróides (AINEs). Foram utilizadas 29 novilhas Nelore, providas de cânula ruminal e pesando $474,5 \pm 58,5$ kg. A indução iniciou-se com a administração intraruminal de 0,765 g/kg de oligofrutose duas vezes ao dia por três dias consecutivos, seguida de dose única de 10,71g/kg de oligofrutose administrada 72 horas após o início da indução. Durante o período de indução os animais foram submetidos a exame clínico e coleta de sangue e fluido ruminal diariamente e após a dose maior foram avaliados a cada seis horas (durante as 24 horas iniciais) e a cada 12 horas (até 72 horas pós-indução). Duas novilhas não apresentaram quadro de laminite e foram descartadas. Quase metade dos animais (48,1%) teve que ser tratada com bicarbonato e solução salina para correção da acidose metabólica e desidratação. Devido a este tratamento os animais foram analisados em grupos medicado (n=13) e não medicado (n=14). Durante o período de avaliação pós-indução o diagnóstico da laminite foi confirmado após duas respostas positivas ao teste de sensibilidade dolorosa e escore de locomoção. As novilhas com laminite foram alocadas aleatoriamente em quatro grupos que receberam por três dias consecutivos dose diária (endovenosa) dos seguintes medicamentos: Controle (8 mL solução salina isotônica; n=6); Flunixin meglumine (1,1 mg/kg; n=7); Cetoprofeno (3 mg/kg; n=7) e Meloxicam (0,5 mg/kg; n=7). Após o início do tratamento com AINEs os animais foram avaliados a cada 12 horas durante 96 horas. A fermentação máxima da oligofrutose ocorreu entre a 6^a e a 12^a h pós-indução com destacado acúmulo de ácido láctico, intensa diminuição da anaerobiose e aumento temporário na osmolaridade ruminal. No grupo medicado existiu uma correlação positiva entre o pH ruminal e o pH sanguíneo ($r = 0,90$; $P = 0,0040$), e uma correlação negativa entre o pH sanguíneo e a

osmolaridade sanguínea ($r = -0,69$; $P = 0,0090$) no auge da fermentação ruminal. Ambos os grupos tiveram uma febrícula efêmera e compensação respiratória frente à acidose sistêmica. A maioria dos animais desenvolveu laminite da 24^a h a 72^a h em dígitos de dois membros e uma pequena porcentagem (29,6%) polisinovite nas articulações tarsocrurais. Empregando-se a sensibilidade dolorosa como padrão ouro no diagnóstico o melhor método foi o de escore de locomoção, seguido da plataforma de força e termografia infravermelha. Porém, a plataforma de força não foi sensível para analisar a evolução do tratamento com AINEs dos animais laminíticos. Os três AINEs reduziram semelhantemente o cortisol em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) e não provocaram danos na mucosa abomasal. O meloxicam foi bastante eficaz na diminuição de sensibilidade podal, melhorando da mesma forma que o cetoprofeno o escore de locomoção. Estes dois medicamentos estimularam o retorno do apetite e a melhora da atitude. Deve-se incluir no tratamento da laminite asséptica algum AINE, dando-se preferência ao meloxicam, seguido do cetoprofeno.

Palavras-chave: rúmen, diagnóstico, dor, analgesia

ABSTRACT

SOUSA, R. S. Evaluation of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of aseptic acute laminitis caused by rumen acidosis after oligofructose overload in cattle [Avaliação de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento da laminite asséptica aguda decorrente de acidose ruminal por oligofrutose em bovinos] 2017. 114p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

This study aimed to evaluate ruminal and systemic alterations of laminitis and ruminal acidosis oligofructose-induced in Zebu cattle; characterize laminitis clinical picture and compare methods of diagnostic; and to evaluate the treatment efficacy between three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Twenty-nine rumen-cannulated Nelore heifers weighing 474.5 ± 58.5 kg were used. Induction was initiated with intraruminal administration of 0.765 g/kg oligofructose twice a day for three consecutive days, followed by single dose of 10.71 g/kg oligofructose administered 72 hours after beginning of induction. During the induction period the animals underwent clinical examination, blood and ruminal fluid collection daily and after induction were evaluated every 6 hours (during the initial 24 hours) and every 12 hours (up to 72 hours post-induction). Two heifers that did not present laminitis were discarded. Almost half of the animals (48.1%) had to be treated with bicarbonate and saline for correction of metabolic acidosis and dehydration. Due to this treatment the animals were analyzed in groups medicated (n=13) and unmedicated (n=14). After induction, the diagnosis of laminitis was confirmed after two positive responses to the pain sensitivity and locomotion score tests. Heifers with laminitis were randomly assigned to four groups that received, for three consecutive days, daily doses (intravenous) of the following medications: Control (8 mL isotonic saline; n=6); Flunixin meglumine (1.1 mg/kg; n=7); Ketoprofen (3 mg/kg; n=7) and Meloxicam (0.5 mg/kg; n=7). After NSAIDs treatment the animals were evaluated every 12 hours up to 96 hours. The maximum fermentation of oligofructose occurred between the 6th and 12th hour post-induction with marked accumulation of lactic acid, intense decrease of anaerobiosis and temporary increase in ruminal osmolarity. In the medicated group, there was a positive correlation between ruminal and blood pH ($r = 0.90$; $P = 0.0040$), and a negative correlation between blood pH and blood osmolarity ($r = -0.69$; $P = 0.0090$) at the peak of ruminal fermentation. Both groups had a mild fever and respiratory

compensation due systemic acidosis. Most animals developed laminitis 24 to 72 hours after induction in digits of two limbs and a small percentage (29.6%) had polysynovite in the tarsocrural joints. Using the pain sensitivity as gold standard, the best diagnostic method was the locomotion score, followed by the force platform and infrared thermography. Notwithstanding, the force platform was not sensitive to evaluate animals during the treatment of laminitis with NSAIDs. The three NSAIDs similarly reduced cortisol in relation to control group ($P < 0.05$) and did not cause damage to the abomasal mucosa. Meloxicam was very effective in reducing hoof sensibility, improving in the same way as ketoprofen the locomotion score. These two drugs stimulated the return of appetite and improved attitude. For the treatment protocol of aseptic laminitis a NSAID should be included, with preference to meloxicam followed by ketoprofen.

Key words: rumen, diagnosis, pain, analgesia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Acidose ruminal e sua relação com a laminite	22
2.2 Métodos diagnósticos da laminite	27
2.3 Uso de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento da laminite	31
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Animais.....	36
4.2 Alimentação.....	36
4.3 Delineamento e protocolo experimental.....	36
4.3.1 Momentos de avaliação dos animais	37
4.3.2 Determinação da laminite	38
4.3.3 Exame clínico geral	40
4.3.4 Coleta de fluido ruminal	40
4.4 Termografia Infravermelha.....	42
4.5 Plataforma de força.....	43
4.5.1 Análise dos resultados das plataformas de força após a aplicação dos AINEs	44
4.6 Concentração de pepsinogênio	45
4.7 Sinais Clínicos	45
4.8 Avaliação da articulação tarsocrural.....	46
4.9 Tratamento de Suporte.....	46
4.10 Análise Estatística	46
4.10.1 Avaliação dos testes diagnósticos.....	47
5.1 ADAPTAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL	49
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ALRA POR OLIGOFRUTOSE	53
5.2.1 Comportamento das variáveis ruminais	53
5.2.3 Comportamento das variáveis hematológicas	57
5.2.4 Comportamento das variáveis hemogasométricas.....	59
5.2.5 Comportamento das variáveis eletrolíticas.....	61
5.2.6 Comportamento das variáveis clínicas	63
5.2.7 Comportamento das variáveis fecais e urinárias	66

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO QUADRO DE LAMINITE	67
5.3.1 Frequência da laminite por meio de pinçamento	67
5.3.2 Escore de locomoção	67
5.3.4 Plataformas de força	69
5.3.5 Polisinovite	71
5.4 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	72
5.4.1 Sensibilidade e escore de locomoção	72
5.4.2 Sensibilidade e termografia infravermelha	72
5.4.3 Sensibilidade e plataforma de força	72
5.4.4 Escore de locomoção e plataforma de força	73
5.5 AVALIAÇÃO DOS AINEs NO TRATAMENTO DA LAMINITE	74
5.5.1 Temperatura Retal	74
5.5.2 Teste de sensibilidade	74
5.5.4 Plataforma de força	76
5.5.6 Retorno da alimentação, ruminação e da normalização do estado mental	77
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	99
8. REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção tanto de gado de leite como de corte têm empregado altas quantidades de concentrados na dieta. Embora esses alimentos aumentem a produtividade geram também, se mal empregados, problemas digestivos, como as acidoses ruminais, meteorismo por grãos e enfermidades locomotoras, com destaque para as laminites (BARRÊTO JÚNIOR et al., 2008; ORTOLANI et al., 2010).

A intensa fermentação ruminal de carboidratos solúveis, presentes nos grãos ou rações, pode gerar excesso de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), provocando acidose por AGCC nos casos mais brandos, e ácido láctico nos quadros mais graves. Essas condições são acompanhadas de diminuição do pH ruminal, aumento de osmolaridade no conteúdo ruminal, lesão na parede deste órgão e morte de bactérias e protozoários ruminais, gerando grande quantidade de antígenos, os quais podem ser absorvidos levando ao desenvolvimento de processos inflamatórios em outras regiões do organismo (NOCEK, 1997; NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007; REIS et al., 2014).

Em amplo levantamento do manejo de gado confinado no Brasil, Millen et al. (2009) constataram que a laminite representa, de acordo com 12% dos entrevistados, a terceira principal enfermidade nos bovinos em terminação, depois do complexo respiratório e a acidose ruminal. Nesse levantamento, ficou evidente que erros de manejo nos confinamentos consultados predispunham o surgimento de transtornos digestivos, pois muitos confinadores empregavam quantidades exageradas de concentrados energéticos na dieta sem uma previa adaptação.

A patogenia da laminite ainda é não perfeitamente esclarecida. Várias teorias e hipóteses tentam explicar a origem da doença. A mais aceita sugere que a absorção de endotoxinas, provenientes de antígenos oriundos de bactérias ruminais mortas, poderiam ativar mecanismos inflamatórios, pela liberação de fatores quimiotáticos levando a migração de neutrófilos, ativação de metaloproteinases e cicloxigenases inflamatórias nas laminae do casco. As cicloxigenases e lipoxigenases produzem uma reação em cascata que culmina com a liberação de prostaglandinas e substâncias vasoativas que mediam a reação inflamatória (GREENNOUGH, 2007; YAN et al., 2004; BLIKSLAGER et al., 2006; CONCHA et al., 2014).

O tratamento das laminites assépticas baseia-se no uso de medicamentos que diminuem a reação inflamatória em cadeia, desencadeada nas regiões podais. Dentre os medicamentos

empregados os autores são unânimes em prescrever drogas anti-inflamatórias. Os protocolos de tratamentos das laminites com AINEs são variáveis de acordo com a intensidade do problema e com o curso da doença, sendo recomendadas múltiplas aplicações no decorrer de pelo menos três dias do diagnóstico da enfermidade (NICOLETTI, 2004; ANDERSON; MUIR, 2005).

Os principais efeitos colaterais dos AINEs estão centrados no tipo de inibição exercida sobre as isoformas das cicloxigenases (COX) efetuada por cada medicamento. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, principalmente no trato gastrointestinal, rins e plaquetas, assim AINES que inibem mais essa enzima podem causar efeitos ulcerativos e nefrotóxicos, enquanto a COX-2 é uma enzima expressa principalmente em tecidos inflamados, sendo a inibição seletiva dessa enzima um importante diferencial na escolha do AINE a ser utilizado, reduzindo os riscos de efeitos adversos (LEE et al., 2004; ADEGBOYEGA; OLODADE, 2004).

O flunixin meglumine é utilizado rotineiramente no tratamento dos processos inflamatórios de bovinos, no entanto a sua inibição de COX-1 é alta, indicando a ação pouca seletiva desse fármaco, o que pode trazer efeitos colaterais quando da sua utilização, embora seja um AINE de baixo custo quando comparado ao cetoprofeno e ao meloxicam (MICILETTA et al., 2013). Já o cetoprofeno é comumente utilizado no tratamento da laminite em vacas leiteiras, devido à vantagem de não deixar resíduos no leite e na carne, além de possuir boa eficácia analgésica, ação anti-bradicinina e anti-pirética, no entanto assim como o flunixin, ele é considerado um anti-inflamatório pouco seletivo, atuando nas COX 1 e 2 (WILLIAMS; UPTON, 1988; WHAY et al., 2005).

Embora o meloxicam não esteja entre os fármacos mais utilizados em bovinos no Brasil, este vem ganhando destaque no tratamento de diversos processos inflamatórios, devido ao seu longo período de ação, efeito analgésico, antipirético e principalmente pela ação seletiva sobre COX-2 (HAWKEY et al., 1998; COETZEE et al., 2009).

Devido à ação seletiva do meloxicam e a eficiência demonstrada no tratamento de diversos processos inflamatórios e dolorosos, hipotetizamos que este medicamento possa ter melhor ação no tratamento da laminite causada pela acidose láctica ruminal aguda (ALRA), com a possibilidade de causar menor quantidade de efeitos colaterais, que os AINES utilizados mais comumente na clínica de bovinos, o flunixin meglumine e o cetoprofeno.

Devido a complexidade do assunto o mesmo será melhor apresentado e discutido no próximo capítulo de revisão de literatura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Acidose ruminal e sua relação com a laminite

Os ruminantes possuem características distintas dos monogástricos por necessitarem da fermentação anaeróbica ruminal para gerar energia e proteína metabolizável nas formas de AGCC e proteína microbiana (ASCHENBACH et al., 2011).

Nesse contexto, o rúmen pode ser considerado um ambiente simbiótico, constituído por bactérias, protozoários e fungos, os quais propiciam aos ruminantes a capacidade de digerir carboidratos solúveis e complexos como a celulose e hemicelulose, e recebem em contrapartida um ambiente rico em nutrientes e condições favoráveis para o desenvolvimento (NAGAJARA; TITGEMEYER, 2007). Esses micro-organismos estão adaptados a um ambiente anaeróbico e com uma faixa de pH ruminal entre 5,7-6,5, onde ocorre a degradação eficiente da celulose e proteínas. No entanto, essa simbiose harmônica pode ser modificada devido a alterações que promovam mudanças no pH do conteúdo ruminal, levando a sobreposição de uma população de micro-organismo em detrimento de outra (MOURINO et al., 2001).

Dentre as alterações nos valores de pH ruminal a acidose ruminal é um dos distúrbios metabólicos mais estudado atualmente, devido ao desafio entre o aumento da inclusão de carboidratos na dieta objetivando maior eficiência produtiva versus a manutenção da saúde ruminal e animal. A acidose ruminal pode ocorrer sobre duas formas: subaguda ou aguda.

A acidose ruminal subaguda (ARS) ocorre quando o animal consome dieta rica em energia e pobre em carboidratos estruturais, levando a um aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente propiônico, promovendo a redução do pH ruminal para valores entre 5,1-5,8. Atualmente, considera-se que um animal tem ARS quando pH ruminal fica abaixo da faixa normal por no mínimo três horas consecutivas (DANSCHER et al., 2015). A ALRA tem como causa o consumo abrupto de grande quantidade de carboidrato solúvel, promovendo redução brusca do pH ruminal para valores inferiores a 5. Nesses casos, ocorre inicialmente aumento na produção de AGCC, promovendo redução do pH, favorecendo o crescimento de bactérias Gram positivas como a *Streptococcus bovis* que passam a produzir ácido láctico sobre duas isoformas a L e D. Embora existam no rúmen algumas bactérias lactilíticas (*Megasphaera elsdeni*, *Sellenomonas ruminatium*) que conseguem consumir o ácido láctico, com a intensa produção de lactato e a consequente

queda do pH, essas bactérias não sobrevivem (OWENS, 1998; NAGAJARA; TITGEMEYER, 2007; NAGARAJA; LECHTENBER, 2007).

Quando o pH ruminal cai para valores menores que 4,5, a população de *Streptococcus bovis* morre, e ocorre favorecimento ambiental para o crescimento populacional das leveduras (*Lactobacillus*) que passam a produzir mais lactato. O lactato na forma L é metabolizado pelo fígado na gliconeogênese, já que é a forma de lactato similar a produzida pelos músculos a partir da glicose, enquanto a forma D que representa cerca de 30-38% do lactato total se acumula no rúmen e na corrente sanguínea, já que não é produzido pelo tecido de mamíferos (OWENS et al., 1998). O aumento desses ácidos no rúmen propicia a formação de um gradiente osmótico, que direciona uma grande quantidade de líquido da circulação para esse órgão, desencadeando quadros de diarreia osmótica e desidratação (NAGARAJA; LECHTENBER, 2007).

A acidose ruminal aguda pode trazer diversas consequências para a saúde animal, devido principalmente à produção de alguns metabolitos como o ácido láctico L e D e lipopolissacarídeos (LPS) que favorecem o aparecimento de outras comorbidades.

A produção de lactato pode culminar com a ocorrência de acidose metabólica e lesões na parede do rúmen, causando ruminite. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o ácido láctico D tem efeitos deletérios sobre sistema imune, principalmente sobre os neutrófilos a primeira linha de defesa do organismo. Essas células de defesa quando são expostas a altas concentrações de lactato D (>5 mmol/L), apresentam redução na produção de espécies reativas de oxigênio que é um mecanismo essencial para que ocorra a explosão respiratória, responsável pela destruição de micro-organismos fagocitados. A expressão de L-selectinas também é diminuída, afetando o recrutamento de neutrófilos para os tecidos. Essas alterações na defesa imune inata podem tornar os animais mais susceptíveis a infecções bacterianas, sugerindo uma possível relação entre essa falha com a ocorrência de abscessos hepáticos por *Fusobacterium necrophorum* após quadros de acidose (ALARCÓN et al., 2011; CONCHA et al., 2014)

A redução abrupta do pH ruminal também promove a morte de vários micro-organismos ruminais, produzindo muitos antígenos que podem ser absorvidos, entre estes os LPS que são estruturas provenientes da parede celular das bactérias Gram negativas. Atualmente, estudos apontam que a concentração de LPS no rúmen pode aumentar em até 60%, quando ocorre o crescimento rápido da população de bactérias Gram negativas (ANDERSEN, 2003), pois para o crescimento dessas bactérias é necessários à produção de

enzimas autolíticas, que permitam as células se expandirem e crescerem, no entanto, a atividade autolítica excessiva pode conduzir a lise celular das bactérias e apoptose. Dessa forma, é importante enfatizar que o aumento inicial do LPS nos casos de acidose está ligado ao aumento inicial da população das bactérias gram negativas e posteriormente pela morte dessas devido a queda do pH ruminal (DONG et al., 2011).

O LPS e outros antígenos produzidos durante os episódios de acidose ruminal podem chegar a corrente sanguínea mais comumente por absorção intestinal. Não há evidências científicas que o LPS seja absorvido pelo rúmen em condições normais, já que esse órgão possui uma epiderme com inúmeras camadas celulares e células fortemente aderidas por junções intercelulares, no entanto a absorção pode ocorrer caso haja lesões no epitélio ruminal (KHAFIPOUR et al., 2009; GRAHAM; SIMMONS, 2005). Após a absorção intestinal as endotoxinas chegam à circulação porta, onde passam pelo fígado, podendo parte dessas endotoxinas serem eliminadas por esse órgão. Baseado, nessa premissa, animais que apresentam problemas hepáticos, como a lipidose, podem possuir menor capacidade detoxificante, sendo esta função do fígado crítica na prevenção e disseminação da resposta inflamatória induzida pela endotoxemia (ANDERSEN, 1994; ANDERSEN, 2003).

Além do LPS, acredita-se que histamina, adesinas fimbriais e toxinas termolábeis possam ser implicadas como gatilhos no desenvolvimento de vários processos inflamatórios, levando a efeitos fisiopatológicos graves como as laminites (ANDERSEN, 2003).

A laminite é considerada uma doença sistêmica com manifestação nos dígitos, na qual ocorre alterações vasculares e degenerativas do córion laminar, que podem afetar o posicionamento e mobilidade da falange digital dentro do estojo córneo (GREENNOUGH, 2007). A patologia dessa enfermidade ainda não está totalmente elucidada, pois existem muitos fatores de risco envolvidos, e os mecanismos ligando os fatores de risco e os fatores desencadeantes das lesões observadas, ainda precisam ser melhores estudados (SABES, 2013). Porém a acidose ruminal ainda é considerada o principal fator desencadeante dos quadros de laminites, devido o papel das endotoxinas (NOCEK, 1997; PLAIZIER et al., 2009).

Sistemicamente, a presença de endotoxinas na circulação leva os macrófagos a produzirem citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1, interleucina 6 e o fator de necrose tumoral (TNF). Esses mediadores estimulam a produção de proteínas de fase aguda, como a haptoglobina e proteína amiloide sérica A, proteína ligante de lipopolissacarídeos e fibrinogênio (DANSCHER et al., 2011; DONG et al., 2011). Na microcirculação dos dígitos,

essas endotoxinas promovem vasoconstrição, com aumento da pressão capilar, formação de trombos e lesão do endotélio, em decorrência ocorre extravasamento de fluido e células sanguíneas nas diversas regiões do cório digital, com aumento de pressão no interior do estojo córneo e oxigenação inadequada da derme e da epiderme viva (GREENOUGH, 2007).

A redução no aporte de oxigênio e nutrientes pode promover duas situações: irregularidade na produção de tecido córneo, com o aparecimento de lesões associada à laminite como a ulcera de sola e doença da linha branca ou necrose da derme e epiderme, com perda da funcionalidade da junção derme/epiderme e consequente separação entre a falange distal e o estojo córneo, tornando a terceira falange instável dentro do estojo córneo, podendo ocorrer rotação ou afundamento da mesma (LISCHER; OSSENT, 2002; MULLING, 2002).

Atualmente, vem sendo estudado o papel das metaloproteinases de matriz (MMPs) na gênese da laminite. As MMPs são enzimas que contém zinco em seu sítio ativo e necessitam de cálcio para estabilidade e atividade, sendo responsáveis pela degradação da matriz extracelular. As MMPs são classificadas de acordo com o substrato de ação específico: collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13); gelatinases (MMP-2 e MMP-9); estromalisinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), matrilisinas (MMP-7), metaloelastase de macrófagos (MMP-12) e metaloproteinase tipo de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-17) (SRIVASTAVA et al., 2007).

As gelatinases são as MMP atualmente ligadas a laminite, sendo identificadas as gelatinase A (MMP-2) e a B (MMP-9), essas enzimas são secretadas na forma inativa (zimogênos), e quando ativadas são capazes de degradar o colágeno tipo IV, presente na membrana basal e na matriz extracelular. Estão presente nos tecidos de animais normais, já que diversos tecidos necessitam de remodelação constante como ocorre com o casco (MUNGALL et al., 1998).

As MMP-2 e 9 podem ser secretadas pelos neutrófilos, monócitos, macrófagos e fibroblastos e também são residentes do tecido conjuntivo laminar e podem ser ativadas quando submetidos a estímulos como a presença de mediadores inflamatórios (citocinas, Fator de Necrose Tumoral – TNF α), endotoxinas, amins microbianas provenientes da descarboxilação de aminoácidos, exotoxinas bacterianas e lactato (BAILEY et al. 2004; MÜLLING; GREENOUGH, 2006). Em condições naturais a atividade dessas enzimas é regulada pelos seus inibidores de tecido (TIMPs), que impedem a ativação exacerbada dessas enzimas.

Em equinos, mediadores inflamatórios como a interleucina-1 β , interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) são capazes de ativar as MMPs, as quais passam a degradar as lamínas do casco facilitando o descolamento da terceira falange do estojo córneo (BELKNAP et al., 2007). Em equinos nos estágios iniciais da laminite ocorre migração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, para a microvasculatura devido ao efeito quimiotático da IL-8, esta migração está diretamente ligada ao aumento da forma latente da MMP-9 em animais com laminite (MUKAIKA, 2003; BLACK et al., 2006; LOFTUS et al., 2006). Estudo em ovinos, submetidos à indução de acidose ruminal aguda por sacarose, ocorreu aumento das formas pró-ativas da MMP-2 e MMP-9 em animais que apresentaram laminite aguda, indicando relação entre os mediadores inflamatórios e a secreção de MMPs (SABES, 2013).

Embora a laminite seja uma enfermidade comum nos rebanhos bovinos, ainda existem muitos pontos a serem elucidados, principalmente os referentes à fisiopatologia e aos fatores desencadeantes, assim como sobre as formas de tratamento. Um dos métodos de estudo dessa enfermidade é a indução, já que pesquisas utilizando animais naturalmente acometidos por laminite são difíceis de serem conduzidos, pois os animais normalmente apresentam enfermidades podais intercorrentes ou graus de laminites variados. Na literatura são encontrados alguns protocolos de indução de laminite, decorrentes de quadros de acidose ruminal sejam pela utilização de altas doses de açúcares como a sacarose (ORTOLANI, 1995) ou oligofrutose (THOEFNER et al., 2004; DANSCHER et al., 2009). Este tipo de metodologia facilita a uniformização dos grupos estudados já que os animais apresentam quadros de laminites decorrentes de acidoses ruminais e proporcionam avaliar os animais sobre uma mesma ótica, favorecendo a compreensão de aspectos já conhecidos, assim como de novos.

O modelo de indução utilizando sacarose apresenta alta eficiência em causar ALRA, porém a frequência do aparecimento de laminite é relativamente baixa. Reis (2011) induziu a ALRA em 18 ovinos com 15g/kg de sacarose, sendo observado cinco casos de laminite, enquanto Sabes (2011) utilizando a mesma dose diagnosticou 5 casos quando da indução de 10 ovinos. Embora tenham sido realizadas inúmeras induções em bovinos com sacarose, não há relatos da ocorrência de quadros de laminite (MARUTA, 2002a; RODRIGUES, 2009).

Atualmente, o método utilizando altas doses de oligofrutose tem ganhado destaque, pela comprovação em causar quadros de laminite aguda sendo utilizada com sucesso em equinos (10g/kg) (VAN EPS; POLLITT, 2006) e bovinos (13g/kg, 17g/kg ou 21g/kg) (THOEFNER et al., 2004). Concha et al. (2014), empregando 13g/kg de oligofrutose não

observaram nenhum sinal de laminite, enquanto Bustamante et al. (2015) obtiveram 100% de eficácia utilizando a mesma dose em seis vacas. Danscher et al. (2009) utilizando 17g/kg tiveram uma taxa de sucesso de 87,5% de casos de laminite utilizando 8 novilhas. Todos os estudos supracitados utilizaram novilhas de origem taurina de diferentes raças, nenhum estudo até o momento foi conduzido com animais zebuínos.

Em estudo desenvolvido por Maruta (2000), foi observado que animais taurinos e zebuínos apresentam respostas diferentes quando são submetidos a quadros de acidose ruminal por sacarose. Os taurinos são mais suscetíveis à desidratação e a acidose metabólica (MARUTA; ORTOLANI, 2002a), enquanto os zebuínos apresentam maior depressão, caracterizada por apatia intensa, continuo decúbito esternal, menor resposta a estímulos sonoros e tácteis e relutância para levantar e locomover-se (ORTOLANI et al., 2010). No entanto, não existem evidências se a acidose ruminal provocada pela oligofrutose mostra-se diferente da causada pela sacarose em zebuínos, já que a estrutura da oligofrutose é diferente da sacarose.

O amido e as frutanas são as formas mais abundante de carboidratos não-estruturais encontrado nas pastagens, o amido consiste em um polímero de glicose, enquanto as frutanas são polímeros de frutose (VAN EPS; POLLITT, 2006). A oligofrutose é uma frutana que pode ser encontra em gramíneas temperadas, esse açúcar se acumula mais em períodos críticos de frio ou calor, quando as plantas diminuem o crescimento e consequentemente a utilização de carboidratos (LONGLAND; CAIRNS, 2000).

A oligofrutose utilizada nos estudos de indução é obtida pela hidrolização parcial da inulina proveniente da raiz de chicória (*Chicorium intybus*), sendo o produto constituído de uma molécula de sacarose ligada de duas a 10 cadeias de frutose (VAN EPS; POLLITT, 2006). No momento, embora seja comprovada a eficácia desse açúcar em provocar quadros de laminite, os mecanismos ainda não estão elucidados.

2.2 Métodos diagnósticos da laminite

Cerca de 90% dos casos de claudicação em bovinos estão associados a afecções ao casco e em menor grau ligadas a regiões mais altas dos membros, sendo que cerca de 90% das claudicações ocorrem nos membros posteriores e que 70-90% desses casos estão ligadas ao dígito lateral, enquanto nos membros anteriores os dígitos mediais são mais acometidos (SHEARER; VAN AMSTEL, 2003; SHEARER et al., 2012).

Como já mencionado anteriormente apesar dos problemas locomotores estarem associados à nutrição, a constatação de que maior número dos casos de claudicação afeta frequentemente determinado dígito, é contraditória quando se confronta com a afirmação de que a laminite é decorrente de alterações sistêmicas, dessa forma esperar-se-ia que todos os dígitos fossem igualmente afetados e não um membro especificamente (SHEARER et al., 2012). Embora esta indagação seja pertinente para mostrar que a claudicação é um assunto complexo e que possui outros fatores envolvidos (manejo, piso, alterações hormonais, etc), é importante mencionar que não há estudos que comprovem que todos os dígitos e membros são acometidos nos casos das alterações sistêmicas decorrentes da ALRA.

A identificação da claudicação em bovinos leiteiros ou de corte pode ser diagnóstica por atribuição de escores à marcha, pelo exame clínico e pela utilização de tecnologias mais recentes como a termografia, plataformas de força, entre outros métodos. Sendo importante levar em consideração na escolha desses artifícios o custo e a eficiência em identificar os animais com problemas (SHEARER et al., 2013).

O escore de locomoção é uma medida subjetiva que tem se mostrado eficiente no diagnóstico de claudicação. Por ser um método barato e que não precisa do contato direto com o animal, vem sendo utilizado na avaliação do grau de claudicação de rebanhos leiteiros e de corte, como método de triagem para um posterior exame clínico mais refinado e individual, já que este método associa alterações da marcha com possíveis lesões no casco (FLOWER; WEARY, 2006).

No entanto, tratando-se de rebanhos esse método é considerado demorado, laborioso e não possui padrões de identificação claros, além de depender da habilidade e experiência do observador em detectar alterações sutis de locomoção (WINCKLER; WILLEN, 2001).

A experiência do observador assim como o método de avaliação, se ao vivo ou por filmagem são pontos importantes a serem considerados quando da avaliação da locomoção. O' Callaghan et al. (2003) observaram que quando um único observador atribuiu escores para as mesmas vacas em três dias consecutivos, apenas 56% dos escores foram iguais e quando avaliou-se os escores entre dois observadores a consistência foi de apenas 37%, enquanto Danscher et al. (2009) mostraram que os escores de locomoção atribuídos por observadores ao vivo foi diferente do dado quando se utilizou a filmagem, esta última teve vantagem, devido a possibilidade do animal ser avaliado varias vezes, permitindo verificar detalhes mais sutis. Sendo importante também levar em consideração ainda que o escore de locomoção pode

não ser suficientemente sensível para todas as lesões do casco, já que algumas injúrias só são detectadas por esse método quando há maior severidade (TADICH et al., 2010).

Outro método utilizado na identificação da laminite é o exame clínico, o qual é a melhor ferramenta tratando-se do indivíduo, porém a possibilidade de examinar todos os animais de um confinamento leiteiro ou de corte é pouco viável. Sendo necessário utilizar métodos de triagem indiretos como a avaliação do escore de locomoção, ou outro método, para a identificação dos indivíduos passíveis de estarem doentes. O ideal para a avaliação dos cascos é a suspensão dos membros, com posterior limpeza e avaliação de cada dígito à procura de: lesão, sensibilidade, aumento de temperatura na área do casco ou banda coronária e áreas edemaciada/ avermelhada nos tecidos moles adjacentes ao casco (RADOSTITS et al., 2007; SHEARER et al., 2013).

O exame de sensibilidade do casco tem sido utilizado com sucesso na identificação da dor decorrente de problemas podais, no entanto, embora seja comprovada a sua eficiência é importante enfatizar que esse teste sofre influência da força aplicada ao casco, da umidade e da espessura do casco (DANSCHER et al., 2009). Esse método mostrou-se eficiente na identificação da laminite por sobrecarga de oligofrutose (THOEFNER et al., 2004; DANSCHER et al., 2009; DANSCHER et al., 2010).

A termografia infravermelha e as plataformas de força vêm sendo utilizadas como novas perspectivas no auxílio ao diagnóstico das laminites em rebanhos leiteiros.

A termografia infravermelha é um método de avaliação não invasivo que produz uma representação pictórica da temperatura superficial de um objeto, onde o gradiente de cor reflete a diferença do calor emitido (TURNER et al., 1986). O calor é um dos sinais cardinais da inflamação e seu aumento é consequência da elevação do metabolismo e fluxo sanguíneo na área afetada, assim o monitoramento de mudanças de temperaturas em áreas como o casco pode identificar o desenvolvimento de inflamação (STOCK et al., 2012).

Em bovinos leiteiros hípidos, tem sido observada diferença de temperatura entre as patas anteriores e posteriores e entre os dígitos laterais e mediais destes. Os cascos traseiros são mais quentes, e os dígitos laterais desse membro também, enquanto que nos dígitos anteriores não há diferença de temperatura (OKADA et al., 2013; RAINWATER-LOVETT et al., 2009; NIKKHAH et al., 2005).

A temperatura do casco normalmente é medida na banda coronária e na pele adjacente, isso porque a banda coronária possui maior vascularização e reflete a circulação sanguínea da pata, assim qualquer alteração inflamatória ou lesão pode ser identificada pelo aumento da

temperatura (NIKKHAH et al., 2005; GLOSTER et al., 2011; ALSAOD & BÜSCHER, 2012).

Na avaliação dos cascos as imagens termográficas são fotografadas de diferentes posições como palmaro-dorsal, plantar ou lateral (STOCK et al., 2012; ALSAOD; BÜSCHER; 2012; RODRIGUES, 2013; ORMAN; ENDRES, 2016). Essas imagens posteriormente podem ser avaliadas por software estabelecendo uma área específica para a mensuração da temperatura média, mínima e máxima.

Em bovinos leiteiros foi realizado estudo para tentar diferenciar a temperatura de lesões como a úlcera de sola, dermatite digital e doença da linha branca, no entanto não foi possível diferenciar as lesões, mas, mostrou que temperaturas acima de 27° C estavam associadas a lesões nos cascos (STOKES et al., 2012), enquanto Main et al. (2012) estabeleceram uma temperatura acima de 25,25° C como indicativa de lesões. Alssaod & Büscher (2012) comparando cascos saudáveis e doentes detectaram que uma diferença maior que 0,64° C era indicativa de lesão.

Outro ponto passível de ser explorado no diagnóstico da laminite é a distribuição de peso entre os membros. Sabe-se que bovinos saudáveis distribuem o peso do corpo sobre os quatro membros de forma diferente, cerca 60% do peso é direcionado para os membros anteriores enquanto 40% para os membros posteriores. Embora menor peso seja atribuído aos membros posteriores, esses são mais acometidos por claudicações. Isso se deve em parte a forma como os membros se inserem ao corpo do animal. Os membros anteriores se inserem ao corpo por meio de ligamentos e tendões, ocorrendo uma maior tendência de amortecimento do impacto de peso sobre os pés, principalmente sobre o coxim plantar, enquanto os membros posteriores se inserem ao corpo pela articulação coxo-femoral, estrutura rígida incapaz de diminuir impactos (SHEARER; VAN AMSTEL, 2003). Ainda devendo-se levar em consideração, que quando os bovinos se movimentam tendem a distribuir o peso para as úngulas laterais do membro pélvico, devido à oscilação na região pélvica de aproximadamente 2,5 cm para cada lado (FERREIRA et al., 2005).

As plataformas de força foram desenvolvidas para avaliar a distribuição de peso entre os membros, já que animais que possuem lesões em determinado membro tendem a desviar a carga de peso para o membro contralateral, se a enfermidade não for tratada e a claudicação permanecer o membro contralateral pode ser afetado secundariamente (RAJKONDAWAR, 2002).

Estudos têm mostrado que membros claudicantes afetados por diferentes enfermidades podais podem ser identificados pelo padrão de distribuição de peso, devido à característica já mencionada anteriormente, porém quando se tem mais de um membro lesionado a identificação fica menos eficiente. Sendo mostrado também que os bovinos têm maior habilidade de transferir peso dos membros dianteiros para os traseiros, enquanto o inverso não ocorre em casos de lesões (NEVEUX et al., 2006; CHAPINAL et al. 2010).

Neuveux et al. (2006) observaram que animais com um membro anterior afetado, tendem a distribuir a carga de peso para o membro contralateral e o seu ipsilateral posterior, porém quando um membro posterior está injuriado o peso é distribuído apenas para o seu contralateral. Fato similar ocorre quando dois membros anteriores estão afetados, a distribuição de carga é deslocada para os membros traseiros, porém o inverso não ocorre.

Outro fator importante que se deve levar em consideração é que esse equipamento possui a capacidade de fazer inúmeras leituras ao longo de um determinado tempo predefinido pelo manipulador, isso é importante porque durante a realização dos exames os animais podem trocar de apoio, sem necessariamente estar lesionado ou devido à incapacidade de suportar o peso quando dois ou mais membros estão enfermos (RUSHEN et al., 2006; CHAPINAL et al., 2009).

Independentemente do método utilizado para a identificação da laminite é essencial que o diagnóstico seja precoce para reduzir a prevalência e custos econômicos decorrentes da diminuição da produtividade e com gasto com medicamentos (NORDLUND et al., 2004).

2.3 Uso de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento da laminite

O componente nutricional ainda é o fator mais creditado no desenvolvimento da laminite e sua patologia está principalmente ligada a distúrbios hemodinâmicos da vasculatura digital e ativação de enzimas degradadoras de colágeno, porém mais recentemente a inflamação local tem ganhado destaque, devido a evidências da expressão de substâncias pró-inflamatórias como a interleucina-1 β e interleucina-6 pelas células da microvasculatura do dígito e pela expressão da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) na musculatura lisa das vênulas, arteríolas e células endoteliais das laminas do casco (WAGUESPACK et al., 2004; BLIKSLAGER et al., 2006).

A ativação das ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases desempenham papel central no desenvolvimento da inflamação. Essas enzimas são capazes de degradar o ácido aracdônico proveniente das membranas celulares e produzir diversas substâncias pró-inflamatórias.

Atualmente são conhecidas três isoformas de cicloxigenases COX-1, COX-2 e COX-3. Tanto a COX-1 como a COX-2 participam da resposta inflamatória, estando a COX-1 envolvida nos estágios iniciais do processo contribuído com a produção de prostaglandinas e a COX-2 na regulação mais tardia da inflamação (SVENSSON; YAKSH, 2002). Porém, é importante enfatizar que a COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, principalmente no trato gastrointestinal, rins e plaquetas, enquanto a COX-2 é uma enzima expressa principalmente em tecidos inflamados, mas também é produzida constitutivamente pelos rins (LEE et al., 2004; ADEGBOYEGA; OLODADE, 2004). A função da COX-3 ainda não está bem definida, já que pesquisas apontam que esta não é uma enzima funcional (DAVIES et al., 2004; SNIPES et al., 2005).

A degradação do ácido aracdônico pela COX-1 e COX-2 produz substâncias como as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, enquanto a degradação pela LOX produz leucotrienos e lipoxinas. As prostaglandinas são substâncias envolvidas nos efeitos vasculares da inflamação que incluem a vasodilatação e edema, sendo também responsáveis pela dor e febre. Enquanto os leucotrienos estão implicados na fase celular da inflamação, favorecendo a permeabilidade vascular e funcionando como potentes quimiotáticos para neutrófilos (TASAKA, 2017).

A expressão de COX-2 no tecido laminar está diretamente ligada com a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), que promove aumento da pressão pós-capilar provocando edema dos tecidos periféricos aos vasos (ALLEN et al., 1990). As prostaglandinas também podem estar envolvidas no aumento da expressão e ativação das metaloproteinases de matrix (RUPP et al., 2004).

Os principais efeitos colaterais dos AINEs estão centrados no tipo de inibição exercida sobre as isoformas das cicloxigenases efetuada por cada medicamento. Os AINES que inibem mais a COX-1 podem causar efeitos ulcerativos, nefrotóxicos e distúrbios de coagulação, enquanto a inibição seletiva preferencial da COX-2 deve ser um importante diferencial na escolha do AINE a ser utilizado no tratamento dos processos inflamatórios (TASAKA, 2017).

Em levantamento recente no Brasil com oitocentos veterinários, demonstrou-se que dentre os AINES atualmente utilizados na clínica de bovinos para o tratamento dos processos inflamatórios e da dor destaca-se o flunixin meglumine, o cetoprofeno e em menor escala o

meloxicam, e que embora os profissionais tenham conhecimento dos principais efeitos colaterais relacionados ao trato gastrointestinal e a nefrotoxicidade destes fármacos, o valor do medicamento ainda é o fator preponderante na escolha do AINE (LORENA et al., 2013).

Os AINEs são na sua grande maioria ácidos fracos, possuindo como característica grande afinidade por locais inflamados. Locais estes que normalmente apresentam pH baixo favorecendo a maior concentração desses fármacos, porém a excreção desses medicamentos pode ser potencializada quando da alcalinização da urina, fato importante nos casos de superdosagens e intoxicações (TASAKA, 2017).

O flunixin meglumine é um AINE derivado do ácido aminonicotínico que possui uma porcentagem de inibição de COX-1 de cerca de 57,6% enquanto a de COX-2 é de 79,8% indicando a ação pouca seletiva desse fármaco, o que pode trazer efeitos colaterais quando da sua utilização, embora seja um AINE considerado de baixo custo (MICILETTA et al., 2013). O flunixin é indicado para o controle da febre associada a doenças respiratórias, mastites, e a inflamação associada à endotoxemia (STOCKER; COETZEE, 2015). Em equinos o flunixin é indicado no tratamento das alterações muscoesqueléticas e de cólicas devido a sua grande ação analgésica e anti-inflamatória nessa espécie.

Em bovinos a meia vida do flunixin é de cerca de 4 a 8 horas e mostrou-se eficiente na analgesia de bovinos tanto com claudicação natural como decorrente da indução com anfotericina B (SHULTZ et al., 2011, CHAPINAL et al., 2010). Animais com claudicação induzida e tratados com 1mg/kg de flunixin diminuíram as concentrações de cortisol e permaneceram menor tempo deitados que os animais controle (SHULTZ et al., 2011), sendo observado também que animais claudicantes que receberam flunixin (2,2 mg/kg) antes do casqueamento corretivo gastaram menor tempo deitado (CHAPINAL et al., 2010).

O cetoprofeno é um derivado do ácido propiônico comumente utilizado no tratamento da claudicação e mastites em vacas leiteiras, devido à vantagem de não deixar resíduos no leite e na carne, além de possuir boa eficácia analgésica, potente ação anti-bradicinina, anti-pirética e na redução de edema. Esse AINE é um inibidor de dupla ação por agir sobre as COXs e LOX, bloqueando assim a resposta vascular e celular. (WILLIAMS; UPTON, 1988; WHAY et al., 2005).

O cetoprofeno tem ação sobre a COX-1 e COX-2 e uma meia vida curta de 0,42h, porém é considerado menos ulcerogênico que o flunixin. Esse medicamento é utilizado no tratamento das alterações musculoesqueléticas e cólicas em equinos (TASAKA, 2017).

O cetoprofeno na dose de 3mg/kg melhorou a claudicação natural de bovinos leiteiros diminuindo o escore de locomoção, além de aumentar o limiar de nocicepção de bovinos tratados por três dias em comparação com o controle, mostrando que o cetoprofeno pode aliviar o desenvolvimento da hiperalgesia associada à claudicação (WHAY et al., 2005).

O meloxicam é um AINE do grupo dos oxicams, possui um longo período de ação (22 ± 3 horas), efeito analgésico, antipirético e principalmente ação seletiva preferencial sobre a COX-2 (HAWKEY et al., 1998; COETZEE et al., 2009). Além destes efeitos, este medicamento tem mostrado estimular a proliferação de células *natural killer* (NK), isso ocorre porque o meloxicam inibe a síntese de prostaglandina 2 (PG₂) que é um forte antagonista na proliferação dessas células (MASLANKA, 2013).

A formulação oral do meloxicam para bovinos, ainda não está disponível no Brasil, porém estudos têm mostrado que a meia vida (20-43 horas) e a biodisponibilidade dessa formulação é maior que a injetável. A administração de 0,5mg/kg de meloxicam oral durante quatro dias amenizou a dor e aumentou o número de passos de animais com claudicação induzida por anfotericina B. Nesse estudo também foi observada uma correlação negativa entre a concentração de meloxicam no sangue e o escore de locomoção (COETZEE et al., 2014).

Embora o flunixin, cetoprofen e meloxicam tenham mostrado resultados positivos no tratamento da dor decorrente da claudicação, não há estudos comparando a eficácia dos três em um mesmo trabalho para o tratamento da laminite decorrente da indução por excesso de oligofrutose em bovinos.

3. OBJETIVOS

- Adaptar o modelo clássico de indução de laminite por meio de excesso de oligofrutose em taurinos para zebuínos;
- Acompanhar as alterações no metabolismo ruminal e as consequências sistêmicas provocadas pelo excesso de oligofrutose;
- Caracterizar o quadro de laminite e comparar métodos para seu diagnóstico;
- Avaliar a eficiência comparativa dos AINEs para o tratamento da laminite.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 29 fêmeas, com três anos de idade da raça Nelore, pesando em média $474,51 \pm 58,49$ kg. As quais passaram por período de adaptação, onde foram tratadas contra ecto e endoparasitas e vacinados contra clostridioses, seguido de reforço 30 dias após a primeira imunização. Após o período de adaptação os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de cânula ruminal de silicone e passaram por período de recuperação de 30 dias. Os bovinos foram alocados em baias individuais nas dependências do Centro de Pesquisa de Gado de Corte da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP), Campus Pirassununga.

4.2 Alimentação

Os animais receberam dieta basal calculada em 2,3% do peso vivo, composta de 60% da matéria seca de feno de capim *Coast-cross* e 40% de ração concentrada com 14% de proteína bruta, a qual foi fornecida uma vez ao dia. Os bovinos foram suplementados com 60 g de suplemento mineral comercial por dia contendo macro e microelementos e tiveram livre acesso à água.

4.3 Delineamento e protocolo experimental

Os animais foram submetidos a um delineamento inteiramente casualizado em que os bovinos foram inicialmente submetidos à indução da ALRA utilizando altas doses de oligofrutose, segundo metodologia adaptada de Thoenner et al. (2004), e após o surgimento da laminite foram aleatoriamente distribuídos nos grupos experimentais.

Para a indução da ALRA foi utilizada a dose de 15,3g/kg de oligofrutose (Beneo P95, Orafit Active Food Ingredients, Chile), tendo os animais passado por um período de adaptação onde receberam pequenas dose desse açúcar durante três dias consecutivos e no quarto a dose principal.

Nos períodos de adaptação, indução e pós-indução (período de observação) da ALRA os animais foram avaliados quanto à sensibilidade do casco através do pinçamento

(DANSCHER et al., 2009). Os bovinos foram considerados como tendo laminite quando apresentavam sensibilidade ao pinçamento em dois momentos consecutivos de avaliação. Dos 29 animais utilizados, 27 apresentaram sensibilidade ao pinçamento, os quais foram distribuídos nos quatro grupos experimentais, que receberam diferentes tratamentos para laminite aguda:

- Grupo Controle (n=6): 8,0 mL de solução salina isotônica.
- Grupo Flunixin (n=7): 1,1 mg de flunixin meglumine por kg de peso vivo.
(Desflan, Ouro Fino[®], Brasil)
- Grupo Cetoprofeno (n=7): 3,0 mg de cetoprofeno por kg de peso vivo.
(Ketofen 10%, Merial[®], Brasil)
- Grupo Meloxicam (n=7): 0,5 mg de meloxicam por kg de peso vivo.
(Maxicam 2%, Ouro Fino[®], Brasil)

Os animais tiveram a dose de cada medicamento repetida a cada 24 horas, durante três dias consecutivos, segundo preconizam as bulas dos medicamentos pelos fabricantes. Os anti-inflamatórios e a solução salina isotônica foram aplicados pela via endovenosa.

4.3.1 Momentos de avaliação dos animais

Para avaliação dos animais foram realizados exames ortopédicos, exames clínicos, coleta de sangue e do fluido ruminal nos seguintes períodos:

- Período de Adaptação: T-72h, T-48h e T-24h – 3, 2 e 1 dia antes da indução, onde os bovinos receberam, 1,53g/kg de oligofrutose por dia, dividido em duas doses de 0,765g/kg administradas pela manhã e pela tarde. A oligofrutose do período de adaptação foi diluída em 0,5 L de água morna e esta solução foi adicionada ao rúmen pela cânula ruminal.
- Período de Indução: T0 – Momento basal, imediatamente anterior ao oferecimento de 10,71g/kg de oligofrutose (dose principal). A oligofrutose foi diluída na proporção de

1L de água morna para cada 2 kg de oligofrutose, sendo a solução adicionada ao rúmen pela cânula ruminal.

- Período de Observação: Após o oferecimento da oligofrutose, os animais foram avaliados a cada 6 horas durante 24 horas (T6, T12, T18 e T24), e posteriormente por dois dias consecutivos a cada 12 horas (T36, T48, T60 e T72) para verificar o aparecimento de laminite. Sendo considerado o tempo TL, o momento em que o animal apresentou laminite.
- Período de Tratamento: Após o diagnóstico de laminite, ocorreu à alocação dos animais nos grupos e tratamento com AINE, sendo os bovinos avaliados a cada 12 horas por quatro dias nos seguintes momentos: TT12, TT24, TT32, TT48, TT60, TT72 e TT96 – 12, 24, 32, 48, 60, 72 e 96 horas após o tratamento, respectivamente.

Os animais não passaram por período de jejum durante o período de adaptação e indução, o concentrado e o volume ficaram disponíveis em todos os períodos do estudo. Foram realizadas induções simultâneas de quatro animais por vez, sendo os animais aleatoriamente distribuídos nos grupos experimentais após o aparecimento da laminite.

4.3.2 Determinação da laminite

Inicialmente foi considerado o animal apto a participar do estudo, aqueles com escore de locomoção igual a 1 e com ausência de sensibilidade ao pinçamento dos dígitos anteriores.

O padrão ouro para determinação da ocorrência da laminite foi o pinçamento dos quatros dígitos dos membros anteriores, sendo considerada a ocorrência de laminite quando o animal tinha duas respostas positivas em momentos consecutivos ao pinçamento. Tanto o pinçamento como a avaliação do escore de locomoção foi realizado em todos os períodos do estudo. Nesse estudo a laminite foi definida como uma doença clínica com manifestação de sensibilidade, claudicação detectável, identificada logo após a sobrecarga de carboidratos fermentável.

- Teste de sensibilidade do casco

Após a entrada dos animais no tronco de contenção, os membros anteriores foram suspensos e aplicado uma força em cada dígito com uma pinça entre a junção sola/bulbo e

parte central dorso abaxial da parede do casco. A pressão exercida foi apenas para avaliar visualmente se o animal respondia com fasciculações musculares ou tentativa de retirada do membro. A reação era subjetivamente classificada como:

- 0 - sem reação à pressão exercida;
- 1 - Presença de reação;

- Escore de locomoção

Nos momentos de avaliação os animais foram conduzidos para uma área aberta com superfície regular, onde foram estimulados a andar, sendo observado por dois avaliadores que atribuíram escores de locomoção nos momentos avaliados. Foram gravados vídeos dos momentos de avaliação do escore de locomoção de todos os animais do estudo, para confirmações e avaliações posteriores.

Os valores dos escores de locomoção e seus critérios de avaliação estão descritos abaixo, adaptado de Sprencher et al. (1997).

- Escore 1 – Animal Normal – O bovino anda normalmente, com passadas e com apoio dos membros usuais; dorso e cabeça eretos.
- Escore 2 – Claudicação branda – O andar é ligeiramente anormal, com passadas um pouco mais curtas, porém não exhibe claudicação perceptível, alterações no apoio dos membros e na postura do dorso e da cabeça.
- Escore 3 – Claudicação moderada – O animal anda com passos curtos e mais lentos, com aparente claudicação de um ou mais membros, porém sem qualquer arqueamento do dorso, mas já apresentando sua cabeça ligeiramente baixa.
- Escore 4 – Claudicação propriamente dita – O animal evita locomover-se e quando instigado claudica evidentemente e favorece mais um membro que outro, desviando o peso do corpo, exhibe passos curtos e expressa dor. Já apresenta algum grau de cifose e descai significativamente a cabeça.
- Escore 5 – Claudicação grave – O animal reluta em se locomover, e quando o faz claudica severamente evitando apoiar o membro mais afetado, demonstrando grande dor quando do apoio deste. A passada é lenta e realizada aos saltos. A cifose é pronunciada e a cabeça se apresenta bem baixa.

4.3.3 Exame clínico geral

O exame clínico dos animais foi realizado de acordo com recomendações de Dirksen et al. (1993), dando ênfase na aferição das variáveis vitais: frequência cardíaca, frequência respiratória e movimento ruminal.

4.3.4 Coleta de fluido ruminal

Nos momentos já mencionados, foram obtidas amostras de fluido ruminal para avaliação das seguintes variáveis: pH, potencial de oxirredução, tempo de redução do azul de metileno (TRAM), acidez titulável (AcT), lactato L (levógiro) e osmolaridade.

As amostras de conteúdo ruminal foram coletadas diretamente do rúmen nas regiões: cranial, medial e caudal. O conteúdo foi rapidamente coado em um tecido de algodão e o fluido utilizado para análise imediata do pH ruminal, TRAM e acidez titulável e armazenado a -20° C para determinação do lactato L e osmolaridade.

A análise do pH e potencial de oxi-redução foram realizadas em pHmetro de bancada (DM-22, Digimed), enquanto a acidez titulável foi determinada pela titulação com hidróxido de sódio (NaOH-0,1%) de 10mL de fluido ruminal contendo duas gotas de fenoftaleína (10% em álcool metílico).

O lactato L foi determinado por kit comercial (Randox[®]) em analisador bioquímico automático modelo RX Daytona (Randox[®]) e a osmolaridade em osmômetro por ponto de congelamento, modelo The Advanced Micro Osmometer 3300 (AdvancedTM). A prova de redução do azul de metileno foi realizada, utilizando 20mL de fluido ruminal e 4mL de azul de metileno (0,01%), sendo determinado o tempo para oxidação desse último.

4.3.5 Coleta e processamento das amostras de sangue

Amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante, e em tubos com ácido dietilenodiamino tetra-acético (EDTA) e com EDTA com fluoreto de sódio.

Para análise hemogasométrica o sangue total arterial foi coletado da artéria auricular em seringas de 3 mL contendo heparina sódica. Dessa amostra foram obtidos os valores do pH sanguíneo, pressão parcial de gás carbônico (pCO₂), pressão parcial de oxigênio (pO₂)

concentração de bicarbonato (HCO_3^-), excesso ácido básico (EAB) e cálcio ionizável, utilizando analisador de gases Istat (Abbott[®]) e cartuchos ECG8+ (Abbott[®]).

As amostras de sangue total nos tubos sem anticoagulante foram mantidas à temperatura ambiente até a formação do coágulo e centrifugadas a $1.000 \times g$ por 15 minutos para obtenção de soro, que foi aliquoteado em microtubos e congelados a -20°C . As amostras de soro foram utilizadas para determinação das concentrações de cortisol, lactato L, osmolaridade sérica, bioquímica (ureia e creatinina) e determinação dos eletrólitos sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloro (Cl^-). Os eletrólitos foram determinados em hemogasômetro Cobas B 121 (Roche Diagnostics). O “anion gap” foi calculado segundo Kaneko et al. (1997):

$$\text{Anion gap (mmol/L)} = (\text{Sódio} + \text{Potássio}) - (\text{Cloro} + \text{Bicarbonato})$$

A concentração de cortisol foi avaliada por ensaio imunoenzimático quimioluminescente em fase sólida em analisador automático (Immulite 1000, Siemens Medical Solutions Diagnostics). O range de calibração do ensaio é de 28-1380nmol/L e a sensibilidade analítica é de 5,5 nmol/L. A metodologia em questão foi validada para espécie por Coetzee et al. (2007). A osmolaridade sérica foi realizada pelo mesmo método já mencionado para o fluido ruminal.

As amostras coletadas com anticoagulante foram prontamente refrigeradas a 4°C . O sangue total coletado com EDTA foi utilizado para realização do hemograma em contador hematológico BC-2800 Vet (Mindray[®]). A partir dos valores do volume globular, foi calculado o déficit de volume plasmático segundo Kaneko et al. (1997) que relacionam o volume globular do momento zero (VG_1) com os obtidos nos tempos subsequentes (VG_N), de acordo com a expressão:

$$\text{Déficit de volume plasmático} = \left(\frac{\text{VG}_1 (1 - \text{VG}_N)}{\text{VG}_N (1 - \text{VG}_1)} \right) - 1 \times 100$$

O plasma fluoretado foi utilizado para determinação das concentrações de ácido láctico L. Os teores de lactato L sérico, uréia e creatinina foram determinados utilizando kits comerciais Randox[®] em analisador bioquímico automático modelo RX Daytona (Randox[®]).

4.4 Termografia Infravermelha

Para a realização das imagens termográficas, os animais foram conduzidos ao tronco de contenção, o qual se situava em ambiente livre da incidência de raios solares, sendo retirados os resíduos de fezes impregnados no casco com espátula e os membros anteriores foram fotografados. A câmera foi direcionada para o espaço interdigital do membro avaliado a distância de 1m, sendo obtida uma fotografia no sentido palmaro-dorsal.

Foi utilizada uma câmera termográfica da marca Flir Systems® (modelo T620). O detector infravermelho de 640x480 pixels de alta definição tem excepcional sensibilidade, capaz de captar diferenças de temperatura de até 0,2° C de temperatura. A referida câmera corrige automaticamente diferenças térmicas ambientais, para minimizar as influências do meio externo.

No momento basal foram obtidas imagens dos membros anteriores de todos os animais hígdos, porém após a indução da laminite o mesmo procedimento foi feito naquelas fêmeas que apresentavam sensibilidade alterada no referido membro anterior. As imagens tanto das fêmeas hígdas como laminíticas foram registradas sempre às 9 h da manhã.

As imagens foram analisadas por meio de software QuickReport da Flir Systems, sendo utilizada uma emissividade de 0,98%, temperatura refletida de 20° C, umidade relativa de 65% e temperatura atmosférica de 25° C. Para cada foto foi projetado um retângulo abrangendo a pele, banda coronária e casco de cada dígito, sendo avaliada a temperatura media do dígito.

Figura 1. Delimitação da área retangular, compreendendo a região da pele, banda coronária e estojo córneo para a mensuração da temperatura média de cada dígito.

Seta branca – Mostrando a área identificada como pele; Seta amarela - região da banda coronária; Seta azul - região do casco propriamente dita. Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

4.5 Plataforma de força

Foram utilizadas quatro plataformas de força com aquisição de sinais independentes (50x30 cm - Sistema de Aquisição de Sinais - EMG System[®]) ligadas a um computador para o armazenamento dos dados, sendo que cada plataforma tinha capacidade para suportar 250 kg. Esse equipamento foi desenhado e construído especificamente para o presente experimento na cidade de São José dos Campos, seguindo recomendações técnicas descritas por Neveux et al. (2006) e Chapinal et al. (2010).

As plataformas foram instaladas em uma superfície plana de alvenaria, sendo construída uma estrutura de madeira para deixa-las rente com superfície do tronco de contenção. Após os animais entrarem no tronco de contenção os quatros membros eram posicionados totalmente sobre cada plataforma para a avaliação da distribuição de peso. A distribuição de peso de cada membro foi registrada com frequência de 200 leituras/segundos durante 10 segundos. Se durante a leitura o animal movimentasse a cabeça ou retirasse algum dos membros das plataformas, este era novamente reposicionado manipulado para que retornasse a posição inicial a fim de proceder à nova leitura.

A distribuição de peso de cada membro anterior e posterior foi avaliada no momento basal (T0), após a laminite (TL), TT48 e TT96 horas. O peso registrado de cada membro foi somado contabilizando 100%, sendo posteriormente calculada a porcentagem de distribuição de peso de cada membro.

Figura 2. Sistema de aquisição de sinais utilizado para a avaliação da distribuição de peso.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

4.5.1 Análise dos resultados das plataformas de força após a aplicação dos AINEs

Nessa avaliação foram utilizados apenas 17 animais, devido à dificuldade dos animais se adaptarem a realização dessa prova. Sendo distribuído 4 animais nos grupos Controle, Flunixin e Cetoprofeno e cinco no grupo Meloxicam.

O conceito da análise dos resultados obtidos no teste de distribuição de apoio na plataforma de força, nesse segmento do experimento, foi diferente da empregada na avaliação do surgimento de laminite. Isso se deveu a distribuição dos 17 animais nos quatro tratamentos, diminuindo em muito o número de repetições, o que inviabilizou a avaliação estatística.

Assim, ponderou-se classificar os resultados em cada animal em cada tempo (TL; TT48; TT96) como positiva ou negativa de acordo com os conceitos preconizados por Neveux et al. (2006) que definiu as alterações obtidas na plataforma em vacas com diversas lesões podais. De acordo com esses supracitados autores:

- A) Um bovino com lesões podais em um membro remove peso deste e o transfere primariamente para um membro contralateral ou até mesmo ipsilateral. Além disso, existe uma maior mudança de apoio no decorrer do tempo entre os membros contralaterais.
- B) Vacas com afecções podais em ambos os membros anteriores tendem a distribuir o peso nos membros posteriores, porém quando a injúria se dá em ambos os membros posteriores tendem a não mudar a distribuição do peso.

4.6 Concentração de pepsinogênio

A dosagem de pepsinogênio foi realizada com amostras de soro por método colorimétrico segundo Dorny e Vercruysse (1998). Resumidamente, foi utilizada a Fração V da albumina bovina (Sigma Aldrich®) em solução tampão glicina-HCL-NaCl (0,1M) para preparar a solução substrato. Foi adicionado 50µL de soro a 250µL da solução substrato (solução 2% de albumina bovina em tampão glicina, pH 2,5), sendo misturado cuidadosamente. Posteriormente, esta alíquota foi incubada em banho-maria a 37° C por 24 horas. Em seguida a reação foi parada com adição de solução de ácido tricloroacético a 4% (Synth®) e centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm para obtenção do sobrenadante. Em placas de Elisa foi adicionado 200µL de hidróxido de sódio 0,25M, sendo acrescentado a essa solução 20µL do sobrenadante e logo após 30µl de uma solução a 33% de Coicaulteau's Folin. Sendo a placa lida após 30 minutos em leitor de Elisa (Epoch 2, Biotek®) a 680nm. A atividade enzimática foi expressa em unidades (U) de tirosina. Para calcular a quantidade de tirosina produzida por cada amostra, foi criada uma curva com soluções padrão de: 0,1µmol/mL, 0,2µmol/mL e 0,3µmol/mL, as quais foram preparadas a partir de uma solução estoque de 0,01M de L-tirosina (Sigma Aldrich®) em HCl (0,1N).

4.7 Sinais Clínicos

Nas primeiras 24 horas após a indução foi avaliado a cada seis horas a presença de sinais clínicos como: enoftalmia, mufla seca, secreção nasal, secreção ocular, ataxia, tremores e sinais de hipovolemia como diminuição da temperatura nas extremidades. Na 12ª h foi inspecionado o flanco abdominal esquerdo para a detecção de distensão, enquanto a mucosa ruminal foi inspecionada apenas 24ª h, para verificar a ocorrência de ruminite.

4.8 Avaliação da articulação tarsocrural

Na impossibilidade de realizar punção para avaliação do líquido sinovial das duas articulações tarsocrurais optou-se por mensurar o perímetro considerando como positivo um aumento de 2 cm nas duas articulações no decorrer do processo. A circunferência foi medida com fita métrica.

4.9 Tratamento de Suporte

Após a indução da ALRA, os animais que tiveram na 12^o h ou 18^o h pH sanguíneo menor que 7,2 pela avaliação hemogasométrica foram medicados com 1ml/kg de solução de bicarbonato de sódio (8,4%) e 6L de solução salina isotônica (NaCl 0,9%). Após seis horas do primeiro tratamento, se o pH sanguíneo não aumentasse, o tratamento era repetido.

4.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram processadas com auxílio de dois programas estatísticos computadorizados: Statistical analysis system - SAS e Minitab release.

Os dados obtidos durante o período experimental foram analisados quanto a sua distribuição pela prova de Kolgomorov-Sminorv e avaliada a homogeneidade das variâncias.

Os dados da caracterização da acidose láctica ruminal e da laminite foram avaliados por análise de variância pelo procedimento PROC ANOVA e a media de cada tempo, foi comparado pelo teste de media de Bonferoni.

Os dados obtidos após o tratamento da laminite com AINES, foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento PROC MIXED, para medidas repetidas no tempo, sendo estudado para cada variável o efeito de tratamento, tempo e interação entre tratamento e tempo. Sendo considerado o critério de Akaike (AIC) para a escolha da melhor estrutura de covariância. Após a escolha da melhor estrutura de covariância foi analisado o efeito de tempo entre os momentos estudados pela comparação de medias pelo teste de Bonferoni.

Foi utilizado o Teste Exato de Fisher para a análise das variáveis dicotômicas: sensibilidade ao pinçamento, manifestações clínicas e para o escore de locomoção (sendo considerado sim para animais com escore ≥ 2 e não para escore igual a 1). Enquanto o teste de Qui-quadrado foi utilizado para avaliar o acometimento ou não da laminite entre os dígitos dos animais estudados.

No estudo da relação entre duas variáveis foram calculados o coeficiente de correlação de Pearson (r) e o coeficiente de determinação (R^2), através do PROC CORR. Ficou estabelecido que existiu uma correlação de alta intensidade entre as variáveis quando $r \geq 0,60$; média intensidade quando $0,30 < r < 0,60$; e de baixa intensidade quando $r \leq 0,30$, considerando também que o nível de significância obtido nas correlações seja igual ou inferior a 5%. Foram consideradas significativas as diferenças cujo valor de “P” apresentou valores iguais ou inferiores a 0,05.

4.10.1 Avaliação dos testes diagnósticos

Para melhor comparar os vários testes empregados para o diagnóstico de laminite foram testados estes métodos com a sensibilidade dolorosa presente nos membros anterior, que foi empregada como padrão ouro.

O escore de locomoção foi determinado pela filmagem da deambulação de cada animal nos dois tempos iniciais em que a sensibilidade dolorosa se manifestou positiva. O filme foi examinado por vários analisadores os quais identificaram a presença de claudicação, sendo considerada positiva toda vez que o escore era igual ou superior a dois. Caso o animal manifestasse no primeiro tempo um número menor de membros claudicantes que numa segunda observação esta última representava o diagnóstico final.

A termografia infravermelha foi obtida apenas dos membros anteriores e foi considerado como “linha de corte” discriminatória entre os valores de higidez e morbidez o valor de 30° C.

A plataforma de força foi avaliada nos quatro membros. A linha de corte discriminatória entre a higidez e morbidez foi a de 24% para cada membro. Porém, algumas premissas básicas constatadas em bovinos claudicantes por Neveaux et al. (2006) foram levadas em consideração no julgamento de animais deste subgrupo, ou seja:

“A injúria dos dígitos de um membro quer seja ele anterior ou posterior é compensada com maior apoio no respectivo membro contralateral”. Assim, era considerado positivo o

membro injuriado que suportava menos peso (< 24%) e o contralateral que compensava com um peso maior.

“Quando um membro anterior ou posterior está afetado existe uma grande mudança de apoio entre este e o seu contralateral”. Assim, também foi considerado resultado positivo se o membro claudicante apresentasse maior apoio naquele momento de leitura, desde que o contralateral estivesse com menor apoio.

“A positividade também foi considerada quando os dois membros anteriores estavam injuriados e os posteriores hígidos, sendo observado que parte do apoio foi transferido dos membros anteriores para os posteriores”.

Frente essas ponderações foram contabilizados à presença de resultados verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos. Com esses resultados foram calculados os seguintes índices epidemiológicos: sensibilidade, especificidade, acurácia, razão de verossimilhança positivo (RVP) e razão de verossimilhança negativo (RVN).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{Verdadeiros positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiros negativos}}{\text{Verdadeiros negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

$$\text{Acurácia} = \frac{\text{Verdadeiros positivos} + \text{Verdadeiros Negativos}}{n}$$

$$\text{RVP} = \frac{\text{Sensibilidade}}{1 - \text{Especificidade}}$$

$$\text{RVN} = \frac{\text{Especificidade}}{1 - \text{Sensibilidade}}$$

5. RESULTADOS

5.1 ADAPTAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Com o fito de desenvolver o quadro experimental foram realizados dois pilotos iniciais para verificar o grau de acidose ruminal obtido com o protocolo proposto por Thoenner et al. (2004). Na primeira vez, seguindo as doses recomendadas de oligofrutose, o pH ruminal atingiu valores incrivelmente baixos (3,57) na 18^a h (Figura 3) acompanhado de pH sanguíneo também reduzido (7,14) (Figura 4). Essa condição gerou um preocupante quadro clínico caracterizado por intensa diarreia, desidratação marcante, decúbito esternal e grande depressão no estado geral. Tal conjunto sintomatológico requereu um urgente e intenso tratamento que evitou a evolução do quadro, provavelmente fatal, abortando o ensaio e deixando de acompanhar o surgimento da laminite.

Frente a gravidade do quadro foi reduzida, a dose principal em 10% (7.650 g de oligofrutose na primeira tentativa, para 6.855 g na segunda) obtendo na 18^a h pH ruminal 4,3 (Figura 3) e pH sanguíneo 7,28 (Figura 4), sem colocar a saúde do animal em risco maior e não requereu qualquer tratamento. Além disso, essa nova dose provocou na 24^a h sensibilidade aumentada em um dígito (medial direito) que depois progrediu para todos os dígitos dos membros anteriores. Deve-se citar que nas primeiras repetições em nenhum caso houve necessidade de tratamento.

Figura 3. pH ruminal dos pilotos I e II.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Figura 4. pH sanguíneo dos pilotos I e II.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Graças ao sucesso desses primeiros resultados foi mantida a mesma diminuição de dose de oligofrutose até o final do experimento, obtendo 93,1% de êxito na indução da laminite nos animais empregados (27/29). Apesar desse aparentemente bom resultado inicial 44,82% dos animais (13/29) apresentaram uma rápida queda no pH sanguíneo entre 12^a h e 18^a h (abaixo de 7,2) tornando-os deprimidos, atáxicos e com fasciculações. Frente a essa situação foi decidido empregar um tratamento de suporte a base de solução de bicarbonato (IV) a 8,4% (1mL por kg/PV) e hidratação (IV) com solução salina isotônica (6L). Esse tratamento não surtiu efeito imediato em seis animais (46,15%) optando-se pela repetição do mesmo protocolo na 18^a h (3/6) ou na 24^a h (3/6), aí sim corrigindo tais alterações clínicas. Deve-se destacar que esse tratamento de suporte não impediu que surgissem sintomas de laminite em todos animais medicados, não interferindo também na severidade dos problemas podais.

Deve-se destacar que embora a indução da acidose tenha sido exitosa em todos os 29 animais empregados dois (2) deles (6,89%) não manifestaram sensibilidade no casco, sendo retirados do experimento. Para entender melhor o desenvolvimento do quadro de acidose metabólica e a grande depressão no estado geral que requereu a necessidade de medicação de suporte, foram comparadas algumas variáveis entre os animais medicados (n=13) e os não medicados (n=14).

Inicialmente, foi comparado o pH ruminal no momento da primeira medicação no grupo tratado com a 12^a h no grupo não-tratado. Não existiu diferença significativa nessa variável (P=0,143) com os seguintes valores de pH: medicados $3,98 \pm 0,13$; não medicados

$4,07 \pm 0,16$. Contudo, na comparação do pH sanguíneo nos mesmos momentos ocorreu expressiva diferença ($P=0,0001$) entre os grupos: medicado $7,13 \pm 0,04$ e não medicado $7,26 \pm 0,04$.

De forma interessante existiu um altíssimo coeficiente de determinação ($R^2=0,8419$; $P=0,0040$) entre o pH ruminal e o pH sanguíneo apenas no grupo medicado (Figura 5) inexistindo de forma significativa no outro grupo ($R^2=0,0879$; $P=0,294$).

Figura 5. Correlações entre o pH ruminal e o pH sanguíneo dos animais do grupo medicado e não medicado.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Também foi analisada a diferença da osmolaridade sanguínea obtida no momento do primeiro tratamento e no momento basal; no grupo não medicado foi subtraído o valor da osmolaridade na 12ª hora daquela obtida no momento basal. Maiores diferenças médias ($P=0,002$) foram obtidas no grupo medicado ($46,6 \pm 27,8 \text{ mOsm/L}$) que no não medicado ($15,6 \pm 10,3 \text{ mOsm/L}$). Correlacionou-se nos dois grupos a osmolaridade sanguínea e o pH neste fluido nos momentos já explicitados. Enquanto que no grupo medicado existiu uma

correlação inversa significativa ($r=-0,692$; $P=0,0090$; $R^2=0,48$) (Figura 6), no grupo não medicado tal fato não ocorreu ($r=0,003$; $P=0,967$).

Figura 6. Correlações entre a diferença da osmolaridade sanguínea entre o tempo basal e a 12^a h (mOsm/L) e o pH sanguíneo dos animais do grupo medicado e não medicado.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Finalmente, comparou-se ainda o déficit de volume plasmático entre os grupos medicados e não medicados (levando-se em consideração o primeiro momento de tratamento e o basal nos medicados e a 12^a h e o momento basal nos não medicados), ocorrendo maior valor médio ($P=0,015$) no primeiro grupo ($36,3 \pm 11,1$ %) que no não medicado ($21,7 \pm 15,6$ %).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ALRA POR OLIGOFRUTOSE

5.2.1 Comportamento das variáveis ruminais

Com o intuito de melhor compreender as modificações ruminais frente à nova dose corrigida de oligofructose apresentam-se abaixo os resultados das seguintes variáveis: pH, potencial de óxido-redução (POR), acidez titulável (AcT), tempo de redução de azul de metileno (TRAM), lactato-L e osmolaridade (Tabela 1).

Não ocorreram diferenças em todas as variáveis estudadas do T-72 até o TO ($P=0,1500$). Contudo, a partir da 6ª h surgiram diferenças, em todas as variáveis, em relação aos dados registrados no preâmbulo do estudo. Assim, menores valores médios de pH foram obtidos no T18, o qual foi inferior aos T6 e T24 ($P=0,003$). No POR valores maiores foram logrados no T12 e T18, seguido do T24 e T6 ($P=0,0018$). Maior acidez titulável foi detectada no momento T18, o qual foi superior ao T24, e esse maior que o T6 ($P=0,0069$). Maior tempo de TRAM foi constatado nos momentos T12 e T18, seguidos pelo T24 e T6 ($P=0,0001$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão das variáveis ruminais de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda por sobrecarga de oligofructose.

Tempos	Variáveis Ruminais			
	pH	POR (mV)	AcT (mL)	TRAM (min)
T-72	6,50±0,3 ^a	36,8±20,7 ^d	3,13±0,8 ^d	1,07±0,7 ^c
T-48	6,36±0,3 ^a	43,2±18,0 ^d	3,27±0,9 ^d	0,56±0,39 ^c
T-24	6,47±0,2 ^a	36,0±17,7 ^d	3,21±0,9 ^d	0,41±0,26 ^c
T0	6,37±0,1 ^a	41,7±10,0 ^d	3,38±0,9 ^d	0,51±0,29 ^c
T6	4,67±0,2 ^b	144,4±10,3 ^c	5,77±1,8 ^c	20,72±13,2 ^b
T12	4,12±0,1 ^{cd}	175,8±7,1 ^a	8,08±1,4 ^{ab}	52,43±13,6 ^a
T18	4,02±0,2 ^d	181,4±12,3 ^a	8,58±2,3 ^a	49,87±18,3 ^a
T24	4,34±0,4 ^c	160,5±27,9 ^b	7,14±1,5 ^b	30,18±23,0 ^b

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017).

Letras minúsculas diferentes na coluna significa diferença entre os momentos.

Maiores teores de lactato foram detectados no rúmen a partir do T6 no grupo NM e M, atingindo maiores valores no T12 e T18 ($p=0,0367$), no T24 ocorreu redução, porém não diferiu do T6. Não houve diferença entre os grupos no concernente a esta variável.

Maior osmolaridade ruminal foi detectada no T6 no grupo NM, nos tempos posteriores houve redução, enquanto no grupo M não ocorreu modificações para esta variável ao longo tempo. Na comparação entre grupos observou-se maior osmolaridade ruminal no grupo NM que no M no T6, enquanto no T18 foi encontrado maior valor para o grupo M (Tabela 2).

Tabela 2 - Média e desvio padrão das variáveis ruminais de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).

Variáveis Ruminais				
Tempos	Lactato (mmol/L)		Osmolaridade (mOsm/L)	
	NM	M	NM	M
T-72	0,02±0,01 ^c	0,02±0,03 ^b	289,1±33,4 ^{ab}	285,2±40,8
T-48	0,02±0,02 ^c	0,07±0,09 ^b	262,3±29,0 ^b	287,6±36,1
T-24	0,03±0,07 ^c	0,10±0,1 ^b	283,6±51,4 ^b	296,7±46,2
T0	0,01±0,01 ^c	0,02±0,03 ^b	256,6±39,3 ^b	263,3±51,6
T6	40,0±8,3 ^b	42,2±8,9 ^{ab}	336,0±21,7 ^{Aa}	306,6±37,3 ^B
T12	57,4±81,9 ^a	51,8±9,1 ^a	288,3±37,6 ^{ab}	268,2±34,8
T18	51,0±9,6 ^a	53,2±9,9 ^a	242,8±37,1 ^{Bb}	270,6±34,1 ^A
T24	39,3±15,3 ^b	39,6±16,9 ^b	269,0±35,3 ^b	266,9±45,1

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúscula diferentes na linha significa diferença entre o grupo não medicado (NM) e medicado (M) para a variável analisada. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os momentos.

Maiores coeficientes de correlação positiva foram observados entre a osmolaridade e a AcT, osmolaridade e TRAM, POR e AcT e POR e TRAM. Enquanto maiores associações negativas entre duas variáveis foram detectadas entre o pH e POR, pH e AcT, POR e TRAM (Tabela 3).

Tabela 3.- Coeficientes de correlação entre as variáveis ruminiais dos animais submetidos à indução da acidose láctica ruminal por oligofrutose.

	Variáveis ruminiais					
	pH	Lactato L	Osmolaridade	POR	AcT	TRAM
pH		-0,49759 p=0,0001	0,38191 p=0,0001	-0,97461 p=0,0001	-0,66616 p=0,0001	-0,72229 p=0,0001
Lactato L			-0,05668 p=0,5601	0,52638 p=0,0001	0,40036 p=0,0001	0,39757 P=0,0001
Osmolaridade				0,39757 p=0,0001	0,65718 P=0,0001	0,69643 p=0,0001
POR					0,65718 0,0001	0,69643 p=0,0001
AcT						0,54488 p=0,0001

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

5.2.2 Comportamento das variáveis sanguíneas

As variáveis sanguíneas, lactato-L, osmolaridade e cortisol não diferiram entre os grupos não medicados e medicados.

Maiores teores médios de lactato-L foram constatados no T24 que nos momentos T0, T6 e T-24 (P=0,0067). A osmolaridade foi superior no momento T6 que nos tempos entre T-72 e T0 (P=0,0400). As concentrações médias de cortisol foram maiores nos tempos T18 e T24 que no T12, que por sua vez foi superior a todos os demais momentos analisados (P=0,0008) (Tabela 4).

Tabela 4.- Media e desvio padrão das variáveis sanguíneas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda por sobrecarga de oligofrutose.

Tempos	Variáveis Sanguíneas		
	Lactato-L (mmol/L)	Osmolaridade (mOsm/L)	Cortisol (nmol/L)
T-72	1,07±0,3 ^{ab}	302,89±18,7 ^b	55,7±33,1 ^c
T-48	0,96±0,4 ^{ab}	303,00±19,3 ^b	49,1±24,8 ^c
T-24	0,83±0,3 ^b	305,25±23,4 ^b	44,4±19,3 ^c
T0	0,78±0,2 ^b	312,33±12,4 ^b	53,8±33,1 ^c
T6	0,79±0,2 ^b	330,82±25,2 ^a	84,7±46,9 ^c
T12	1,01±0,3 ^{ab}	316,86±25,9 ^{ab}	198,9±63,4 ^b
T18	0,98±0,3 ^{ab}	316,59±24,2 ^{ab}	274,7±115,8 ^a
T24	1,24±0,5 ^a	312,60±22,1 ^{ab}	275,6±113,1 ^a

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os momentos.

Os teores de ureia dentro do grupo NM foram maiores no momento T-72 comparado aos tempos T6, T12 e T18 (P=0,0431). Dentro do grupo M o T-72 foi maior que os tempos T12 e T18 (P=0,0256). Entre os grupos as concentrações de ureia foram superiores no grupo M nos momentos T6 e T24 (P=0,0492).

No concernente a creatinina não existiu diferença entre os tempos dentro do grupo NM (P=0,9987), porém maior valor foi verificado no T24 em relação aos tempos T-72 a T6 (P=0,0262) no grupo M. Essa variável foi superior no grupo M no momento T24 em relação ao grupo NM (P=0,0095).

Não ocorreram diferenças dentro e entre grupos nos teores de pepsinogênio sérico no decorrer do pré-experimento e das primeiras 24 h de indução com oligofrutose (P=0,7856) (Tabela 5).

Tabela 5.- Media e desvio padrão das variáveis séricas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).

Tempos	Variáveis Séricas					
	Ureia		Creatinina		Pepsinogênio	
	(mmol/L)		(mg/dL)		(U/Tirosina)	
	NM	M	NM	M	NM	M
T-72	4,19±1,7 ^a	4,51±1,4 ^a	1,73±0,2	1,76±0,3 ^b	-	-
T-48	3,36±1,2 ^{ab}	3,35±1,0 ^{abc}	1,74±0,2	1,76±0,2 ^b	-	-
T-24	3,38±1,4 ^{ab}	3,13±0,9 ^{bc}	1,82±0,3	1,73±0,2 ^b	-	-
T0	2,98±1,1 ^{ab}	3,68±1,0 ^{ab}	1,76±0,1	1,78±0,2 ^b	0,38±0,1	0,31±0,1
T6	2,22±1,1 ^{Bb}	2,73±0,8 ^{Abc}	1,93±0,1	1,95±0,2 ^b	0,29±0,1	0,30±0,1
T12	1,80±0,7 ^b	2,29±0,6 ^c	1,93±0,2	2,02±0,3 ^{ab}	0,33±0,1	0,35±0,1
T18	2,17±0,8 ^b	2,34±0,7 ^c	1,98±0,4	2,15±0,2 ^{ab}	0,37±0,2	0,34±0,1
T24	2,60±1,1 ^{Bab}	3,46±0,9 ^{Aabc}	1,95±0,3 ^B	2,50±0,5 ^{Aa}	0,32±0,2	0,35±0,1

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúscula diferentes na linha significa diferença entre o grupo não medicado (NM) e medicado (M) para a variável analisada. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os momentos.

5.2.3 Comportamento das variáveis hematológicas

As comparações dentro dos grupos NM e M para as variáveis VG e hemácias identificaram maiores valores nos tempos T6, T12 e T18 em relação a todos os demais momentos estudados ($P=0,0309$). A comparação dos dados de hemoglobina dentro do grupo NM identificou maiores teores nos momentos T18 e T24 em relação a todos os demais tempos ($P=0,0171$), enquanto que no grupo M o T18 foi superior aos demais ($P=0,0424$), com exceção ao T24. Na comparação entre os grupos destas três variáveis (He, VG e Hb) constatou-se maiores valores no T6, T12 e T18 que nos demais tempos no grupo NM, com exceção do T24 ($P=0,0265$) (Tabela 6).

Tabela 6.- Media e desvio padrão das variáveis hematológicas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).

Tempos	Variáveis Hematológicas					
	VG		Hemácias		Hemoglobina	
	(%)		(x10 ⁶ /mm ³)		(g/dL)	
	NM	M	NM	M	NM	M
T-72	31,9±2,7 ^b	34,5±5,5 ^{cd}	7,25±0,7 ^b	7,85±1,0 ^{cd}	10,2±0,9 ^b	11,0±1,5 ^{cd}
T-48	32,8±3,6 ^b	34,3±3,7 ^{cd}	7,42±0,8 ^b	7,83±0,7 ^d	10,4±0,9 ^b	10,9±0,9 ^{cd}
T-24	32,3±2,3 ^b	33,8±2,6 ^d	7,44±0,5 ^b	7,73±0,7 ^d	10,2±0,6 ^b	10,6±0,9 ^d
T0	31,5±2,7 ^b	33,9±3,6 ^d	7,17±0,5 ^b	7,79±0,8 ^d	9,9±0,8 ^b	10,9±1,1 ^{cd}
T6	32,0±1,6 ^{Bb}	35,3±3,0 ^{Ac^d}	7,25±0,4 ^{Bb}	8,02±0,7 ^{Ac^d}	9,9±0,6 ^{Bb}	11,2±0,9 ^{Ac^d}
T12	34,3±3,8 ^{Bb}	39,9±5,4 ^{Abc}	7,74±0,9 ^{Bb}	9,04±0,9 ^{Abc}	10,6±1,2 ^{Bb}	12,4±1,4 ^{Abc}
T18	41,1±5,5 ^{Ba}	46,2±6,4 ^{Aa}	9,19±1,2 ^{Ba}	10,29±1,2 ^{Aa}	13,1±2,5 ^{Ba}	14,2±1,8 ^{Aa}
T24	41,0±5,3 ^a	44,1±6,0 ^{ab}	9,12±1,2 ^a	9,96±9,5 ^{ab}	12,5±1,6 ^a	13,8±1,7 ^{ab}

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúscula diferentes na linha significa diferença entre o grupo não medicado (NM) e medicado (M) para a variável analisada. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os momentos.

O número de leucócitos dentro do grupo M foi inferior no tempo T24 em relação a todos os momentos, salvo o T18 (P=0,0360), não existiram diferenças dentro do grupo NM (P=0,7020). O DVP foi mais negativo dentro do grupo NM nos momentos T18 e T24 (P=0,0017), ocorrendo o mesmo no momento T18 em relação aos momentos T12 e T6 no grupo M (P=0,0199) (Tabela 7).

Tabela 7 - Media e desvio padrão das variáveis hematológicas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).

Tempos	Variáveis Hematológicas			
	Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		Déficit Volume Plasmático (DVP) (%)	
	NM	M	NM	M
T-72	10,0 $\pm$ 2,1	12,2 $\pm$ 2,7 ^a	-	-
T-48	10,2 $\pm$ 2,5	11,6 $\pm$ 2,0 ^{ab}	-	-
T-24	9,9 $\pm$ 1,8	11,8 $\pm$ 1,5 ^{ab}	-	-
T0	10,2 $\pm$ 2,4	11,3 $\pm$ 1,8 ^{abc}	-	-
T6	11,1 $\pm$ 2,4	11,3 $\pm$ 1,7 ^{abc}	-7,7 $\pm$ 9,2 ^a	-13,4 $\pm$ 11,1 ^a
T12	10,6 $\pm$ 4,3	12,4 $\pm$ 2,1 ^a	-15,9 $\pm$ 13,5 ^{Ba}	-27,3 $\pm$ 18,4 ^{Aab}
T18	7,8 $\pm$ 2,4	8,9 $\pm$ 2,5 ^{bc}	-36,3 $\pm$ 14,0 ^b	-44,3 $\pm$ 12,4 ^c
T24	8,8 $\pm$ 2,0	8,6 $\pm$ 2,5 ^c	-36,28 $\pm$ 13,5 ^b	-39,8 $\pm$ 11,0 ^{bc}

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúscula diferentes na linha significa diferença entre o grupo não medicado (NM) e medicado (M) para a variável analisada. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os momentos.

5.2.4 Comportamento das variáveis hemogasométricas

Como parte dos animais foram medicados contra a acidose metabólica e desidratação, empregando-se soluções de bicarbonato de sódio e cloreto de sódio, entendeu-se por bem separar, dentro das variáveis hemogasométricas, em dois grupos: medicados (M) e não medicados (NM). Os resultados encontram-se nas tabelas 8 e 9.

Menores valores de pH sanguíneo foram observados a partir da 12^a h (T12) até a 24^a h (T24) em relação a todos os demais tempos dentro do grupo NM (P=0,0051). Os mesmos resultados menores de pH foram verificados na 12^a h e 18^a h em relação a 24^a (T24), a qual foi inferior a todos os demais tempos, com exceção da 6^a h, dentro do grupo M (P=0,0159). Comparando-se os grupos, confirmou-se que o pH do sangue foi inferior no grupo M da 6^a h a 18^a h durante a indução (P=0,0237).

Idêntico comportamento nos resultados foi constatado nas concentrações de bicarbonato e excesso de ácido-básico (BE) tanto dentro de cada grupo como entre grupos. Assim, dentro de ambos os grupos os teores de bicarbonato e de BE na 12^a h, 18^a h e 24^a h foram inferiores em relação aos demais momentos (P=0,0001). Os animais medicados

apresentaram menores valores destas supracitadas variáveis na 12^a h, 18^a h, e 24^a h em relação ao grupo NM (P=0,0001) (Tabela 8).

Tabela 8 - Média e desvio padrão das variáveis hemogasométricas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).

Tempos	Variáveis Hemogasométricas					
	pH		HCO ₃ ⁻ (mmol/L)		BE (mmol/L)	
	NM	M	NM	M	NM	M
T-72	7,44±0,03 ^a	7,41±0,04 ^a	26,3±2,7 ^a	23,7±3,2 ^a	2,8±2,8 ^{Aa}	-0,45±3,4 ^{Ba}
T-48	7,44±0,04 ^a	7,39±0,06 ^a	25,9±2,6 ^a	23,8±3,2 ^a	2,0±3,0 ^{Aa}	-0,84±2,8 ^{Ba}
T-24	7,42±0,03 ^a	7,38±0,06 ^a	25,1±1,9 ^a	22,8±2,7 ^a	1,0±2,3 ^{Aa}	-1,69±2,9 ^{Ba}
T0	7,43±0,04 ^a	7,41±0,03 ^a	25,1±1,9 ^{Aa}	23,3±2,9 ^{Ba}	1,2±2,2 ^{Aa}	-0,92±2,7 ^{Ba}
T6	7,41±0,03 ^{Aa}	7,34±0,1 ^{Bab}	24,6±3,7 ^a	22,7±2,9 ^a	0,6±4,2 ^a	-1,61±2,9 ^a
T12	7,27±0,04 ^{Ab}	7,18±0,07 ^{Bc}	14,2±2,3 ^{Ab}	11,1±1,6 ^{Bb}	-12,0±2,8 ^{Ab}	-15,4±2,9 ^{Ba}
T18	7,29±0,07 ^{Ab}	7,19±0,08 ^{Bc}	12,8±4,0 ^{Ab}	8,7±2,5 ^{Bb}	-13,2±5,0 ^{Ab}	-19,5±3,4 ^{Bb}
T24	7,33±0,08 ^b	7,29±0,07 ^b	15,6±5,3 ^{Ab}	11,0±3,2 ^{Bb}	-9,7±6,6 ^{Ab}	-15,9±4,4 ^{Bb}

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúscula diferentes na linha significa diferença entre o grupo não medicado (NM) e medicado (M) para a variável analisada. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os momentos.

Ocorreu uma queda na pressão de CO₂ sanguínea em ambos os grupos M e NM da 12^a h a 24^a h pós-tratamento, em relação aos demais tempos (P=0,0006). Não existiu diferença desses valores nos vários tempos estudados entre os grupos M e NM (P=0,6911) (Tabela 9).

Tabela 9.- Media e desvio padrão das variáveis hemogasométricas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).

Tempos	Variáveis Hemogasométricas			
	pCO ₂ (mm/Hg)		pO ₂ (mm/Hg)	
	NM	M	NM	M
T-72	38,4±4,7 ^a	37,7±3,3 ^a	110,6±12,3	115,2±15,5
T-48	38,6±2,9 ^a	39,8±3,3 ^a	120,1±18,5	117,6±17,1
T-24	38,7±2,8 ^a	38,1±4,4 ^a	111,3±12,1	126,3±23,4
T0	37,9±3,8 ^a	37,5±4,6 ^a	109,5±31,7	119,3±20,4
T6	38,8±3,8 ^a	37,3±6,2 ^a	108,5±8,8	116,6±12,8
T12	31,0±2,9 ^b	28,9±3,7 ^b	110,7±6,7	115,4±8,0
T18	26,4±4,9 ^b	24,5±4,9 ^b	117,5±12,3	111,9±10,8
T24	28,6±4,9 ^b	26,3±4,5 ^b	112,0±11,4	109,2±5,9

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os momentos.

5.2.5 Comportamento das variáveis eletrolíticas

Não ocorreram diferenças dentro e entre tratamento no concernente aos teores de sódio (P=0,7402) e potássio (0,9779) (Tabela 10). Dentro do grupo NM apenas os valores médios de cloro no T6 foram superiores ao momento T24 (P=0,0304), porém não existiram diferenças no grupo M (Tabela 11).

O “anion gap” foi superior dentro do grupo NM no momento T18 em relação a todos momentos, exceto aos tempos T12 e T24, enquanto que dentro do grupo M os três últimos tempos (T12, T18 e T24) foram superiores a todos os que os antecederam (P=0,0131). Existiu diferença no “anion gap” entre os grupos NM e M apenas no momento T24 (P=0,0242) (Tabela 11).

Tabela 10.- Media e desvio padrão das variáveis eletrolíticas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).

Tempos	Variáveis Eletrolíticas			
	Na		K	
	(mmol/L)		(mmol/L)	
	NM	M	NM	M
T-72	165,7±17,9	168,2±19,2	5,04±0,5	5,05±0,9
T-48	163,9±20,6	155,9±19,6	4,76±0,6	4,93±0,7
T-24	172,8±21,9	159,1±20,7	4,79±0,7	5,22±0,6
T0	169,5±14,7	162,2±18,3	4,80±0,6	5,16±0,5
T6	181,8±17,8	177,4±19,9	4,78±0,3	4,88±0,5
T12	174,7±21,8	171,6±20,2	5,48±0,7	5,43±0,9
T18	168,5±14,8	162,6±16,2	5,24±0,6	5,40±1,0
T24	161,3±13,0	167,0±15,2	5,15±0,6	5,15±0,9

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Tabela 11.- Media e desvio padrão das variáveis eletrolíticas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).

Tempos	Variáveis Eletrolíticas			
	Cl		“Anion Gap”	
	(mmol/L)		(mmol/L)	
	NM	M	NM	M
T-72	122,9±12,9 ^{ab}	125,7±43,0	23,1±7,3 ^c	25,2±5,0 ^b
T-48	122,0±15,8 ^{ab}	116,3±14,6	20,8±6,3 ^c	20,4±6,5 ^b
T-24	128,9±15,6 ^{ab}	119,2±16,0	24,0±7,0 ^c	21,8±6,1 ^b
T0	126,3±10,6 ^{ab}	121,0±13,7	23,2±5,2 ^c	22,6±5,4 ^b
T6	134,8±12,0 ^a	132,0±14,2	27,2±5,4 ^{bc}	27,5±5,3 ^b
T12	131,3±16,1 ^{ab}	129,8±14,4	34,6±6,7 ^{ab}	36,1±7,4 ^a
T18	124,5±10,4 ^{ab}	119,6±13,0	36,5±9,0 ^a	39,5±5,7 ^a
T24	117,7±11,0 ^b	121,3±12,2	33,1±8,1 ^{Bab}	39,7±6,6 ^{Aa}

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúscula diferentes na linha significa diferença entre o grupo não medicado (NM) e medicado (M) para a variável analisada. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os momentos.

5.2.6 Comportamento das variáveis clínicas

A frequência cardíaca foi superior dentro do grupo NM no momento T24 em relação aos tempos T-72 a T6 ($P=0,0242$), já dentro do grupo M tanto os T24 e T18 foram maiores que o T-72 a T6 ($P=0,0143$). Não existiu diferença entre os grupos nesse quesito. No concernente a frequência respiratória tanto dentro dos grupos NM como M surgiram valores médios maiores no T6 em relação ao T18 ($P=0,0341$). Tal qual à FC, não existiu diferença entre os grupos NM e M no tocante à frequência respiratória.

Tabela 12.- Media e desvio das variáveis clínicas de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).

Tempos	Variáveis Eletrolíticas			
	FC		FR	
	(bat/min)		(mov/min)	
	NM	M	NM	M
T-72	74,4±9,8 ^{cd}	64,0±8,7 ^d	24,7±8,0 ^{ab}	21,1±6,4 ^{ab}
T-48	72,4±13,2 ^d	69,5±9,7 ^{cd}	24,1±4,7 ^{ab}	22,4±5,0 ^{ab}
T-24	71,4±9,0 ^d	71,8±10,6 ^{cd}	24,3±5,0 ^{ab}	22,2±4,2 ^{ab}
T0	74,3±10,6 ^{cd}	74,7±13,8 ^{cd}	26,1±5,8 ^{ab}	24,9±5,6 ^{ab}
T6	83,2±13,6 ^{bcd}	82,7±9,9 ^{bc}	32,0±8,6 ^a	28,6±8,6 ^a
T12	89,0±13,3 ^{ab}	94,6±22,7 ^{ab}	23,6±5,1 ^{ab}	27,6±5,2 ^{ab}
T18	97,6±16,1 ^{ab}	107,2±15,8 ^a	22,7±8,7 ^b	20,8±3,6 ^b
T24	105,2±8,8 ^a	109,1±9,1 ^a	24,1±5,5 ^{ab}	21,3±4,6 ^{ab}

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os momentos.

A temperatura retal não diferiu entre os grupos NM e M. Porém, dentro de cada grupo observou-se aumento significativo dessa variável na 6^a e 12^a h após à indução (Figura 6).

Figura 7.- Temperatura retal (° C) dos bovinos do grupo não medicado e medicado após a indução da acidose láctica ruminal por oligofrutose.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

A movimentação ruminal ainda existiu em cerca de 60% dos bovinos nos grupos NM e M até o T6, porém a partir deste momento até o final da T24 tais movimentos inexisteram (Figura 7). A diarreia, em fortes jatos, se iniciou no T6 em cerca de 40% dos animais atingindo a maioria deles no T12 e T18, diminuindo em seguida a sua frequência no T24 (Figura 8).

Figura 8.- Porcentagem de animais com movimentação ruminal no Grupo Medicado e Não Medicado.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Figura 9 - Porcentagem de animais com diarreia no Grupo Medicado e Não Medicado.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

A presença de ruminite, enoftalmia e distensão abdominal do flanco esquerdo foi maior no grupo medicado ($P=0,0005$) que no não medicado, todas as variáveis clínicas estudadas surgiram de forma semelhante nos dois grupos em questão (Tabela 13).

Tabela 13. Manifestações clínicas dos bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda nos grupos medicados (M) e não medicados (NM).

Manifestações Clínicas	Grupos	
	NM	M
Secreção nasal	11/14	13/13
Epífora	1/14	1/13
Muflo seco	11/14	13/13
Enoftalmia	4/14 ^B	9/13 ^A
Extremidades frias	0/14	3/13
Tremores	2/14	3/13
Ataxia na 12 ^a h	14/14	13/13
Ruminite na 24 ^a h	4/14 ^B	9/13 ^A
Distensão do flanco esquerdo 12 ^a h	1/7 ^B	7/7 ^A

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúscula diferentes na linha significa diferença entre o grupo não medicado (NM) e medicado (M) para a variável analisada.

5.2.7 Comportamento das variáveis fecais e urinárias

Dentro do grupo NM foram detectados valores médio de pH fecal mais baixos no T12 em relação aos demais momentos ($P=0,0162$). No grupo M esses valores médios foram inferiores no T12 em relação ao momento T18 ($P=0,0435$). Não existiu diferença no pH fecal em nenhum momento entre os dois grupos ($P=0,4907$). Nem dentro nem entre grupos houve diferença no pH urinário ($P=0,6217$) (Tabela 14).

Tabela 14.- Media e desvio padrão das variáveis fecais e urinárias de bovinos submetidos à indução de acidose láctica ruminal aguda em animais medicados (M) e não medicados (NM).

Variáveis Fecais e Urinárias				
Tempos	pH fezes		pH urina	
	NM	M	NM	M
T-72	6,19±0,2 ^a	6,45±0,4 ^a	5,63±0,2	5,67±0,2
T-48	6,19±0,2 ^a	6,28±0,3 ^a	5,60±0,1	5,49±0,2
T-24	6,29±0,2 ^a	6,22±0,2 ^a	5,73±0,2	5,56±0,2
T0	6,05±0,4 ^a	6,18±0,2 ^a	5,57±0,3	5,61±0,2
T6	6,30±0,3 ^a	6,18±0,4 ^a	5,65±0,4	5,47±0,1
T12	5,27±0,4 ^b	4,99±0,2 ^c	5,58±0,2	5,53±0,1
T18	6,28±1,2 ^a	5,66±0,7 ^b	5,67±0,3	5,71±0,3
T24	6,46±1,0 ^a	6,35±0,9 ^a	5,65±0,3	5,80±0,3

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os momentos.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO QUADRO DE LAMINITE

5.3.1 Frequência da laminite por meio de pinçamento

Dos 29 animais utilizados no presente estudo, 27,58% (n=8) apresentaram sensibilidade na 24^a h, 10,35% (n=3) na 36^a h, 17,25% (n=5) na 48^a h, 20,68% (n=6) na 72^a h, 17,25% (n=5) na 60^a h e 6,89% (n=2) que não apresentaram sensibilidade, sendo estes eliminados do experimento. Um desses últimos não apresentava nenhuma alteração de escore de locomoção, porém um deles manifestou leve alteração na deambulação em um dos membros posteriores.

Dos bovinos selecionados 40,75% (n=11) demonstraram sensibilidade nos quatro dígitos, 33,33% (n=9) nos três, 11,11% (n=3) em dois dígitos e 14,81% (n=4) em um único dígito.

Quando foram analisados, por Qui-quadrado, todos dígitos acometidos (n=81) não existiu diferença entre os dígitos esquerdos (n=40) e direitos (n=41), porém quando analisados por posição medial ou lateral, independente de lado, maior número de laterais (n=48) foram acometidos que os mediais (n=33) (P=0,0270). Quando a mesma análise foi feita apenas com animais que não tiveram os quatro dígitos anteriores afetados semelhantes resultados foram obtidos, ou seja, semelhança entre dígitos esquerdos (n=17) e direitos (n=20), mas maior frequência de dígitos laterais (n=26) que mediais (n=11) (P=0,0010).

5.3.2 Escore de locomoção

Dos 27 bovinos avaliados ao vivo, 23 (85,18%) apresentaram escore “2”; três (11,11%) escore “3” e um (3,70%) escore “4”.

Foi avaliada a filmagem de 23 animais, em movimento, no momento em que se confirmou a presença da laminite, para detectar a ocorrência de claudicação. Os seguintes resultados foram encontrados quanto ao número de membros claudicantes: 56,52% em dois membros, 21,74% em três membros, 17,39% em um membro e 4,35% nos quatro membros.

A análise pelo Teste Exato de Fischer indicou que maior número de fêmeas apresentaram claudicação em dois membros (P=0,0058) em comparação com um, três ou quatro membros (Tabela 15). Quantificou-se também a distribuição de combinações dos membros afetados naquelas que tiveram dois membros claudicantes, com os seguintes

resultados: 46,1% (n=6) um membro anterior e seu correspondente ipsilateral; 23,1% (n=3) um membro anterior e o correspondente diagonal; 15,4% (n=2) em dois membros anteriores e 15,4% (n=2) nos dois membros posteriores.

Tabela 15.- Número de membros claudicantes identificado pela filmagem após a indução da acidose láctica ruminal.

Nº de animais	Nº de Membros			
	1	2	3	4
	4 ^{BC}	13 ^A	5 ^B	1 ^C

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significa diferença entre os números de dígitos claudicantes pelo teste Exato de Fisher.

Dentro do subgrupo de bovinos com dois membros claudicantes, comparou-se a soma (n=9) daqueles com um membro anterior e outro posterior afetado (membro anterior e seu contralateral (n=3) + membro anterior e seu ipsilateral (n=6)) com aqueles que tiveram só os anteriores (n=2) e posteriores acometidos (n=2) notando-se uma diferença significativa a favor dos primeiros (p=0,0492).

Levando em consideração a posição dos membros claudicantes, tivemos os seguintes resultados: anterior direito (n=14); anterior esquerdo (n=10); posterior direito (n=14) e posterior esquerdo (n=11).

5.3.3 Termografia infravermelha

Na avaliação da temperatura média podal por termografia infravermelha observou-se que no momento basal não existiu diferença nos dígitos dos membros anteriores entre os animais (P=0,9560) (Tabela 16). O surgimento de laminite influenciou positivamente o aumento da temperatura podal quando comparado com os valores basais (P=0,0001) (Tabela 16; Figura 10).

Tabela 16.- Media, desvio padrão e coeficiente de variação da temperatura media (° C) dos dígitos anteriores laterais e mediais de bovinos antes e após a indução de laminite por acidose aguda.

Momentos	Dígitos Anteriores				CV
	Direito Lateral	Direito Medial	Esquerdo Lateral	Esquerdo Medial	
Basal	27,7±5,4 ^B	27,4±4,6 ^B	28,1±4,3 ^B	28,1±4,2 ^B	16,54
Laminite	33,4±2,8 ^A	33,4±2,9 ^A	33,4±2,9 ^A	33,2±3,3 ^A	8,92

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre o momento basal e após o aparecimento da laminite entre os dígitos.

Figura 10.- A- Termografia do membro torácico esquerdo no momento basal; B-Membro torácico esquerdo do mesmo animal após a indução da laminite. Observar aumento da área branca na região da banda coronária (seta), indicativa de maior temperatura.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

5.3.4 Plataformas de força

No tempo basal não existiu diferença de distribuição percentual de apoio entre os quatro membros, detectado pela plataforma de força ($P=0,1723$) (Figura 9). Porém, quando foram somados a distribuição do apoio entre os membros anteriores e posteriores constatou-se percentual médio de $53\pm5,4\%$ do peso distribuído nos membros anteriores e $47\pm5,4\%$ nos membros posteriores ($P=0,0264$).

Figura 11.- Distribuição de peso dos membros anteriores e posteriores esquerdo e direito no momento basal.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Foram feitas confrontações entre o momento basal e após o surgimento de laminite (Tabela 17). Assim, os membros anteriores acometidos tiveram menor percentual de apoio que o seu respectivo tempo basal ($P=0,0001$). Porém, não existiu diferença entre o tempo basal e o do surgimento de laminite nos membros posteriores ($P=0,2240$) (Tabela 18).

Tabela 17.- Media e desvio padrão da distribuição de peso (%) dos mesmos membros afetados no momento basal e após a indução de laminite por acidose aguda.

Membros	Momentos		P
	Basal	Afetado	
Anteriores	$26,4 \pm 5,4^A$	$19,8 \pm 3,2^B$	0,0001
Posteriores	$23,5 \pm 5,4$	$21,63 \pm 5,1$	0,2240

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significa diferença entre o momento basal e membros afetados.

O surgimento da laminite interferiu na distribuição do apoio entre os membros (Tabela 18). Assim, aqueles afetados tiveram um percentual de apoio inferior aos contralaterais não afetados ($P=0,0001$). As comparações dos membros anteriores assim como posterior acometidos com seus contralaterais hígidos revelaram que os contralaterais suportaram apoio superior aos enfermos ($P=0,0001$). Não foi verificada diferença na comparação dos membros anteriores e posteriores injuriados ($19,8 \pm 3,2$ versus $21,6 \pm 5,1$; $P=0,2530$) ou não injuriados ($28,8 \pm 5,7$ versus $29,8 \pm 4,2$; $P=0,5830$).

Tabela 18.- Media e desvio padrão da distribuição de peso (%) dos membros afetados e de seu contralateral não afetado de bovinos após a indução de laminite por acidose aguda.

Membros	Membros		P
	Não afetado	Afetado	
Anteriores	28,8±5,7 ^A	19,8±3,2 ^B	0,0001
Posteriores	29,8±4,2 ^A	21,6±5,1 ^B	0,0001
Media Geral	28,2±6,4 ^A	20,3±4,1 ^B	0,0001

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significa diferença entre os membros não afetados e afetados.

5.3.5 Polisinovite

Identificou-se oito fêmeas (29,6%) com aumento do diâmetro das articulações tarsocrurais dos 27 animais que apresentaram laminite, sendo encontrado uma distensão maior ou igual a dois centímetros. Os animais apresentaram aumento da articulação entre a 24^a a 96^a h, com mediana de 66 horas após a indução da acidose ruminal.

5.4 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Considerando como “gold standard” a sensibilidade dos dígitos, foi comparada a metodologia diagnóstica deste método com o escore visual de locomoção, realizada ao vivo e por meio de filmagem, com a técnica de termografia infravermelha, assim como com a plataforma de força. O escore de locomoção foi considerado como “gold standard” para a avaliação dos quatro membros e comparação com o teste das plataformas de força.

5.4.1 Sensibilidade e escore de locomoção

Todos os bovinos que tiveram sensibilidade (n=27) demonstraram na deambulação escore maior ou igual a “2”; porém um dos dois animais descartados do estudo apresentou escore “2”. Assim, o escore apresenta 100% de sensibilidade, 96,55% de especificidade, razão de verossimilhança positivo (RVP) de 27,93, razão de verossimilhança negativa (RVN) de zero e acurácia de 98,21% (Tabela 19).

5.4.2 Sensibilidade e termografia infravermelha

Considerando o valor de “cut-off line” de 30° C para a termografia em cada um dos dígitos dos membros anteriores detectaram-se 76 valores verdadeiros positivos, três (3) falso negativos; 68 verdadeiros negativos e 45 falsos positivos. Assim, a termografia infravermelha apresentou 96,20% de sensibilidade e 60,10% de especificidade. Tendo RVP de 2,5, RVN de 15,83 e acurácia de 78,80% (Tabela 19).

5.4.3 Sensibilidade e plataforma de força

Considerando o valor de “cut-off line” de 24% para a distribuição percentual de apoio nos membros anteriores detectaram-se 26 verdadeiros positivos, sete (6) falsos negativos, 28 verdadeiros negativos e oito (6) falsos positivos. Assim, a plataforma de força apresentou 81,25% de sensibilidade e 82,35% de especificidade. RVP de 4,60, RVN de 4,39 e acurácia de 81,81% (Tabela 19).

5.4.4 Escore de locomoção e plataforma de força

Como tanto o escore de locomoção como a plataforma de força foram avaliados nos quatro membros optou-se também por comparar as duas supracitadas variáveis, fixando o “cut-off line” do escore de locomoção em “2” como “gold standard” e considerando o “cut-off line”, da plataforma de força, como 24%, visto que neste caso empregaram-se tanto os membros anteriores como posteriores. Foram detectados 14 verdadeiros positivos, dois (2) falsos negativos, 13 verdadeiros negativos e quatro (4) falsos positivos. Assim, obteve-se sensibilidade de 87,50% e especificidade de 76,50%. RVP de 3,72, RVN de 6,12 e acurácia de 81,81% (Tabela 19).

Tabela 19.- Índices calculados para a comparação dos testes diagnósticos utilizados para o diagnóstico de laminite nos bovinos após a acidose ruminal.

Índices	Testes Diagnósticos			
	Sensibilidade	Sensibilidade	Sensibilidade	Escore
	X Escore de locomoção	X Termografia	X Plataforma	X Plataforma
Sensibilidade	100,00%	96,20%	81,25%	87,50%
Especificidade	96,55%	60,10%	82,35%	76,50%
RVP	27,93	2,50	4,60	3,72
RVN	*	15,83	4,39	6,12
Acurácia	98,21	78,80	81,81	81,81

*A sensibilidade foi 100%, dessa forma o denominador foi zero.

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

5.5 AVALIAÇÃO DOS AINEs NO TRATAMENTO DA LAMINITE

5.5.1 Temperatura Retal

Não ocorreu alteração na temperatura retal entre os grupos estudados, nem ao longo do tempo dentro de cada grupo (Tabela 20).

Tabela 20.- Media e desvio padrão da temperatura retal (° C) dos bovinos após o tratamento com AINEs do grupo Controle, Flunixin, Cetoprofeno e Meloxicam

Momentos	Grupos				P		
	Controle	Flunixin	Cetoprofeno	Meloxicam	Trat	Tempo	Trat*Tem
TL	38,9±0,3	39,0±0,3	38,7±0,6	38,8±0,4	0,2960	0,0725	0,2385
TT12	38,7±0,6	38,4±0,2	38,3±0,4	38,7±0,6			
TT24	38,6±0,1	38,5±0,1	38,5±0,4	38,9±0,8			
TT36	38,6±0,6	38,7±0,6	38,1±0,1	38,4±0,4			
TT48	38,4±0,2	38,7±0,4	38,4±0,2	38,4±0,4			
TT60	38,5±0,2	38,2±0,2	38,3±0,1	38,4±0,4			
TT72	38,8±0,5	38,3±0,3	38,2±0,2	38,4±0,3			
TT96	38,5±0,3	38,5±0,7	38,4±0,4	38,6±0,3			

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

5.5.2 Teste de sensibilidade

Na avaliação desse teste enfatiza-se que para considerar a ação da terapia como completa os quatro dígitos pesquisados, independente dos anteriormente acometidos, deveriam estar ausentes de sensibilidade.

Os animais do grupo meloxicam apresentaram menor sensibilidade na 72^a h e 96^a h inferior ao grupo controle e flunixin (Tabela 21).

Tabela 21.- Porcentagem de bovinos com sensibilidade nos dígitos anteriores após o tratamento com AINEs dos grupos Controle, Flunixin, Cetoprofeno e Meloxicam.

Momentos	Grupos			
	Controle	Flunixin	Cetoprofeno	Meloxicam
TL	100,00% (6/6)	100,00% (7/7)	100,00% (7/7)	100,00% (7/7)
TT12	100,00% (6/6)	100,00% (7/7)	85,71% (6/7)	100,00% (7/7)
TT24	100,00% (6/6)	100,00% (7/7)	71,40% (5/7)	100,00% (7/7)
TT36	100,00% (6/6)	85,71% (6/7)	57,14% (4/7)	85,71% (6/7)
TT48	100,00% (6/6)	85,71% (6/7)	57,14% (4/7)	85,71% (6/7)
TT60	100,00% (6/6)	71,40% (5/7)	57,14% (4/7)	71,40% (5/7)
TT72	100,00% (6/6) ^A	71,40% (5/7) ^A	57,14% (4/7) ^{AB}	42,85% (3/7) ^B
TT96	100,00% (6/6) ^A	71,40% (5/7) ^A	57,14% (4/7) ^{AB}	14,29 % (1/7) ^B

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significa diferença entre os grupos estudados.

5.5.3 Escore de claudicação

Na tabela 22 estão expostos os resultados do escore de claudicação. No TT72 os bovinos tratados com cetoprofeno tiveram melhor recuperação da claudicação que o grupo controle, ocorrendo o mesmo fenômeno no tempo subsequente (TT96) para os animais medicados com cetoprofeno e meloxicam em relação aos controles (P=0,0245).

Tabela 22.- Porcentagem de bovinos com escore de claudicação maior ou igual a dois nos grupos Controle, Flunixin, Cetoprofeno e Meloxicam.

Momentos	Grupos			
	Controle	Flunixin	Cetoprofeno	Meloxicam
TL	100,00% (6/6)	100,00% (7/7)	100,00% (7/7)	100,00% (7/7)
TT12	100,00% (6/6)	100,00% (7/7)	100,00% (7/7)	100,00% (7/7)
TT24	100,00% (6/6)	100,00% (7/7)	100,00% (7/7)	100,00% (7/7)
TT36	83,33% (5/6)	71,43% (5/7)	71,43% (5/7)	71,43% (5/7)
TT48	83,33% (5/6)	57,14% (4/7)	57,14% (4/7)	57,14% (4/7)
TT60	83,33% (5/6)	57,14% (4/7)	42,86% (3/7)	42,86% (3/7)
TT72	83,33% (5/6) ^A	57,14% (4/7) ^{AB}	14,29% (1/7) ^B	42,86% (3/7) ^{AB}
TT96	83,33% (5/6) ^A	42,86% (3/7) ^{AB}	14,29% (1/7) ^B	14,29% (1/7) ^B

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significa diferença entre os grupos estudados.

5.5.4 Plataforma de força

Na tabela 18 se encontra os resultados, expressos em percentagem, da plataforma de força. Devido ao pequeno número de repetições em cada grupo experimental não foi feita avaliação estatística (Tabela 23).

Tabela 23.- Porcentagem de bovinos com modificação na distribuição de peso após os tratamentos com AINEs segundo o teste de plataforma de força, de acordo com os conceitos de Neveux et al. (2006).

Momentos	Grupos			
	Controle	Flunixin	Cetoprofeno	Meloxicam
TL	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (5/5)
TT48	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (5/5)
TT96	75% (3/4)	100% (4/4)	100% (4/4)	100% (5/5)

. Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

5.5.5 Concentração de cortisol

Quando examinado as médias de cortisol dentro de cada grupo tratado com AINEs detectou-se uma redução destas no decorrer do tempo, ou seja, em relação ao momento inicial no cetoprofeno TT12 e no meloxicam e no flunixin a partir do TT36 ($P=0,0001$). Não existiu tal diferença entre as médias do grupo controle ($P=0,3596$).

A comparação entre grupos detectou menor teor de cortisol sanguíneo nos três grupos que medicados com AINEs que o constatado no grupo controle na TT72 até o final do experimento (Tabela 24).

Tabela 24.- Media e desvio padrão da concentração de cortisol (nmol/L) dos grupos Controle, Flunixin, Cetoprofeno e Meloxicam, após a indução da laminite.

Momentos	Grupos				P		
	Controle	Flunixin	Cetoprofeno	Meloxicam	Trat	Tempo	Trat*Tem
TL	232,0±93,8	209,4±4,0 ^a	202,2±82,7 ^a	200,8±52,4 ^a	0,0357	0,0001	0,3141
TT12	161,1±71,7	105,9±60,6 ^{ab}	92,4±49,6 ^{bc}	131,0±44,1 ^{ab}			
TT24	139,6±113,1	128,0±77,2 ^{ab}	113,1±49,6 ^b	132,7±80,0 ^{ab}			
TT36	105,9±46,9	75,0±44,1 ^b	55,4±41,3 ^{bc}	101,2±55,1 ^b			
TT48	131,3±74,4	81,9±57,9 ^b	57,9±30,3 ^{bc}	83,5±41,3 ^b			
TT60	113,9±102,0	57,9±19,3 ^b	47,7±27,59 ^{bc}	96,8±41,3 ^b			
TT72	126,6±85,5 ^A	52,9±19,3 ^{Bb}	51,8±19,3 ^{Bbc}	55,7±24,8 ^{Bb}			
TT96	103,4±55,1 ^A	56,8±22,0 ^{Bb}	37,2±5,51 ^{Bc}	41,1±11,0 ^{Bb}			

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significa diferença entre os grupos estudados, enquanto letras minúsculas diferenças entre tempo dentro do grupo.

5.5.6 Retorno da alimentação, ruminação e da normalização do estado mental

A avaliação do tempo em horas, expresso em mediana, do retorno parcial da ingestão de alimentos com concomitante movimentação ruminal foi acompanhada nos vários grupos sendo inferior no cetoprofeno e no meloxicam em relação ao grupo controle (P=0,0500). Idêntico resultado foi constatado à normalização do estado mental (P=0,0163) (Tabela 25).

Tabela 25.- Mediana em horas do retorno a alimentação/ruminação e do estado mental nos grupos estudados.

Grupos	Retorno	
	Alimentação/Ruminação	Estado Mental
Controle	90h ^a	120h ^a
Flunixin	54h ^{ab}	84h ^{ab}
Cetoprofeno	24h ^b	24h ^b
Meloxicam	18h ^b	48h ^b

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa diferença entre os grupos estudados.

5.5.6 Concentração de pepsinogênio sérico

Não ocorreu nem dentro de cada grupo como entre eles diferenças significativas nos teores de pepsinogênio sérico (Tabela 26).

Tabela 26.- Concentração de pepsinogênio sérico (U/Tirosina) dos grupos Controle, Flunixin, Cetoprofeno e Meloxicam.

Momentos	Grupos				P		
	Controle	Flunixin	Cetoprofeno	Meloxicam	Trat	Tempo	Trat*Tem
TL	0,28±0,16	0,30±0,13	0,23±0,17	0,32±0,23	0,2206	0,0662	0,8902
TT12	0,26±0,10	0,27±0,22	0,19±0,10	0,37±0,22			
TT24	0,22±0,14	0,26±0,12	0,15±0,09	0,36±0,13			
TT36	0,14±0,04	0,18±0,11	0,22±0,06	0,38±0,19			
TT48	0,21±0,08	0,27±0,12	0,20±0,08	0,40±0,23			
TT60	0,22±0,10	0,26±0,06	0,20±0,05	0,31±0,13			
TT72	0,25±0,08	0,30±0,27	0,27±0,17	0,36±0,19			
TT96	0,23±0,14	0,22±0,15	0,26±0,22	0,29±0,17			

Fonte: (SOUSA, R.S, 2017)

6. DISCUSSÃO

Para a exequibilidade deste trabalho houve a necessidade de realizar uma adaptação inédita do modelo experimental, para indução de laminite, proposto por Thoenner et al. (2004) os quais empregaram vacas de diferentes raças leiteiras, enquanto no presente trabalho utilizaram-se vacas da raça Nelore.

A quantidade de oligofrutose (17g/kg P.V.) sugerida para a indução pelos autores supracitados provocou nos animais-piloto exacerbada acidose ruminal (pH=3,57) acompanhada de pronunciada diarreia profusa e prolongada, o que levou a marcante desidratação, exigindo radical e intensivo tratamento para evitar a morte dos mesmos. Tal resultado traz à baila o estudo comparativo feito por Maruta & Ortolani (2002 a,b) e Ortolani et al. (2010) que induziram acidose láctica ruminal em taurinos e zebuínos e constataram que embora a acidose ruminal fosse idêntica neles o quadro clínico decorrente era diferente, com uma marcante desidratação nos zebuínos e mais pronunciada acidose sistêmica nos taurinos.

Esse insucesso inicial na indução indicou a necessidade de diminuir a dose de oligofrutose empregada, optando-se por redução em 10% (15,3 g/kg P.V.). Como nas primeiras vacas testadas o quadro clínico foi mais brando, provocando posteriormente a desejada laminite manteve-se essa dose de açúcar. Contudo, alguns animais posteriormente tiveram manifestações clínicas intensas que exigiram um ou dois tratamentos adicionais de suporte para evitar que sucumbissem. Assim, para futuro uso deste modelo em zebuínos seria aconselhável um novo estudo piloto com maior redução da dose de oligofrutose a fim de garantir um quadro clínico menos pronunciado acompanhado do surgimento de laminite. Porém deve-se pontuar que Concha et al. (2014) empregando 13 g de oligofrutose para vacas holandesas conseguiu provocar acidose ruminal, mas não logrou êxito em induzir laminite, diferentemente de Bustamante et al. (2015) que logrou êxito utilizando a mesma dose.

Como mencionado anteriormente, parte das vacas induzidas (n=13) necessitou de tratamento sistêmico, o que poderia modificar os resultados ligados à concentração de metabólitos e gases no sangue, medidas do grau de hidratação etc. Assim, na primeira parte do estudo resolveu-se dividir os grupos entre medicados e não medicados.

O momento de maior fermentação ruminal da oligofrutose foi até a 12^a h, idêntico ao descrito por Thoenner et al. (2004) (Figura 3, Tabela 1). A partir daí, o pH ruminal tem uma redução menor, não significativa, até a 18^a h elevando-se de forma expressiva na 24^a h. É importante frisar que embora o comportamento da curva de pH ruminal entre o presente

trabalho e o de Thoenner et al. (2004) seja semelhante o menor valor médio desta variável obtido pelos autores estrangeiros foi de pH 4,4 enquanto que no atual este foi de 4,02. Isso reforça a afirmação de Ortolani et al. (2010) que os zebuínos seriam mais predispostos à acidose ruminal que os taurinos.

O comportamento do pH ruminal não foi diferente entre fêmeas medicadas ou não, contudo o pH sanguíneo o foi, sendo bem mais baixo nos animais tratados, identificando neles uma expressiva acidose sistêmica. Identificou-se ainda que esse menor pH sanguíneo só foi correlacionado positivamente ($R^2 = 0,8419$) com o pH ruminal nos animais medicados (Figura 4). Tais resultados indicam que ocorreu maior passagem de ácidos do rúmen para o sangue nesses bovinos que exigiram tratamento. Segundo Willians & Mackenzie (1965) a principal condição que favorece a absorção ruminal de ácido láctico é a presença de movimentação ruminal durante a acidose, fatos estes vistos no experimento de Maruta & Ortolani (2002b) que com isso argumentaram porque os taurinos foram mais predispostos à acidose sistêmica, que os zebuínos. Porém, no presente experimento todos os animais induzidos apresentaram atonia ruminal na 12^a h e na hora anterior avaliada (6^a h) cerca de 60% dos dois grupos tinha presença de contração ruminal (Figura 8). Outros fatores interferem positivamente na absorção de ácidos orgânicos do rúmen, entre eles, a alta concentração destes, o baixo pH e a osmolaridade normal (OWENS et al., 1998). A confrontação da osmolaridade ruminal entre os bovinos medicados ou não na 6^a h (Tabela 2) indica que esta era menor nos medicados ($P=0,0254$), e mais próxima da osmolaridade ruminal considerada normal (240 a 300 mOsm/L) (OWENS et al., 1998), facilitando a absorção dos ácidos ruminais neste grupo. Fortalecendo essa hipótese constatou-se que a diferença da osmolaridade sanguínea entre o tempo basal e a 12^a (início do tratamento da maioria dos animais) estava correlacionada negativamente com o pH sanguíneo apenas no grupo medicado (Figura 6).

Embora tenha ocorrido uma passagem de ácidos do rúmen para o sangue nos animais medicados, ficou pronunciada na 12^a h uma perda de fluidos do sangue para o sistema gastrointestinal, evidenciado pelo destacado quadro de desidratação nos bovinos medicados, visto que ocorreu um aumento na 12^a h do déficit de volume plasmático nos animais medicados em confrontação com os não medicados (Tabela 7). Um fato que chamou a atenção de todos que acompanharam o experimento foi que na 6^a h uma parte significativa dos animais não medicados (8/14) já apresentava diarreia, inclusive com constatação de fezes diarreicas no piso das baias, fato não tão evidente nas fêmeas medicadas. Segundo, Ortolani et al. (2010) a presença precoce de diarreia nos bovinos com acidose ruminal é sinal de bom

prognóstico, pois é indicativo que os líquidos que estavam sequestrados no rúmen saíram do órgão e permitiram que parte dos fluidos perdidos fossem reabsorvido nos intestinos, mitigando os efeitos da desidratação.

Sem dúvida, nos dois grupos existiu passagem de líquidos do sangue para o rúmen, evidenciado pela presença anormal de fluido ruminal acima do terço médio da fossa paralombar esquerda que fazia com que se vertesse espontaneamente este conteúdo quando da abertura da cânula para coleta de material. No grupo não medicado na 6^a h, e em menor grau no medicado, já ocorria um aumento de osmolaridade do conteúdo ruminal, mas nos tempos subsequentes constataram-se queda numérica nos valores desta variável. Embora o pH ruminal e a acidez titulável da 12^a h e 18^a h indicassem um acúmulo de ácidos no rúmen acredita-se que o aumento da osmolaridade tenha provocado inicialmente entrada de líquidos sistêmicos os quais determinaram maior diluição dos fluidos resultando em posterior menor osmolaridade. Também deve ter influenciado na diversidade dos resultados da osmolaridade ruminal, no decorrer da acidose, a altíssima ingestão de água observada nos bovinos não medicados quando do retorno do exame clínico para as baias. Nas fêmeas medicadas esse fenômeno era menos pronunciado, ocorrendo de forma mais típica após a melhora promovida pela terapia. Infelizmente, o consumo individual de água não foi mensurado. Segundo Thoenes et al. (2004) todos os bovinos induzidos ingeriram nas primeiras horas do quadro entre 50 a 80 L de água.

A presença de diarreia e a alta ingestão de água devem ter influenciado a existência de baixíssima correlação ($r=-0,05668$) encontrada entre a osmolaridade e o lactato ruminal (Tabela 3). Estranhamente, numa revisão sobre o assunto Owens et al. (1998) sugeriram que a alta ingestão de água não interferiria na diminuição da osmolaridade ruminal devido a passagem de conteúdo ruminal para segmentos posteriores.

Os trabalhos com uso de altas doses de oligofrutose na indução de laminite focaram mais seus resultados nas alterações sistêmicas e na laminite que as modificações no ambiente ruminal (THOEFNER et al., 2004; DANSCHER et al., 2010, CONCHA et al., 2014). O presente trabalho levantou outros elementos da fermentação ruminal. Confirmou os resultados de Concha et al. (2014) que o ácido láctico parece ser o principal gerador da acidose ruminal. Porém, no presente trabalho o coeficiente de determinação entre o ácido láctico L ruminal e o pH ($R^2=0,25$) e a acidez titulável ($R^2=0,17$) foram bastante baixos sugerindo que outros ácidos também seriam responsáveis pela acidez nesse ambiente. Embora na acidose láctica ruminal o ácido láctico tenha um papel preponderante na geração do quadro, os ácidos graxos

de cadeia curta também representam um componente importante na composição dos ácidos acumulados no rúmen (OWENS et al., 1998). Ainda segundo este autor, na acidose láctica a quantidade de lactato D corresponde a cerca de 38% do lactato total produzido. Infelizmente, não foi possível, até o presente momento, determinar tanto os teores de AGCC como o de lactato D ruminal, os quais poderiam confirmar a hipótese levantada acima.

A acidez titulável de certa forma mede o total de ácidos gerados no rúmen, independente da influência de diluição ruminal, pois a acidez aumentou também no auge da acidose (12^a h e 18^a h) (Tabela 1). Ocorreu uma alta correlação negativa entre o pH e a acidez titulável ($r=-0,66$). A discreta elevação do pH (Tabela 1) e a diminuição da acidez titulável na 24^a h pode ser fruto do exaurimento da oligofrutose para fermentação e a maior passagem de conteúdo ácido para os segmentos posteriores do aparelho gastrointestinal, como visto pelo aumento do pH fecal nesta mesma hora (Tabela 14).

Com a queda do pH ruminal, pela acidose, ocorre uma série de modificações na flora ruminal por meio do quase desaparecimento de uma gama de bactérias Gram negativas, entre elas as redutoras de oxigênio e consumidoras de lactato, e multiplicação exponencial de bactérias Gram positivas produtoras de ácido láctico (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). O quase desaparecimento das bactérias redutoras de oxigênio faz com que se acumule este gás no rúmen. Duas provas realizadas neste presente experimento mensuram indiretamente tanto o acúmulo de oxigênio como o quase desaparecimento de bactérias redutoras: o potencial de oxido-redução (POR) e o tempo de redução do azul de metileno (TRAM) (Tabela 1).

Tanto os resultados do POR como os do TRAM identificaram um significativo aumento dessas variáveis no decorrer da acidose, com destaque para as 12^a h e 18^a h, no auge do processo, diminuindo de alguma forma na 24^a h (Tabela 1). O POR mede a eletrovoltagem dentro do meio e quanto mais alto e positivo for este valor, maior o grau de oxidabilidade e o teor de oxigênio no meio ruminal (SOARES et al., 2006). Já o TRAM mede a capacidade de bactérias consumidoras de oxigênio de reduzirem o azul de metileno, apresentado na sua forma oxidada, sendo um tempo baixo quando abundam essas bactérias e mais alto na escassez ou na menor atividade destas (SOARES et al., 2006). A correlação entre o POR e o TRAM no presente trabalho foi alta ($r=0,69643$) indicando a boa relação entre estas provas. Assim, como era de se esperar, a acidose ruminal por oligofrutose provoca sérias modificações no ambiente ruminal, semelhante ao que acontece na acidose por outros carboidratos solúveis mais tradicionais (OLIVEIRA et al., 2016).

Principalmente, nos bovinos medicados ocorreu uma nítida leucopenia nos animais no T18 e no T24 (Tabela 7). Coincidentemente, nestes momentos coexistiu um aumento dos teores de cortisol (Tabela 4) e certamente indícios de reação inflamatória superaguda tanto pela ruminite, constatada pela inspeção, como pela presença de laminite, a partir da 18^a h em alguns casos, mas devidamente aparente na 24^a h, em boa parte dos animais. Dois elementos, não analisados, poderiam provocar a leucopenia: os linfócitos e os neutrófilos. É reconhecido que um estímulo nas secreções de cortisol ou aplicações de seus análogos causam diminuição no número de linfócitos devido a menor capacidade proliferativa destas células. Mas, também é reconhecido que inflamações superagudas provocam neutropenia temporária por cerca de 48 h, por supressão na granulopoiese ou por redução devido à alta demanda (WEISS; WARDROP, 2010). Com efeito, numa análise posterior do número de leucócitos constatou-se uma leucocitose ao redor da 60^a h de indução (dados não exibidos).

A acidose por oligofrutose certamente provocou nos animais inflamação e dor, pois em parte deles foi constatado ruminite e posteriormente laminite, na grande maioria. O cortisol é considerado um marcador específico de estresse que pode ser oriundo de um processo inflamatório, de dor intensa ou de excessiva manipulação ou situação de ameaça ao animal (MORMÈDE et al., 2007). Mesmo antes de se desenvolver a laminite as fêmeas tiveram um grande incremento na concentração de cortisol, quintuplicando no decorrer das primeiras 24 h de indução (Tabela 4) Tanto os animais medicados com os não medicados apresentaram aumentos similares nas concentrações de cortisol indicando que não ocorreu influência marcante da desidratação, da acidose metabólica, nem da manipulação extra para executar o tratamento. De certa forma, esses presentes resultados contradizem os achados de Mormède et al. (2007) que afirmam que a simples manipulação ou coleta de material em um animal provoca o aumento da secreção de cortisol.

Os presentes resultados podem ser comparados aos obtidos por Bustamante et al., (2015) que induziram quadro de acidose em novilhas holandesas com 13g/kg de oligofrutose, porém nestas a concentração de cortisol apenas duplicou durante as 24^a h da indução. Embora os autores chilenos tenham usado uma quantidade de oligofrutose ligeiramente inferior (-15%), ao presente trabalho, é possível fazer uma ilação que o aumento exponencial do cortisol seja advindo da acidose mais intensa nos zebuínos e possivelmente que o estresse nos animais dessa raça seja mais pronunciado que nos taurinos.

Os animais medicados comprovadamente tiveram maior desidratação, já devidamente discutida, assim como uma acidose metabólica mais destacada que os não medicados (Tabela

8). O grau de acidemia nos medicados foi considerado relativamente grave, visto que o pH médio atingiu no T18 o valor de 7,18 e os teores de bicarbonato e BE 8,7 mmol/L e - 19,5, respectivamente (Tabela 9) (ORTOLANI, 2003). Também foi indicador da acidose metabólica o “anion gap” que aumentou 62,1% no grupo medicado, atingindo valores máximos no T18 e T24 (Tabela 11). Isso ocorreu devido à diminuição dos teores de bicarbonato, provocado pela acidose metabólica, acompanhado da manutenção das concentrações de sódio e potássio (Tabelas 10 e 11).

Existiu apenas nos animais medicados uma média influência ($R^2=0,48$) do pH sanguíneo no aumento da osmolaridade neste fluido na 12^a h (Figura 6) que seria uma prova a mais que o grupo medicado absorveu mais íons H^+ do rúmen gerando os transtornos que requereram o intenso tratamento dos mesmos.

Porém, o fato alvissareiro nas variáveis hemogasométricas foi à diminuição significativa (-35%) na pCO_2 sanguínea, no auge da acidose metabólica, interpretada como uma nítida compensação respiratória à acidose metabólica (Tabela 9). Usualmente, na acidose láctica ruminal, induzida por excesso de sacarose, não existe tal compensação respiratória, por motivos desconhecidos (RODRIGUES et al., 2011).

A desidratação provavelmente foi à causa esperada do aumento da concentração de creatinina e ureia sérica na 24^a h nos animais medicados, os quais apresentaram maiores teores que os bovinos não medicados (Tabela 5). Classicamente, a desidratação provoca menor fluxo sanguíneo renal e conseqüentemente menor filtração desses metabólitos aumentando suas concentrações no sangue (KANEKO et al., 1997).

A desidratação foi mais intensa nos animais medicados nos quais foram detectados, em maior número, sintomas como muflo seco, enoftalmia e extremidades frias, indicativas de crescentes graus de desidratação (RADOSTITS et al., 2007). A secreção nasal surgiu de forma abundante com características seromucosa ou mucocatarral, podendo aparecer em uma ou duas narinas, geralmente na 12^a h em boa parte das rezes.

O quadro clínico durante a indução da acidose foi o esperado e clássico descrito nos bovinos com acidose láctica ruminal de grau intenso. Assim, tanto nos animais medicados como nos não medicados ocorreu uma expressiva taquicardia (Tabela 12), em especial quando do surgimento de desidratação e da acidose sistêmica as quais desencadeiam um estímulo simpático que gera o fenômeno (ORTOLANI et al., 2010). Possivelmente, tenha influído também na taquicardia uma redução na pressão arterial presente em quadros de hipovolemia

levando a como resposta compensatória uma taquicardia sinusal, tal quadro já foi descrito em bovinos com acidose láctica ruminal (ORTOLANI et al., 2010).

Outro sinal muito evidente foi a ataxia, presente em todos os casos na 12^a h, nos 27 animais do estudo (Tabela 13). Embora não fosse discriminado nos resultados, as fêmeas com maior depressão e mais intensa desidratação e acidose sistêmica apresentaram ataxia mais pronunciada. Poder-se-ia relacionar esta ataxia como consequência da laminite, porém os outros dois bovinos descartados do experimento, por ausência de problemas podais, também manifestaram relutância de caminhar. Esse sintoma é bastante frequente em bovinos com acidose láctica ruminal induzido com sacarose, sendo que boa parte destes não apresentam laminite, o que leva a crer que esta ataxia está relacionada diretamente com os efeitos sistêmicos deletérios provenientes da própria acidose ruminal.

Um fato interessante surgido na indução com oligofrutose foi à detecção na 6^a h, atingindo seu ápice na 12^a h, de um quadro de hipertermia tanto nos animais medicados como nos não medicados (Figura 7). Como essa hipertermia foi acompanhada de taquipnéia, taquicardia, congestão das mucosas oculares, entre outras evidências, sugere-se que estas manifestações caracterizem síndrome febre.

Considerando a amplitude normal de temperatura retal de bovinos de corte entre 38,1° C a 39,1° C e os valores médios máximos obtidos na 12^a h (39,6° C) caracteriza-se que o gado induzido teve uma febrícula efêmera, pois já na 18^a h a temperatura descendeu, indicando assim que curva térmica teve curto acme e rápida desfervescência (YAGÜE et al, 2005; BARCA JÚNIOR, 2010). Tal descrição clínica foi encontrada similarmente por Lohuis et al. (1988) que injetaram diferentes quantidades de lipopolissacarídeos (LPS) de origem bacteriana em gado bovino adulto e constataram hipertermia a partir da 3^a h da inoculação, sem presença de acme e volta a normotemperatura dentro de oito horas.

É interessante comparar o quadro clínico entre a indução da acidose láctica por sacarose e por oligofrutose, em bovinos. Na primeira não foram descritos quadros de hipertermia, no decorrer do processo, diferente do observado no presente trabalho (RODRIGUES, 2009). É digno de nota que é raro na indução da acidose por sacarose em bovinos o surgimento de laminite, fato inverso quando se empregou a oligofrutose. Assim, pelos achados clínicos de hipertermia de curta duração e de alta frequência de laminite supõe-se fortemente que na indução com oligofrutose ocorra a alta geração de LPS no rúmen com absorção destes compostos levando o desencadeamento de problema podal requerido.

A ruminite, constatada por inspeção, esteve mais presente nos animais tratados que não tratados (Tabela 13). A ruminite foi constatada na 24^a h, momento em que o conteúdo líquido ruminal já não estava tão pronunciado e o abdômen não se encontrava tão distendido, atingindo seu máximo na 12^a h (Tabela 13). Segundo Owens et al. (1998) a ruminite pode ser derivada da pronunciada queda no pH, aumento exagerado de osmolaridade do conteúdo ruminal e passagem exacerbada de fluidos do sangue para o rúmen, provocando “inchaço” nas células da papila ruminal. Embora não tenham ocorrido diferenças marcantes entre o pH e a osmolaridade ruminal entre os grupos medicados ou não, existiu, sem dúvida, um maior processo de passagem de fluidos do sangue para o rúmen nas rezes medicadas, evidenciado pelo maior número de bovinos com distensão do flanco esquerdo (Tabela 13).

O presente modelo foi bastante exitoso com 93,1% de sucesso na indução de laminite, enquanto que Thoenner et al. (2004) atingiu 66,7% e Danscher et al. (2009) 100% em vacas taurinas. Thoenner et al. (2004) verificaram pela primeira vez sintomas evidentes de laminite com 33^a h de indução, Danscher et al. (2009) constataram após a 30^a h. No presente trabalho, o surgimento de laminite ocorreu mais precocemente (até 24^a h) em 27,58% dos casos, com uma distribuição dos demais casos da 36^a a 72^a h. A precocidade do aparecimento dessa enfermidade sugere que as fêmeas zebuínas seriam mais predispostas à laminite, algo a ser melhor avaliada numa comparação com fêmeas taurinas, criadas em nosso meio, submetidas ao mesmo modelo experimental.

Por uma questão de critério e de facilidade de exame, no presente experimento foi considerado como “gold standard” de constatação de laminite a reação positiva de sensibilidade podal. Embora Danscher et al. (2009) tenham adotado esse teste seletivo em seu trabalho também analisam criticamente o mesmo, definindo-o como subjetivo, pois depende da pressão aplicada pelo operador e a disposição do animal cooperar. Nesse presente estudo, embora fossem empregados bovinos da raça Nelore, não existiu dificuldade na realização do teste em animais bem contidos em tronco, e como um único operador realizou a prova procurou-se empregar força semelhante na pinça podendo identificar com nitidez a reação positiva ou negativa. Assim, o maior empecilho parece ser a necessidade de se ter um tronco contendor adequado, nem sempre disponível nas fazendas.

Segundo definição clássica e sintética de laminite, provocada por acidose láctica ruminal, esta enfermidade é um processo inflamatório podal de caráter asséptico e com características sistêmicas, não discriminando a frequência de quais dígitos ou membros são mais afetados (NOCEK, 1997; NICOLETTI, 2004; VAN AMSTEL; SHEARER, 2006;

GREENOUGH, 2007; RADOSTITS et al., 2007). Tal definição simples dá a entender que pelo fato de ser sistêmico os oito dígitos dos quatro membros seriam igualmente acometidos. Mesmo nos trabalhos dinamarqueses mais específicos de Thoenner et al. (2004) e Danscher et al. (2009) os resultados não demonstraram quaisquer elementos sobre a frequência de laminite nos dígitos e membros.

Alguns dados do presente trabalho analisam mais profundamente essa frequência de laminite. Embora o teste de seleção para a presença ou não de laminite foi o de sensibilidade dolorosa nos dígitos anteriores, não analisando os dígitos dos membros posteriores, o exame do escore de locomoção por filmagem acompanhou a presença de claudicação em todos os membros, oferecendo uma visão mais abrangente do quadro geral. Nesse último teste detectou-se que a grande maioria dos animais (84,6%) apresentou claudicação em algum membro anterior, porém em 15,4% dos casos a manqueira não envolveu, de forma alguma, nenhum membro anterior, sendo que em duas vacas os dois posteriores estiveram concomitantemente alterados.

Esses dados põem em questionamento a teoria que a laminite é um quadro sistêmico podal. Nos 15,4% dos casos, com não envolvimento dos dígitos anteriores, certamente existiu o desenvolvimento de um processo doloroso e inflamatório que provocou a claudicação nos membros posteriores, sem envolver os anteriores. Porém, o teste de reflexo álgico nesses animais foi sensível o suficiente para detectar uma reação dolorosa, de menor monta, num dígito aparentemente não acometido. Isso indica que, de certa forma, o processo da laminite asséptica é sistêmico, mas num exame clínico não detalhado e completo ela pode ser localizada, exibindo apenas os sintomas mais exuberantes, os quais sobrepõem sinais mais sutis, que passariam despercebidos se não pesquisados. O motivo do porque isso ocorre ainda necessita ser melhor desvendado. Predisposição das úngulas de um membro já previamente sobrecarregadas ou injuriadas? Presença anormal de distribuição de peso entre os dígitos de um membro ou entre os membros? Presença de sinovite intensa no membro afetado? Outras situações?

A reação álgica positiva nos quatro dígitos anteriores demonstrou semelhança entre as úngulas direita e esquerda, porém ela esteve mais presente nos dígitos laterais que mediais. Esse resultado contrapõe as descrições em laminite que nos membros anteriores o dígito mais afetado é o medial, inclusive do ponto de vista álgico (SHEARER & VAN AMSTEL, 2003; LIMA, 2009).

O relato de polisinovite na articulação tarsocrural nos bovinos com laminite induzida por oligofrutose é altíssima surgindo entre a 18ª e 30ª hora de indução, mas com curta duração (DANSCHER et al., 2010). No presente trabalho, 26,9 % das fêmeas foram acometidas de forma semelhante em todos os grupos experimentais, com a mediana de surgimento do problema na 66ª h de indução (24 – 96 h). Não existiu diferença entre os bovinos controle e os tratados com AINEs, desenvolvendo o processo em alguns animais de todos os grupos. Porém, é digno de nota que nos bovinos controle não aconteceu uma remissão do aumento articular no decorrer do quadro, mas nas cinco fêmeas tratadas ocorreram flutuações de perímetro no decorrer dos três dias de tratamento, com volta à normalidade em três casos (2 de flunixin 1 de meloxicam) e constatação de aumento em outros dois medicadas com cetoprofeno. O grupo dinamarquês constatou por exame bacteriológico que essa polisinovite tem um caráter asséptico com aspecto variável, contendo células inflamatórias e fibrina. Danscher et al. (2010) constataram aumento de leucócitos sanguíneos generalizados no decorrer da indução. Embora não mostrado, os dados dos presentes animais tenderam a apresentar maior número de leucócitos nas horas que antecederam o aumento do perímetro das articulações. O presente trabalho de certa forma mostra que o uso dos AINEs tem um efeito minimizador da polisinovite.

Os resultados da termografia infravermelha indicaram uma homogeneidade entre os dígitos nos animais hígidos e laminíticos, porém ocorreu em cada um dos dígitos laminíticos um aumento significativo de temperatura em relação ao momento basal ($P=0,0001$) após a indução da laminite (Tabela 16). Esse aumento de temperatura local se coaduna com a respectiva reação algica gerada pela agressão de endotoxinas e o consequente processo inflamatório no local (NIKKHAH et al., 2005; GLOSTER et al., 2011; ALSAOD & BÜSCHER, 2012). Esses resultados aparentemente positivos e convincentes levam a uma falsa impressão que o teste tem qualidades excepcionais, os quais serão discutidos mais à frente quando da comparação dos vários métodos diagnósticos empregados.

A plataforma de força indicou que não existiu diferença de distribuição de peso entre os quatro membros hígidos (Figura 9), mas identificou que a somatória dos membros anteriores era superior aos posteriores ($P=0,0264$). Idêntico resultado foi obtido em vacas leiteiras secas, invertendo o quadro quando estas estão no decurso de pesada lactação ou em gestação avançada (PHILLIPS, 2002).

Os membros anteriores afetados com laminite suportaram menor peso em seus eixos ($P=0,0001$) quando comparados com os respectivos membros no tempo basal (Tabela 17).

Porém, tal fato não aconteceu com os membros posteriores laminíticos, sendo semelhantes ($P=0,2240$) aos hígidos antes da instalação do processo (Tabela 17). A mesma condição foi descrita por Neveux et al. (2006) que argumentaram que quando os membros anteriores são afetados existe uma transferência natural de peso para os posteriores, mas quando estes últimos são acometidos não ocorre tal transferência para os membros anteriores. Essa situação predispõe com que a somatória do peso dos posteriores injuriados seja semelhante aos hígidos.

Como era de esperar, a distribuição do apoio nos animais laminíticos foi sempre inferior no membro afetado que o seu respectivo contralateral ($P=0,0001$), quer seja no eixo anterior como posterior confirmando uma transposição de apoio descrito de Neveux et al. (2006) e Chapinal et al. (2010) que empregaram equipamentos semelhantes (Tabela 18).

A comparação dos métodos diagnósticos empregados trouxe resultados auspiciosos. Sem dúvida, tendo como padrão ouro a sensibilidade dolorosa, os melhores resultados foram obtidos com o escore de locomoção, pois este teve uma sensibilidade de 100% e especificidade de 96,55%, acurácia de 98,21% e uma altíssima razão de verossimilhança positiva (27,93). A especificidade não alcançou 100%, pois uma única vaca, descartada do estudo, não apresentou dor na prova de sensibilidade, mas demonstrou no escore visual claudicação de grau leve num membro posterior, constituindo-se assim um falso positivo. Graças aos bons resultados descritos acima sugere-se que tanto a sensibilidade dolorosa como o escore de locomoção possam ser adotados como padrão ouro em futuros experimentos ou decisões.

A despeito dessa última afirmação, Danscher et al. (2009) embora utilizassem o escore de locomoção como padrão ouro o questiona da sua validade, pois adota critérios subjetivos e mesmo quando leva em consideração uma avaliação meticulosa continua a ser vulnerável às idiosincrasias do observador. Mas, conclui que continua sendo o melhor método de avaliação para diagnóstico na prática. Mesmo assim, esses autores afirmam que ainda é necessário o desenvolvimento de outro teste que seja confiável, economicamente viável, objetivo e sensível para realizar um rápido diagnóstico de laminite.

Frente as ponderações de Danscher et al. (2009) testaram-se outros dois métodos alternativos diagnósticos, no presente trabalho. Um deles empregou a termografia infravermelha. O primeiro desafio a ser contornado era quanto a linha de corte discriminatória entre a higidez e a morbidez. Alguns trabalhos europeus adotaram 27° C como linha de corte, indistinguível para todos os dígitos (STOKES et al., 2010; RENN et al., 2014). Porém, todos

os dados médios, obtidos nos dígitos dos membros das fêmeas hípidas, foram superiores a linha de corte adotada pelos europeus (Tabela 16). Por outro lado, os valores médios dos animais mórvidos ficavam na faixa dos 33,4° C, com um desvio-padrão em torno de 3,0. Frente a isso e considerando nosso clima tropical e a realização do experimento no mês de abril de 2016, quando a temperatura média foi de 28° C na cidade de Pirassununga, optou-se por fixar a linha de corte em 30° C.

Essa decisão fez com que fosse obtida uma sensibilidade muito alta (96,2%), porém uma especificidade abaixo do esperado (60,17%), reduzindo o valor da acurácia de 75% e interferindo tremendamente na razão de verossimilhança positiva (2,5) e provocando um alto valor de razão de verossimilhança negativa (15,83). Interferiu na baixa especificidade a presença de muitos falsos positivos entre os animais hípidos. Para entender melhor essa frequência calculou-se o coeficiente de variação (C.V.) médio dos valores basais (27,8±4,6; C.V.=16,55%) e dos animais laminíticos (33,35±2,9; C.V.=8,69%) e constatou-se que o C.V. dos hípidos foi 47,5% maior que dos mórvidos, indicando uma mais evidente dispersão dos dados e fazendo com que os valores mais altos basais ultrapassassem em grande número a linha de corte, praticamente não ocorrendo isto nos mórvidos, devido ao baixo C.V. e a distância confortável da maioria dos resultados da linha de corte.

O terceiro teste analisado foi o da plataforma de força. Embora vários trabalhos empregassem esse teste nenhum deles propôs um valor de linha de corte (NEVEAUX et al., 2006; RUSHEN et al., 2006; CHAPINAL et al., 2010). Para se determinar o ponto ideal de corte foram empregados nos cálculos diferentes valores-base. Dentre os calculados chegou-se a 24%, muito próximo dos valores médios dos animais hípidos e sensível o suficiente para detectar situações de menor apoio em membros injuriados. Também foi fundamental na interpretação da positividade ou não deste teste os preceitos emanados por Neveaux et al. (2006), de comportamento na distribuição de peso nos bovinos com injúria podal. A sensibilidade (81,25%) e especificidade (82,35 %) obtidas foram boas, o que determinou uma acurácia acima de 81,8%. Alguns animais foram considerados como falsos negativos, pois na maioria deles as injúrias acometiam mais os membros posteriores não coadunando-se com surgimento de dor nos dígitos dos membros anteriores. Os falsos positivos surgiram em boa parte de vacas que se apoiaram em um dos membros anteriores com valores ligeiramente inferiores a 24%. É possível que um tempo mais longo de leitura, em torno de 1 min, possa diminuir a frequência do surgimento de falsos positivos e negativos, dando tempo para que o

apoio dos membros seja mais estável, diminuindo assim possíveis resultados decorrentes da oscilatória do apoio.

Também confrontaram-se os resultados da plataforma de força com o escore de locomoção, sendo este último o padrão-ouro. Os resultados dos índices epidemiológicos foram muito semelhantes aos obtidos com a sensibilidade dolorosa. A causa do surgimento dos falsos positivos foi parecido com o explicitado acima, enquanto que os dos falsos negativos o apoio foi muito maior nos membros afetados que nos hígidos.

A escolha do melhor método deve ser feita sob os conceitos e virtudes de cada teste como mencionado por Danscher et al. (2009), ou seja: sensibilidade, objetividade, viabilidade e confiabilidade. Os resultados obtidos não deixam dúvida que dentre os três métodos estudados o melhor deles é o escore de locomoção, que não tem custo, é viável e muito sensível, mas tem como seu calcanhar de Aquiles a objetividade, já anteriormente discutida, inclusive com a opinião dos autores dinamarqueses.

No presente trabalho, os observadores tiveram um pouco mais de dificuldade no diagnóstico da presença de claudicação ao vivo que por meio da sequência de filmagens, com a possibilidade de rever por muitas vezes a cena. Também foi opinado pelo grupo executor a importância da experiência adquirida dos observadores para tornar menor a subjetividade do método. Tal opinião também foi compartilhada pelo grupo de O'Callaghan et al. (2003). Assim, para um exame adequado "in loco" sugere-se que esta possibilidade de filmagem seja empregada na prática veterinária.

Os presentes resultados indicam claramente que na possibilidade de se recomendar um segundo método alternativo optar-se-ia pela plataforma de força, em relação à termografia infravermelha. A maior evidência é fornecida pelos índices epidemiológicos (Tabela 19). Embora a sensibilidade da termografia seja evidentemente superior à da plataforma, no índice de especificidade o conceito se inverte. Para dirimir tal contraste foram também calculados outros índices que medem a qualidade do teste diagnóstico para identificar os resultados corretos, entre eles a acurácia e a razão de verossimilhança positiva (RVP) e a razão da verossimilhança negativa (RVN) (Tabela 19). Na comparação da acurácia não existiu uma diferença tão evidente entre os dois métodos, mas isso se tornou mais factível quando da análise do RVP e principalmente do RVN. Quanto mais alto for o RVP e menor o RVN melhor a qualidade do teste (SMITH, 1991, MASSAD et al., 2004). Tanto no RVP como no RVN melhores resultados foram obtidos com a plataforma de força (Tabela 19).

Os dois métodos em questão apresentam virtudes e defeitos. O principal predicado do termógrafo é a facilidade da execução do teste, que não necessita contenção complexa do animal, que fornece um resultado imediato preliminar, um pouco menos preciso, além do baixíssimo custo do exame. A inconveniência é o custo do equipamento que atualmente gira em torno de US\$ 41.000,00, além do preço de um microcomputador para uma análise mais minuciosa dos dados.

A plataforma de força tem como atributos positivos a precisão dos seus resultados, com leitura imediata a baixíssimo custo, podendo ter uma regulação da frequência e tempo da leitura. Porém, várias desvantagens podem ser computadas no seu uso. A primeira delas é o pequeno tamanho de suas placas, o que tornou difícil o posicionamento dos membros do animal sobre elas e requereu em alguns casos mais de 20 min para aloca-las corretamente. Para resolver este problema foi sugerido ao fabricante que as mesmas em vez de terem 50 cm x 30 cm passassem a ter no mínimo 70 cm x 50 cm. Outro aspecto operacional que requereu uma pequena adaptação foi à implantação e encaixe das placas num tablado resistente e plano apoiado sobre o piso de um brete especial (Figura 2). O custo do equipamento foi de US\$ 16.000,00. Se comparado com o termógrafo, a operacionalidade da plataforma é bem mais complexa, pois pode colocar em risco o operador, principalmente quando manipula animais indóceis. As placas quando molhadas, por exemplo por urina, podem se deteriorar, necessitando num futuro equipamento de uma proteção especial sobre as mesmas. É possível que o surgimento de alguns resultados falsos positivos ou negativos tenham surgido do pequeno tempo (10s) de leitura da distribuição de peso. Finalmente, cita-se a necessidade da leitura dos dados num microcomputador acoplado ao equipamento.

Um dos principais objetivos do trabalho foi a de comparar alguns medicamentos à base de AINEs mais empregados na rotina clínica para o tratamento da laminite, com diferentes mecanismos de ação. O primeiro cuidado que se teve foi à avaliação do possível efeito que o tratamento com bicarbonato, para a correção da acidose metabólica, poderia ter na ação dos diversos AINEs. Tomou-se essa providência, pois os AINEs são ácidos fracos os quais podem ser mais excretados pelos rins, pelo filtrado tubular, quando eles são tamponados no sangue, por exemplo por bicarbonato, podendo assim diminuir suas concentrações no organismo (TASAKA, 2017).

Listaram-se os 13 animais infundidos com bicarbonato e em seguida medicados com algum AINEs, verificando-se também o tempo decorrido entre os dois tratamentos. Com exceção de três casos, todas as fêmeas tiveram intervalos de tratamentos superiores a 24 h, no

qual o bicarbonato injetado não mais se encontrava na corrente, em especial de bovinos muito acidóticos em que esse tampão é rapidamente dispendido (LEAL et al., 2007).

Dos três casos um apresentava intervalo de 6 h (medicado com cetoprofeno) e dois de 12h (tratados com flunixin e meloxicam, respectivamente). Na rês em que se empregou o cetoprofeno, o pH sanguíneo no momento do tratamento com AINE era inferior a 7,3 (7,262), mas seu estado geral estava bem melhor que seis horas antes, quando do início do tamponamento, optando-se pela não realização de uma nova dose de tampão. No supracitado pH o bicarbonato empregado foi todo utilizado no tamponamento não sendo disponível para a combinação com o AINE empregado. Nos outros dois casos, resultados parecidos ocorreram com o pH sanguíneo ligeiramente acima de 7,3 (7,305 e 7,321). Como em nenhum caso houve interferência do tamponamento no metabolismo dos AINEs excluiu-se esse cofator de todas as análises posteriores que avaliaram a eficiência dos tratamentos.

Não existem elementos comprobatórios que os AINEs interferiram nos efeitos diretos da acidose na depressão do apetite, porém é fato que esses medicamentos agiram, com intensidades diferentes, no controle da dor podal. Enquanto que no grupo controle a presença de sensibilidade dolorosa foi constatada até a 96^a h, no grupo meloxicam ocorreu à minimização do fenômeno já na 72^a h, mantendo este status na 96^a h, sendo em todos os momentos foi mais eficiente que o flunixin (Tabela 21). Resultados semelhantes também foram verificados no efeito desses tratamentos no escore de locomoção, mas com a atenuante que na 96^a h o grupo flunixin promoveu diminuição de claudicação de forma análoga aos outros dois AINEs (Tabela 22).

Para compreensão desses resultados há necessidade de rever brevemente os elementos participantes na cascata da reação inflamatória e ação farmacológica de cada um dos AINEs citando suas ações anti-inflamatória, antialgica e antipirética. Os anti-inflamatórios atuam basicamente nas enzimas ciclo-oxigenase 1 (COX-1) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e lipo-oxigenase (LOX). Essas enzimas desdobram o ácido araquidônico produzindo diferentes substâncias inflamatórias. A COX-1 e a COX-2 geram várias prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, enquanto que o LOX origina os leucotrienos. As enzimas citadas não estão uniformemente distribuídas nos tecidos, assim o COX-1 se encontra mais abundantemente no sistema gastrointestinal, renal e plaquetas participando de mecanismos fisiológicos, enquanto que a COX-2 se encontra em poucos órgãos, mas sua expressão pode ser iniciada pelos mecanismos de sinalização pró-inflamatória em grande parte dos tecidos, marcadamente nas células laminares do casco de animais que desenvolveram laminite, induzida

experimentalmente (BLIKSLAGER et al., 2006). A LOX se encontra nas células leucocitárias, pulmonares e plaquetárias (TASAKA, 2017).

Os subprodutos da COX-2 provocam no sítio inflamatório vasodilatação, edema, sendo também responsável por grande parte da dor, que tem na laminite aguda um forte componente periférico e não central (BANSE; CRIBBS, 2015). Os derivados da COX-2 também têm um importante papel no desenvolvimento do aumento da pressão pós-capilar que gera o processo do edema dentro do estojo córneo. Além disso, esses derivados podem ativar as metaloproteinases laminares as quais irão decompor as fibras de colágeno resultando na separação das lâminas sensitivas e coriônicas (BLIKSLAGER et al., 2006).

Cada AINE tem um efeito específico sobre as enzimas desdobradoras do ácido araquidônico. O flunixin tem uma atividade preponderante na inibição da COX-1. O meloxicam, embora atue também na COX-1, é um inibidor preferencial da COX-2. Já o cetoprofeno é um inibidor de dupla ação atuando de forma semelhante sobre as duas COXs e a LOX (BERETTA et al., 2005, TASAKA, 2017).

Frente essas explicações, três pontos têm que ser melhor discutidos no efeito dos AINEs: supressão da dor podal, melhora do escore de locomoção e volta parcial do apetite, após o início do tratamento.

Sem dúvida, o meloxicam promoveu diminuição da sensibilidade dolorosa de forma mais rápida, em quase todos os animais, em relação aos demais AINEs testados (Tabela 21). O meloxicam quando aplicado em situações de muito estresse e dor, como no caso da descorna mecânica, reduziu sensivelmente a quantidade de substância P, um importante neurotransmissor da dor. Um único estudo demonstrou que a acidose ruminal por oligofrutose aumenta tremendamente a concentração de substância P a partir da 6ª h da indução mantendo-se elevada até a 48ª h (BUSTAMANTE et al., 2015).

A primeira vista tanto o meloxicam como o cetoprofeno deveriam atuar eficazmente na sensibilidade dolorosa provocada pela laminite aguda, pois ambos atuam sobre a COX-2 que gera subprodutos que promovem dor podal. Porém, alguns fatores devem ter favorecido o meloxicam em detrimento do cetoprofeno. O primeiro deles é a meia vida em bovinos desses medicamentos, com uma larga vantagem para o meloxicam (22 h) contra o cetoprofeno (30 min) (STOCK; COETZEE, 2015). Outra possível vantagem do meloxicam é sua ação residual no decorrer dos três dias consecutivos da aplicação, visto que o desvio padrão da vida média é de 3h, tendo maior chance de apresentar mais alta concentração sanguínea no derradeiro dia de tratamento que o cetaprofeno (STOCK; COETZEE, 2015). Numa revisão sobre o assunto,

os autores Stock & Coetzee (2015) opinaram que devido a curta meia vida do cetoprofeno existe a necessidade dessa droga ser injetada múltiplas vezes a fim de manter a requerida analgesia, embora Whay (2005) citou que a despeito de uma curta meia vida o cetoprofeno tem um efeito residual muito maior do que esperado contra as reações dolorosas. É importante frisar que o presente trabalho levou em consideração as recomendações de doses dos AINEs prescritas em bulas pelos fabricantes. É provável que as empresas que comercializam o cetoprofeno temendo efeitos colaterais e visando a praticidade do tratamento recomendam uma aplicação ao dia deste AINE.

Tudo indica que a mínima atuação do flunixin sobre a COX-2 tenha interferido menos na supressão das reações dolorosas podais. Mesmo assim, o flunixin tem um efeito anti-inflamatório reconhecido que de alguma forma indireta provoca a diminuição das reações dolorosas, porém em menor grau que os outros dois AINEs testados.

Outro efeito constatado foi quanto ao retorno do apetite, com vantagem para o meloxicam e o cetoprofeno, que foram os únicos diferentes ao grupo controle, que apresentou prolongada e marcante hiporexia em muitos animais e anorexia em alguns (Tabela 25). Como já foi comentado a acidose láctica deprime sensivelmente, por vários mecanismos, o centro da fome. Quando do início do tratamento com os antiflogísticos a ingestão de alimentos estava bastante comprometida em todos os grupos, principalmente pelo efeito da acidose, e possivelmente em menor grau pela laminite. Mas, credita-se que a partir do primeiro dia de tratamento com o agravamento da laminite e o abrandamento da acidose, a primeira tenha sido a causa principal da falta de apetite, em especial pela manifesta dor podal e dificuldade de locomoção. A dor aguda manifesta interfere diretamente no consumo de alimentos e no ganho de peso de bovinos submetidos aos processos dolorosos de origem cirúrgicos ou oriundos da inflamação aguda, como a laminite (STOCK; COETZEE, 2015).

O meloxicam interfere muito eficazmente na inibição da prostaglandina E_2 , uma das substâncias causadoras da dor, apresentando um efeito analgésico persistente durante o tratamento de bezerros descornados aumentando neles o consumo de alimento e o tempo gasto no cocho (THEURER et al., 2012, ALLEN et al., 2013). O cetoprofeno parece ter efeito semelhante ao meloxicam sobre o consumo de alimentos, principalmente quando ele é associado a um anestésico local em casos de descorna e castração de bezerros (STOCK; COETZEE, 2015). Assim, imputa-se o efeito do meloxicam e do cetoprofeno a uma provável supressão da dor favorecendo o retorno mais rápido do apetite. Especula-se que os resultados

intermediários do flunixin possivelmente sejam advindos da melhora na inflamação local nos dígitos, com menor efeito sobre analgesia local.

Tal qual ao retorno à alimentação, os bovinos tratados com meloxicam e cetoprofeno apresentaram mais adequado retorno ao estado mental normal comparado ao grupo controle (Tabela 25). Os animais controles permaneceram mais deprimidos, pouco responsivos aos estímulos e quando acionados a caminhar relutavam a fazer, já os tratados se apresentaram precocemente mais vívidos e ativos. Um tratado clássico opina que muito veterinários na prática tendem a associar em processos infecciosos antibióticos com AINEs para obter melhor resposta sintomática ao tratamento por meio do aumento de apetite e molhara na atitude.

Esperava-se que o efeito dos AINEs sobre o escore de claudicação repetisse os resultados constatados na sensibilidade dolorosa. Mas, o flunixin foi semelhante na redução de claudicação ao meloxicam e ao cetoprofeno no decorrer do experimento e uma das fêmeas do grupo controle deixou de claudicar, embora apresentasse reação dolorosa (Tabela 22). Esse resultado aparentemente paradoxal encontra alguma explicação no experimento de Whay et al. (2005) que trataram vacas com problemas podais agudos e crônicos medicando parte dos animais com cetoprofeno. Embora alguns animais do grupo controle apresentassem melhora no escore de locomoção estes mantiveram a reação dolorosa sugerindo que nem sempre o teste do escore é sensível o suficiente para diagnosticar problemas podais e que o animal pode por mudanças de apoio mascarar a claudicação. Assim, embora o escore de locomoção seja um excelente método de diagnóstico inicial da laminite pode não o ser na avaliação da eficiência do tratamento empregando antiflogísticos, ratificando os conceitos de Stock & Coetzee (2015).

De forma semelhante do que aconteceu com o escore de locomoção a plataforma de força não proporcionou resultados que indicassem a melhora clínica advinda do uso dos AINEs (Tabela 23). A plataforma só demonstrou volta do apoio normal em uma fêmea paradoxalmente num bovino do grupo controle que continuava a apresentar sensibilidade nos dígitos do membro afetado, mas por coincidência não apresentava claudicação. Esse resultado global encontrou eco nos achados de Chapinal et al., (2010) que tiveram excelentes resultados de distribuição de peso antes do tratamento de vários problemas podais, mas que foi inadequado para avaliar a melhora clínica dos bovinos. Os melhores resultados com plataforma de força foram obtidos quando em vez de placas metálicas outros autores empregaram tapetes de pressão que conseguem detectar diferenças de apoio em cada um dos dígitos em bezerros claudicantes (COETZEE et al., 2014). Porém, esses tapetes não resistem,

até o momento, grande peso sobre eles fazendo com que se rompam quando empregados bovinos muito pesados, como foi o caso do presente experimento. Assim, a mesma conclusão emitida para o escore de locomoção pode ser empregada no caso da plataforma de força, ou seja: é um bom método para diagnóstico, mas não o é para avaliação da eficiência dos tratamentos empregando AINEs.

Os dados de cortisol durante o tratamento com antiflogísticos também deram importante pistas da evolução do processo (Tabela 24). A primeira constatação é que o cortisol não diminuiu no decorrer do experimento nos bovinos do grupo controle, porém todos os antiflogísticos empregados provocaram uma menor secreção de cortisol nos animais laminíticos, principalmente ao término de três dias de tratamento (TT72) se mantendo assim até o final do experimento (Tabela 25).

O cortisol é considerado um biomarcador específico de estresse em bovinos laminíticos, enquanto que as proteínas de fase aguda o são de resposta inflamatória e a substância P de dor aguda durante o processo (BUSTAMANTE et al., 2015). Embora não mostrado dentre os resultados não existiu diferença no número total de leucócitos no decorrer do tratamento com antiflogísticos e na temperatura retal (Tabela 20), inclusive no grupo controle. De alguma forma esses resultados indicam que a reação inflamatória não era sistêmica e exacerbada, provavelmente ficando restrita aos dígitos. Os antiflogísticos são reconhecidos por diminuir quadros de leucocitose, neutrofilia e de proteínas de fase aguda indicadoras de inflamação em processos cirúrgicos cruentos como na descorna e a castração de bovinos (STOCK ; COETZEE, 2015). No presente trabalho, advoga-se que o alto cortisol encontrado no grupo controle foi proveniente do expressivo estresse que esses animais tiveram, com destaque ao menor consumo de alimentos e a inflamação podal. Segundo Marques et al. (2013) bovinos submetidos ao jejum de 24h ou ao estresse de transporte apresentaram aumento de concentração de cortisol e de proteínas de fase aguda constatando-se nestes uma menor conversão alimentar e um temporariamente um menor consumo de alimentos.

Nenhum dos tratamentos com AINEs desencadeou qualquer lesão abomasal de maior monta, visto que não existiu diferença nos teores de pepsinogênio entre os grupos no decorrer do tratamento (Tabela 26). Altas doses de AINEs, em especial daqueles que atuam em COX-1, interferem na homeostase da mucosa abomasal, impedindo que a produção de bicarbonato que irá tamponar o excesso de íons H^+ causando assim a erosão de sua parede, edema e posteriormente morte das células (TASAKA, 2017). Isso faz com que o pepsinogênio não seja

transformado em pepsina e que o primeiro composto esteja aumentado na corrente circulatória numa intoxicação iatrogênica por AINEs (MESARIČ, 2005). Assim, pode-se afirmar que nem acidose ruminal nem o protocolo empregado neste experimento, baseando-se nas sugestões de bula de produtos comerciais foi danoso e causou efeitos colaterais ao abomaso.

Sem dúvida alguma, os AINEs, em especial o meloxicam, seguido do cetoprofeno e em menor grau do flunixin interferiram positivamente na reação inflamatória local e dor nos dígitos, produzindo ainda melhora no estado geral, decorrente da acidose e da laminite, sem causar aparentes danos à mucosa abomasal. Assim, recomenda-se nos protocolos de laminite asséptica o uso de AINEs, dando preferência por aqueles que atuam mais firmemente na dor gerada no processo.

7. CONCLUSÕES

A presente tese pode concluir os seguintes fatos no concernente:

A) Modelo de indução, metabolismo ruminal da oligofrutose e consequências sistêmicas:

- A quantidade de oligofrutose requerida para induzir laminite em zebuínos teve que ser diminuída, em relação ao protocolo clássico em taurinos, devida à severa acidose ruminal causada pela dose original;
- O modelo empregado foi muito eficiente na indução de laminite em zebuínos adultos;
- A fermentação máxima da oligofrutose ocorreu entre a 6^a e a 12^a h com destacada queda no pH ruminal, acúmulo de ácido láctico, intensa diminuição da anaerobiose e aumento temporário na osmolaridade ruminal.
- Os bovinos induzidos tiveram que ser divididos em dois grupos devido à necessidade, num deles, de tratamento para correção da intensa acidose metabólica e desidratação que colocaram em risco a vida dos mesmos;
- Apenas nos medicados constatou-se que quanto menor foi o pH ruminal menor o pH sanguíneo, e quanto menor o pH sanguíneo maior era o incremento na osmolaridade deste fluido no auge da fermentação ruminal;
- O quadro clínico provocado por excesso de oligofrutose é mais severo que as descrições clássicas de acidose láctica ruminal, com o diferencial do surgimento de uma febrícula efêmera e de um quadro de compensação respiratória frente à acidose sistêmica.

B) Caracterização do quadro de laminite e comparação de métodos para seu diagnóstico:

- Com exceção de alguns animais que tiveram laminite em todos os dígitos, a maioria deles teve apenas o processo mórbido em dígitos de dois membros;
- Uma menor porcentagem de fêmeas apresentaram polisinovite nas articulações tarsocrurais;

- Empregando o teste da sensibilidade dolorosa como padrão ouro o melhor método para o diagnóstico foi o de escore de locomoção, seguido da plataforma de força e finalmente pela termografia infravermelha;
- Quando o teste de locomoção foi o padrão ouro obteve-se uma boa capacidade de diagnóstico pela plataforma de força;
- Porém, os três testes supracitados não foram eficientes para analisar a evolução do tratamento dos animais laminíticos com AINEs, confiando nesse caso no teste de sensibilidade dolorosa;

C) Eficiência comparativa dos AINEs no tratamento de laminite:

- Os diferentes AINEs tiveram semelhante capacidade de reduzir os teores de cortisol no decorrer do tratamento em relação ao grupo controle;
- Nenhum protocolo de tratamento com AINEs provocou agressões reconhecidas no abomaso;
- O meloxicam foi bastante eficaz na diminuição de sensibilidade podal, melhorando da mesma forma que o cetoprofeno o escore de locomoção;
- O meloxicam e o cetoprofeno estimularam o retorno do apetite e a melhora do estado mental dos bovinos laminíticos;
- Deve-se incluir no tratamento da laminite asséptica algum AINE, dando-se preferência ao meloxicam, seguido do cetoprofeno.

8. REFERÊNCIAS

- ADEGBOYEGA, P.A; OLOLADE, O. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in normal kidneys. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology** 12:71-74, 2004.
- ALARCÓN, P; CONEJEROS, I; CARRETTA, M.D; CONCHA, C; JARA, E; TADICH, N; HIDALGO, M.A; BURGOS, R.A. D-Lactic acid interferes with the effects of platelet activating factor on bovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114, 68-78, 2011.
- ALLEN, D J.R, CLARK, E.S, MOORE, J.N. Evaluation of equine digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis. **American Journal Veterinary Research**, 51:1930–1934, 1990.
- ALLEN, K.A.; COETZEE, J.F.; EDWARDS-CALLAWAY, L.N.; GLYNN, H.; DOCKWEILER, J.; KUKANICH, B.; LINS, H.; WANG, C.; FRACCARO, E.; JONES, M.; BERGAMASCO, L. The effect of timing of oral meloxicam administration on physiological responses in calves after cautery dehorning with local anesthesia. **Journal Dairy Science**, 96:5194–205, 2013.
- ALSAAOD, M.; BUSCHER, W. Detection of hoof lesions using digital infrared thermography in dairy cows. **Journal Dairy Science**, 95:735–742, 2012.
- ANDERSEN, P. H. Bovine Endotoxemia – some aspects relevant to production diseases. A review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, n. 98, suplemento, p. 141-155, 2003.
- ANDERSEN, P.H. Portal infusion of low dosage endotoxin: a model simulating translocation of ruminal endotoxin in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 35:111–114, 1994.
- ANDERSON, D.E; MUIR, W.W. Pain management in cattle. **Veterinary Clinical North American Food Animal Practice** 21:623–635, 2005.
- ASCHENBACH, J.R., PENNER, G.B.; STUMPF, F.; GÄBEL, G. Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal Animal Science**, 89 (4), 1092-1107.

BAILEY, S.R.; MARR, C.M.; ELLIOTT, J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. **The Veterinary Journal**, 167:129–142, 2009.

BANSE, H.E.; CRIBB, A.E. Review of nonsteroidal anti-inflammatory drug selection in horses. **AAEP PROCEEDINGS**, 61:532-536, 2015.

BARCA JUNIOR, F.A.; TRAPP, S.M.; SILVA, L.C.; QUEIROZ, A.T.Z.; BACCARI JUNIOR, F.; CUNHA FILHO, L.F.C.; OKANO, W. Avaliação da temperatura retal e frequência respiratória em bovinos leiteiros como ferramenta de seleção para termotolerância. **Anais... VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal (SBMA)**, 2010

BARRÊTO JÚNIOR, R.A.; MINERVINO, A.H.H.; RODRIGUES, F.A.M.L.; ANTONELLI, A.C.; MORI, C.S.; SUCUPIRA, M.C.A.; ORTOLANI, E.L. Avaliação do potencial da polpa cítrica em provocar acidose láctica ruminal aguda em bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 45:419-427, 2008.

BELKNAP, J.K.; GIGUERE, S.; PETTIGREW, A.; COCHRAN, A.M.; VAN EPS, A.W.; POLLITT, C.C. Lamellar pro-inflammatory cytokine expression patterns in laminitis at the developmental stage and at the onset of lameness: innate vs adaptive immune response. **Equine Veterinary Journal** 39: 42–47, 2007.

BERRETA, C.; GARAVAGLIA, G.; CAVALLI, M. COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: Na in vitro analysis. **Pharmacological Research**, 52: 302-306, 2005.

BLACK, S.J.; LUNN, D.P.; YIN, C.; HWANG, M.; LENZ, S.D.; BELKNAP, J.K. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 109:161–166, 2006.

BLIKSLAGER, A.T.; YIN, C.; COCHRAN, A.M.; WOOTEN, J.G.; PETTIGREW, A.; BELKNAP, J.K. Cyclooxygenase expression in the early stages of equine laminitis: A cytologic study. **Journal Veterinary Internal Medicine** 20: 1191-1196, 2006.

BUSTAMANTE, H.A.; RODRÍGUEZ, A.R.; HERZBERG, D.E.; WERNER, M.P. Stress and pain response after oligofructose induced-lameness in dairy heifers. **Journal Veterinary Science**, 16: 405-411, 2015.

CHAPINAL, N.; PASSILLE, A.M.; RUSHEN, J.; WAGNER, S. Automated methods for detecting lameness and measuring analgesia in dairy cattle. **Journal Animal Science**, 93: 2007-2013, 2010.

CHAPINAL, N.; DE PASSILLE, A.M.; WEARY, D.M.; VON KEYSERLINGK, M.A.G.; RUSHEN, J. Using gait score, walking speed, and lying behavior to detect hoof lesions in dairy cows. **Journal Dairy Science**, 92:4365–4374, 2009.

COETZEE, J.F.; GEHRING, R.; BETTENHAUSEN, A.C.; LUBBERS, B.L.; THOMSON, D.U.; KUKANICH, B.; TOERBER, S.E.; APLEY, M.D. Mitigation of plasma cortisol response in bulls following intravenous sodium salicylate administration prior to castration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 30(4):305–313, 2007.

COETZEE, J.F.; KUKANICH, B.; MOSHER, R.; ALLEN, P.S. Pharmacokinetics of intravenous and oral meloxicam in ruminant calves. **Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicina** 10(4):1–8, 2009.

COETZEE, J.F.; MOSHER, R.A.; ANDERSON, D.E.; ROBERT, B.; KOHAKE, L.E.; GEHRING, R.; WHITE, J.; KUKANICH, B.; WANG, C. Impact of oral meloxicam administered alone or in combination with gabapentin on experimentally induced lameness in beef calves. **Journal Animal Science**, 92:816–29, 2014.

CONCHA, C.; CARRETTA, M.D.; ALARCÓN, P.; CONEJEROS, I.; GALLARDO, D.; HIDALGO, A.I.; TADICH, N.; CÁCERES, D.D.; HIDALGO, M.A.; BURGOS, R.A. Oxidative response of neutrophils to platelet-activating factor is altered during acute ruminal acidosis induced by oligofructose in heifers. **Journal of Veterinary Science** Mar 21, 2014.

DANSCHER, A.M.; ENEMARK, J.M.D.; TELEZHENKO, E.; CAPION, N; EKSTROM, C.T; THOEFNER, M.B. Oligofructose overload induces lameness in cattle. **Journal Dairy Science**, 92: 607-616, 2009.

DANSCHER, A.M.; LI, S.; ANDERSEN, P.H.; KHAFIPOUR, E.; KRISTENSEN, N.B.; PLAIZIER, J.C. Indicators of induced subacute ruminal acidosis (SARA) in Danish Holstein cows. **Acta Veterinari Scandinavica**, 57:39, 2015.

DANSCHER, A. M.; THOEFNER, M. B.; HEEGAARD, P. M. H.; EKSTROM, C. T.; JACOBSEN, S. Acute phase protein response during acute ruminal acidosis in cattle. **Livestock Science**, v. 135, n. 1, p. 62-69, 2011

DANSCHER, A. M.; TOELBOELL, T. H.; WATTLE, O. Biomechanics and histology of bovine claw suspensory tissue in early acute laminitis **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 1, p. 53-62, 2010.

DAVIES, N.M.; GOOD, R.L.; ROUPE, K.A.; YÁNEZ, J.A. Cyclooxygenase-3: Axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error? - Not as easy as 1, 2, 3. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science** 7 (2):217–226, 2004.

DIRKSEN, G; GRUNDER, H.D.; STOBBER, M.; Exame clinico dos Bovinos. 3ed. Editora Guanabara Koogan S.A., 1993. 402p.

DONG, G.; LIU, S.; WU, Y.; LEI, C.; ZHOU, J.; ZHANG, S. Diet-induced bacterial immunogens in the gastrointestinal tract of dairy cows: impacts on immunity and metabolism. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Kobenhavn, v. 53, n. 1, p. 1-7, 2011.

DORNY, P; VERCRUYSSSE, J. Evaluation of a micro method for the routine determination of serum pepsinogen in cattle. **Research in Veterinary Science** 65: 259-262, 1998.

FERREIRA, P. M. Enfermidades podais em rebanho leiteiro confinado. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003, 79p.

FLOWER, F. C.; WEARY, D.M. Effect of hoof pathologies on subjective assessments of dairy cow gait. **Journal Dairy Science**. 89:139–146, 2006.

GLOSTER, J.; EBERT, K.; GUBBINS, S.; BASHIRUDDIN, J.; PATON, D.J. Normal variation in thermal radiated temperature in cattle: Implications for foot-and-mouth disease detection. **BMC Veterinary Research**, 7:73–82, 2011.

GRAHAM, C.; SIMMONS, N.L. Functional organization of the bovine rumen epithelium. **American Journal Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, 288:173–181, 2005.

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

HAWKEY, C; KAHAN, A; STEINBRÜCK, K; ALEGRE, C; BAUMELOU, E; BÉGAUD, B; DEQUEKER, J; ISOMÄKI, H; LITTLEJOHN, G; MAU, J; PAPAZOGLU, S. Gastrointestinal tolerability of meloxicam compared to diclofenac in osteoarthritis patients. International MELISSA Study Group. Meloxicam Large-scale International Study Safety Assessment. **British Journal of Rheumatology** 37: 937–945, 1998.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. New York: Academic Press, 1997. 932 p.

KHAFIPOUR, E; KRAUSE, D.O; PLAIZIER, J.C. Alfalfa pelletinduced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *Journal Dairy Science*, 92:1712–1724, 2009.

YAGÜE, L.M.C.; PASTOR, J.; RAMOS, J.J.; FERRER, L.M. **La exploración clínica Del ganado vacuno**. Servet, 2005, 488p.

YAN, Z; STAPLETON, PP; FREEMAN, TA; FUORTES, M; DALY, JM. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in response to endotoxin after trauma is dependent on MAPK and NF-kappaB mechanisms. **Cellular Immunology** 232:116–126, 2004.

LEAL, M.L.R.; MARUTA, C.A.; ORTOLANI, E.L. Uso de bicarbonato e lactato-L para correção da acidose metabólica sistêmica em bovinos com acidose láctica ruminal aguda. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, 59: 971-976, 2007.

LEES, P; LANDONI, MF; GIRAUDEL, J; TOUTAIN, PL. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics** 27:479–490, 2004.

LIMA, I.R. Estudo clínico e radiográfico das extremidades distais dos membros locomotores de bovinos machos de corte. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola Veterinária, 2009.

LISCHER, C. J.; OSSENT, P. Pathogenesis of sole lesions attributed to laminitis in cattle. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LAMENESS IN RUMINANTS, 12., 2002, Orlando. **Anais eletrônicos**...[on line]. Orlando:2002. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/rumlameness/2002/state4/state4.pdf>. Acesso em 10 jan. 2017.

LOFTUS, J.P.; BELKNAP, J.K.; BLACK, S.J. Matrix metalloproteinase-9 in laminae of black walnut extract treated horses correlates with neutrophil abundance. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 113: 267–276, 2006.

LOHUIS, J.A.C.M.; VERHEIJDEN, J.H.M.; BURVENICH, C.; VAN MIERT, A.S.J.P.A.M. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants, **Veterinary Quarterly**, 10:2, 117-125, 1988.

LONGLAND, A. C.; CAIRNS A. J. Fructans and their implications in the aetiology of laminitis. Pages 52–55 in Proc. 3rd Int. Res. Conf. on Feeding Horses. Dodson and Horrell, Ringstead, UK, 2000.

LORENA, SERS; LUNA, SPL; LASCELLES, BDX; CORRENTE, J. Attitude of Brazilian veterinarians in the recognition and treatment of pain in horses and cattle. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, 40: 410-418, 2013.

MAIN, D.C.; STOKES, J.E.; READER, J.D.; WHAY, H.R. Detecting hoof lesions in dairy cattle using a hand-held thermometer. **Veterinary Record**, 171:504–506, 2012.

MASLANKA, T. Effect of dexamethasone and meloxicam on counts of select T lymphocyte subpopulations and NK cells in cattle – In vivo investigations. **Research in Veterinary Science** 96: 338-346, 2014.

MARQUES, R.S.; COOKE, R.F.; FRANCISCO, C.L.; BOHNERT, D.W. Effects of twenty-four hour transport or twenty-four hour feed and water deprivation on physiologic and performance responses of feeder cattle. **Journal Animal Science**, 90:5040-5046, 2012.

MARUTA, C. A. Comparação da susceptibilidade de bovinos das raças Jersey e Gir à acidose láctica ruminal induzida experimentalmente com sacarose. **Dissertação** (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2000, 120p.

MARUTA C. A.; ORTOLANI E. L. Susceptibilidade de bovinos das raças jersey e gir à acidose láctica ruminal: II – acidose metabólica e metabolização do lactato-L. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 61-65, 2002a.

MARUTA, C.A.; ORTOLANI E. L. Susceptibilidade de bovinos das raças Jersey e Gir à acidose Láctica ruminal: I – Variáveis fecais e ruminais. **Ciência Rural** 32: 55-59, 2002b.

MASSAD, E.; MENEZES, R.X.M.; SILVEIRA, P.S.P.; ORTEGA, N.R.R. **Métodos quantitativos em medicina**. Barueri, SP: Manole, 2004.

MESARIC, M. Role of serum pepsinogen in detecting cows with abomasal ulcer. **Veterinarski Arhiv**, 75: 111-118, 2005.

MICILETTA, M; CUNIBERTI, B; BARBERO, R; RE, G. In vitro enantioselective pharmacodynamics of carprofen and flunixin-meglumine in feedlot cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics** 37: 43-52, 2013.

MILLEN, D.D.; PACHACO, R.D.; ARRIGONI, M.D.; GALYEAN, M.L.; VASCONCELOS, J.T. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science** 87: 3427-3439, 2009.

MORMÈDE, P.; ANDANSON, S.; AUPÉRIN, B.; BEERDA, B.; GUÉMÉNÉ, D.; MALMKVIST, J.; MANTECA, X.; MANTEUFFEL, G.; PRUNET, P.; VAN REENEN, C.G.; RICHARD, S.; VEISSER, I. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology and Behavior**, 92: 317-339, 2007.

MOURIÑO, F.; AKKARAWONGSA, R.; WEIMER, P. J. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal Dairy Science**, 84:848–859, 2001.

MUKAIDA, N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 284, L566–L577, 2003.

MULLING, C. K. W.; GREENOUGH, P. R. Applied Physiopathology of the Foot. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24., 2006, Nice. **Anais eletrônicos...**[on line]. Nice: 2006. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2006/mulling.pdf?LA=1>. Acesso em 22 fev. 2017.

MULLING, C. K. W. Theories on the pathogenesis of white line disease – anatomical perspective. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LAMENESS IN RUMINANTS, 12., 2002, Orlando. **Anais eletrônicos...**[on line]. Orlando: 2002. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/rumlameness/2002/state4/state4.pdf>. Acesso em 11 fev. 2017.

MUNGALL, B.A., POLLITT, C.C., COLLINS, R. Localisation of gelatinase activity in epidermal hoof lamellae by in situ zymography. **Histochemistry and Cell Biology**, 110: 535–540, 1998.

NAGARAJA, T.G.; LECHTENBERG, K.F. Acidosis in Feedlot Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** 23(2): 333-335, 2007.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminant acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. E17-E38, 2007.

NEVEUX, S.; WEARY, D.M.; RUSHEN, J.; VON KEYSERLINGK, M.A.; PASSILLE, A.M. 2006. Hoof discomfort changes how dairy cattle distribute their body weight. **Journal Dairy Science**, 89:2503–2509, 2006.

NICOLETTI, J.L.M. **Manual de podologia bovina**. Barueri: Manole 2004.126p.

NIKKHAH, A.; PLAIZIER, J.C.; EINARSON, M.S.; BERRY, R.J.; SCOTT, S.L.; KENNEDY, A.D. Short communication: Infrared thermography and visual examination of hooves of dairy cows in two stages of lactation. *Journal Dairy Science*, 88:2749–2753, 2005.

NOCEK, J.E. Bovine acidosis: Implications on laminitis. **Journal Dairy Science**. 80: 1005-1028, 1997.

O'CALLAGHAN, K. A.; CRIPPS, P.J.; DOWNHAM, D.Y.; MURRAY, R.D. Subjective and objective assessment of pain and discomfort due to lameness in dairy cattle. **Animal Welfare**, 12:605–610, 2003.

PHILLIPS, C. Locomotion and movement. Pages 180–297. In **Cattle Behaviour and Welfare**. 2nd ed. Blackwell, Univ. Cambridge, UK, 2002.

OKADA, K.; SATO, I.; DEGUCHI, Y.; MORITA, S.; YASUE, T.; YAYOTA, M.; TAKEDA, K.; SATO, S. Distribution of radioactive cesium in edible parts of cattle. **Animal Science Journal**, 84:798–801, 2013.

ORMAN, A.; ENDRES, M.I. Use of thermal imaging for identification of foot lesions in dairy cattle. **Acta Agriculturae Scandinavica Animal Science**, 1651-1972, 2016.

OLIVEIRA, F.L.C.; BARRÊTO JÚNIOR, R.A.; MINERVINO, A.H.H.; TAVARES, M.D.; VALE, R.G.; ARAÚJO, C.A.S.C.; SOUSA, R.S.; ORTOLANI, E.L. Effects of sudden melon intake on ruminal parameters of non-adapted sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36: 378-382, 2016.

ORTOLANI, E. L. Diagnóstico de doenças nutricionais e metabólicas por meio de exame de urina em ruminantes. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 1. Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p. 91–102.

ORTOLANI, E. L. Induction of lactic acidosis in cattle with sucrose: relationship between dose, rumen fluid pH and animal size. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 37, n. 5, p. 462-464, 1995.

ORTOLANI, E.L.; MARUTA, C.A.; MINERVINO, A.H.H. Aspectos clínicos da indução experimental de acidose láctica ruminal em zebuínos e taurinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 47:253-261, 2010.

OWENS, F. N.; SECRIST, D.S.; HILL, W.J.; GILL D.R. Acidosis In Cattle: A Review. **Journal of Animal Science** 76(1):275-286, 1998.

PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; GOZHO, G. N.; McBRIDE, B. W. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, London, v. 176, n. 1, p. 21-31, 2009.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine**. 10th ed. London: Elsevier Saunders, 2007. 2156 p.

RAJKONDAWAR, P. G., TASCH, U.; LEFCOURT, A.M.; EREZ, B.; DYER, R.M.; VARNER, M.A. A system for identifying lameness in dairy cattle. **Applied Engineering in Agriculture** 18:87–96, 2002.

RAINWATER-LOVETT, K.; PACHECO, J.M.; PACKER, C.; RODRIGUEZ, L.L. Detection of foot-and-mouth disease virus infected cattle using infrared thermography. **Veterinary Journal**, 180: 317–324, 2009.

REIS, L.F. Estudo comparativo do uso de probiótico e monensina na prevenção e tratamento da acidose láctica ruminal aguda em ovinos. **Dissertação** (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2011, 115p.

REIS, L.F.; MINERVINO, A.H.H.; ARAUJO, C.A.S.C.; SOUSA, R.S; OLIVEIRA, F.L.C.; RODRIGUES, F.A.M.L.; MEIRA JUNIOR, E.B.S.; BARRÊTO JÚNIOR, R.A.; MORI, C.S; ORTOLANI, E.L. Comparison of Rumen Fluid pH by Continuous Telemetry System and Bench pH Meter in Sheep with Different Ranges of Ruminal pH. **The Scientific World Journal** 1-4, 2014.

RODRIGUES, F.A.M.L.; MINERVINO, A.H.H.; BARRÊTO JÚNIOR, R.A.; ANTONELLI, A.C.; REIS, L.F.; ARAÚJO, C.A.S.C.; FERREIRA, R.N.F.; Thales dos VECHIATO, T.A.F.; MORI, C.S.; ORTOLANI, E.L. Avaliação clínica do uso de solução salina hipertônica no tratamento da acidose láctica ruminal aguda em bovinos. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, 48: 446-453, 2011.

RODRIGUES, F. A. M. L. Tratamento adicional da acidose láctica ruminal aguda em bovinos por meio de infusão de solução salina hipertônica (7,2%). **Dissertação** (Master). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univesidade de São Paulo, São Paulo, 118p, 2009.

RODRIGUES, M. Avaliação das características do líquido ruminal associada à termografia digital e atividade pedométrica em vacas holandesas. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2013.

RUPP J, BERGER M, REILING, N.; GIEFFERS, J.; LINDSCHAU, C.; HALLER,H., DALHOFF, K.; MAASS, M. COX-2 inhibition abrogates Chlamydia pneumoniae-induced PGE2 and MMP-1 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 320:738–744, 2004.

RUSHEN, J.; POMBOURCQ, E.; PASSILLE, A.M.D. Validation of two measures of lameness in dairy cows. **Applied Animal Behavior Science**, 106:173–177, 2007.

SCHULZ, K.L.; ANDERSON, D.E.; COETZEE, J.F.; WHITE, B.J.; MIESNER, M.D. Effect of flunixin meglumine on the amelioration of lameness in dairy steers with amphotericin B-induced transient synovitis-arthritis. **American Journal of Veterinary Research**, 72:1431–1438, 2011.

SABES, A.F. Acidose lactica ruminal aguda induzida experimentalmente em ovinos: estudo clínico e laboratorial. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015, 87p.

SHEARER, J. K.; VAN AMSTEL, S. R. Managing lameness for improved cow confort and performance. In: 6° Western Dairy Managerment Conference. **Procedings...** Reno: NV, 2003. p.167.

SHEARER, J.K.; STOCK, M.L; VAN AMSTEL, S.R.; COETZEE, J.F. Assessment and management of pain associated with lameness in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 29:135-156, 2013.

SHEARER, J.K.; VAN AMSTEL, S.R.; BRODERSEN, B.W. Clinical diagnosis of foot and leg lameness in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 28:535-556, 2012.

SNIPES, JA; KIS, B; SHELNESS, GS; HEWETT, JA; BUSIJA, DW. Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3 in rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 313:668–676, 2005.

SOARES, P.C.; MARUTA, C.K.; SUCUPIRA, M.C.A.; MORI, C.S.; ANTONELLI, A.C.; ORTOLANI, E.L. Diagnostico de carência energética em bovinos por testes de metabolismo ruminal. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, 43: 33-41, 2006.

SMITH, R.D. **Veterinary Clinical Epidemiology** – A problem-oriented approach. Butterworth-Heinemann, 1991, 233p.

SPRECHER, DJ; HOSTETLER, DE; KANEENE, JB. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. **Theriogenology** 47:1179–1187, 1997.

SRIVASTAVA, P. K., DASTIDAR, S. G. RAY, A. Chronic obstructive pulmonary disease: role of matrix metalloproteases and future challenges of drug therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 16, 1069-1078, 2007.

SVENSSON, C.I.; YAKSH, T.L. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, 42: 553–83, 2002.

STOCK, M.L.; COETZEE, J.F. Clinical pharmacology of analgesic drugs in cattle. **Veterinary Clinicals Food Animal**, 31: 113-138, 2015.

STOKES, J.E.; LEACH, K.A.; MAIN, D.C.; WHAY, H.R. An investigation into the use of infrared thermography (IRT) as a rapid diagnostic tool for foot lesions in dairy cattle. **Veterinary Journal**, 193: 674–678, 2012.

TADICH, N.; FLOR, E; GREEN, L. Associations between hoof lesions and locomotion score in 1098 unsound dairy cows. **Veterinary Journal**, 184:60–65, 2010.

- TASAKA, A.C. Anti-inflamatórios não esteróides. In: **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária**, SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. 6 ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2017.
- THOEFNER, M.B.; POLLITT, C.C., VAN EPS, A.W., MILINOVICH, G.J, TROTT, D.J, WATTLE, O., ANDERSEN, P.H. Acute bovine laminitis: A new induction model using alimentary oligofructose overload. **Journal Dairy Science** 87:2932-2940, 2004.
- THEURER, M.E.; WHITE, B.J.; COETZEE, J.F.; EDWARDS, L.N.; MOSHER, R.A.; CULL, C.A. Assessment of behavioral changes associated with oral meloxicam administration at time of dehorning in calves using a remote triangulation device and accelerometers. **BMC Veterinary Research**, 8:48, 2012.
- TURNER, T.A.; PUROHIT, R.C.; FESSLER, J.F. Thermography: A review in equine medicine. **Equine Veterinary Science**, 5: 8–10, 1986.
- VAN AMSTEL SR, SHEARER JK. **Manual for the treatment and control of lameness in cattle**. Ames (IA): Blackwell Publishing Professional; 2006.
- VAN EPS, A.W.; POLLITT, C.C. Equine laminitis induced with oligofructose. **Equine Veterinary Journal**, 38, 203–208, 2006.
- WAGUESPACK, R.W.; COCHRAN, A.; BELKNAP, J.K. Expression of the cyclooxygenase isoforms in the prodromal stage of black walnut-induced laminitis in horses. **American Journal Veterinary Research**. 65:1724–1729, 2004.
- Weiss D.J. & Wardrop JK. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. Blackwell Publishing, Iowa, p.347-360, 2010
- WHAY, HR; WEBSTER, AJF; WATERMAN-PEARSON, AE. Role of ketoprofen in the modulation of hyperalgesia associated with lameness in dairy cattle. *The Veterinary Record*. 3, 2005.
- WILLIAMS, RL; UPTON, RA. The clinical pharmacology of ketoprofen. **Journal of Clinical Pharmacology**, 28:13-22, 1998.

WILLIAMS, V. J.; MACKENZIE, D. D. S. The absorption of lactic acid from the reticulo-rumen of the sheep. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 917-934, 1965.

WINCKLER, C.; WILLEN, S. The reliability and repeatability of a lameness scoring system for use as an indicator of welfare in dairy cattle. **Acta Agriculturae Scandinavica Animal Science**, 30:103–107, 2001.