

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**RODRIGO LIBÉRIO ARAUJO PALHANO**

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS E HISTOPATOLÓGICAS DE TECIDO  
LAMILAR DO CASCO E DA MUCOSA RUMINAL EM BOVINOS  
SUBMETIDOS A DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE AMIDO**

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária – UFMG**  
**2022**

RODRIGO LIBÉRIO ARAUJO PALHANO

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS E HISTOPATOLÓGICAS DE TECIDO  
LAMILAR DO CASCO E DA MUCOSA RUMINAL EM BOVINOS  
SUBMETIDOS A DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE AMIDO**

Dissertação apresentada ao colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Tiago Facury Moreira

Co-orientador: Antônio Último de Carvalho

**Belo Horizonte**

**2022**

P616a Palhano, Rodrigo Libério Araújo, 1994 -  
Alterações metabólicas e histopatológicas de tecido lamilar do casco e da mucosa ruminal em bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de amido / Rodrigo Libério Araújo Palhano. -2022. 65f: il.

Orientador: Tiago Facury Moreira  
Coorientador: Antônio Último de Carvalho  
Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Medicina e cirurgia veterinárias

Bibliografia: f. 59 - 65.

1. Bovino - Doenças - Teses - 2. Laminite - Teses - 3. Veterinária - Teses -  
I. Moreira, Tiago Facury - II. Carvalho, Antônio Último de - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. Título.

**CDD – 636.089**

Bibliotecário responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

**RODRIGO LIBERIO ARAUJO PALHANO**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.

Aprovado(a) em 31 de maio de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Tiago Facury Moreira - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Elias Jorge Facury Filho

Dr.(a). Rafael Resende Faleiros

Dr.(a). Ronaldo Alves Martins



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Facury Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 01/06/2022, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elias Jorge Facury Filho, Professor do Magistério Superior**, em 02/06/2022, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Resende Faleiros, Professor do Magistério Superior**, em 05/06/2022, às 07:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ronaldo Alves Martins, Usuário Externo**, em 05/06/2022, às 19:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1499584** e o código CRC **05F130D6**.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Adriana e Reinaldo, sempre ao meu lado e acreditando em mim.

Aos meus irmãos, Ricardo e Ingrid, pelo companheirismo e amizade de todos esses anos.

A Jessica, meu amor, sempre me apoiando em tudo e acreditando em mim, obrigado por estar ao meu lado sempre.

A Íris, por me fazer tão feliz, e me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu orientador, professor Tiago Facury Moreira, grande amigo, que me orientou durante todo o projeto e sempre esteve disponível e empenhado em me ajudar em todos os momentos.

Ao meu Co-orientador, Antônio Último de Carvalho, pela ajuda durante o projeto, por seus conselhos sobre como ser um melhor profissional e uma melhor pessoa.

Aos professores Rodrigo Meneses, Elias Facury e Livio Molina pelas lições, disponibilidade para ensinar e as orientações fornecidas ao longo da minha formação.

Ao Ronaldo Alves Martins, grande amigo, que além de ter me orientado em estágios durante a graduação, me cedeu amostras do seu experimento de doutorado que não tinham sido utilizadas para realizar meu projeto.

Aos meus companheiros de pós-graduação Carlos Eduardo e Sóstenes que me ajudaram e me ensinaram bastante nas análises dos órgãos.

Aos meus amigos, Guilherme Silva Lemos, João Pedro Matiello e Pedro Henrique, companheiros de residência, obrigado pela amizade construída, pela companhia, conversas, risadas e muito aprendizado trabalhando juntos.

A escola de Veterinária da UFMG, que durante todos esses anos foi minha segunda casa e a Clínica de Ruminantes da EV/UFMG.

Ao Colegiado Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo durante o mestrado.

A todos que de alguma forma, em algum momento, me ajudaram a chegar até aqui.

Aos 16 bovinos que contribuíram para realização desse trabalho de pesquisa e, acima de tudo, para meu aprendizado.

## RESUMO

A laminite destaca-se entre as doenças que acometem o aparelho locomotor. Apesar de ser uma doença multifatorial, o manejo nutricional ainda é visto como tendo papel crítico no surgimento da laminite. Porém, a relação entre a acidose ruminal com a laminite é questionada, por não haver ainda um esclarecimento de como a acidose ruminal poderia levar a alterações histológicas do casco. O nosso objetivo foi avaliar as alterações metabólicas causadas pelo consumo de dietas de confinamento em novilhos e possíveis alterações histológicas no casco e outros órgãos. Foram utilizados 16 novilhos da raça Holandês com peso vivo inicial médio de  $250 \pm 25,5$  Kg, separados em dois grupos que recebiam dietas com diferentes quantidades de amido, grupo AG (36,96% de amido) e BG (16,81% de amido), avaliados ao longo de 91 dias de confinamento. Parâmetros ruminais como pH do fluido ruminal e tempo de redução do azul de metileno foram avaliados, assim como parâmetros sanguíneos como glicose, insulina e IGF-1. Foi realizado o teste de tolerância a glicose nos dias 0, 39 e 102. Foi realizada uma biópsia da junção dermo-epidérmica da região da muralha de todos os animais 40 dias antes do início do experimento, e após abate, amostras das junções dermo-epidérmicas das regiões de muralha e sola do casco foram obtidas e processadas histologicamente por coloração HE e PAS. Foram avaliados a hemorragia, infiltrado inflamatório, shunt arteriovenoso na derme. A morfologia, comprimento e largura das lâminas epidérmicas, e a morfologia das células epidérmicas, presença de irregularidades na membrana basal foram examinadas por coloração PAS. A dieta de alto grão reduziu o tempo de alimentação e ruminação dos animais, diminuiu o pH do fluido ruminal e o tempo de redução do azul de metileno. Em metade dos animais do grupo, a dieta de alto grão provocou alterações histológicas compatíveis com acidose ruminal como degeneração hidrópica multifocal discreta e microabscessos intraepiteliais. A área sob a curva (AUC) da glicose não diferiu entre os grupos nos TTG. As dietas de confinamento tiveram maior AUC de insulina durante TTG ao final do experimento D 102. As duas dietas de confinamento aumentaram os níveis de IGF-1 dos animais, sendo que o grupo AG teve maior incremento. As dietas de confinamento foram capazes de reduzir o comprimento e largura das lâminas epidermais. O grupo AG aumentou o comprimento da paraqueratose no tecido laminar. Apesar do fato de que houve alterações histológicas nos cascos, não houve diferença significativas entre as dietas com diferentes inclusões de amido. Apesar de não ter diferença entre os grupos, a alteração no formato das lamina epidermais mais presente foi o franjeamento. O aumento de IGF1 e o aumento da AUC de insulina, provocado pelas dietas de confinamento, pode ter favorecido o encurtamento das lâminas epidermais do tecido laminar

com desaparecimento do eixo queratinizado com a proliferação de células nucleadas entre o tecido lamelar e o início da camada córnea que supostamente não deveria existir (paraqueratose), reduzindo a estabilidade e qualidade do tecido lamelar. Futuros estudos com menor tempo de adaptação, maior tempo de desafio com a dieta com maior inclusão de amido, e/ou tornando mais diversificadas as dietas de diferentes grupos, analisando os níveis de IGF-1 devem ser conduzidos para investigar a relação entre acidose ruminal subclínica, alterações metabólicas e alterações histológicas de casco.

Palavras chave: Laminite, IGF-1 casco, lâmina epidermal, bovinos.

## ABSTRACT

Laminitis stands out among the diseases that affect the locomotor system. Despite being a multifactorial disease, nutritional management is still seen as having a critical role in the emergence of laminitis. However, the relationship between rumen acidosis and laminitis is questioned, as there is still no clarification of how ruminal acidosis could lead to histological changes in the hoof. Our objective was to evaluate the metabolic alterations caused by the consumption of confinement diets in steers and possible histological alterations in the hoof and other organs. Sixteen Holstein steers with an average initial live weight of  $250 \pm 25.5$  kg were used, separated into two groups that received diets with different amounts of starch, group AG (36.96% starch) and BG (16.81% of starch), evaluated over 91 days of confinement. Rumen parameters such as ruminal fluid pH and methylene blue reduction time were evaluated, as well as blood parameters such as glucose, insulin and IGF-1. The glucose tolerance test was performed on days 0, 39 and 102. A biopsy of the dermo-epidermal junction of the wall region of all animals was performed 40 days before the beginning of the experiment, and after slaughter, samples of the dermo-epidermal junctions were performed. epidermis from the wall and sole regions of the hoof were obtained and histologically processed by HE and PAS staining. Hemorrhage, inflammatory infiltrate, arteriovenous shunt in the dermis were evaluated. The morphology, length and width of the epidermal lamina, and the morphology of the epidermal cells, presence of irregularities in the basement membrane were examined by PAS staining. The high-grain diet reduced the animals' feeding and rumination time, decreased rumen fluid pH and methylene blue reduction time. In half of the animals in the group, the high-grain diet caused histological changes compatible with rumen acidosis, such as mild multifocal hydropic degeneration and intraepithelial microabscesses. The glucose area under the curve (AUC) did not differ between groups in the GTT. Feedlot diets had higher insulin AUC during GTT at the end of experiment D 102. The two feedlot diets increased the IGF-1 levels of the animals, and the AG group had the greatest increase. Feedlot diets were able to reduce the length and width of the epidermal layers. The AG group increased the length of parakeratosis in the laminar tissue. Despite the fact that there were histological changes in the hooves, there was no significant difference between diets with different starch inclusions. Although there was no difference between the groups, the most common change in the shape of the epidermal laminae was the fringing. The increase in IGF1 and the increase in insulin AUC, caused by the confinement diets, may have favored the shortening of the epidermal laminae of the laminar tissue with disappearance of the keratinized axis with the proliferation of nucleated cells

between the lamellar tissue and the beginning of the stratum corneum. that supposedly should not exist (parakeratosis), reducing the stability and quality of the lamellar tissue. Future studies with shorter adaptation time, longer challenge time with the diet with greater starch inclusion, and/or making the diets of different groups more diversified, analyzing the levels of IGF-1 should be conducted to investigate the relationship between ruminal acidosis subclinical, metabolic alterations and histological hoof alterations.

Keywords: Laminitis, IGF-1, hoof, epidermal lamina, cattle.

---

## LISTA DE FÍGURAS

---

- Figura 1 - Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de bovinos utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS) figura A e hematoxilina e eosina (HE) figura B, demonstrando a determinação do comprimento e largura da lâmina epidermal (linha preta) e comprimento da paraqueratose (linha vermelha). Aumento de 10X.....32
- Figura 2 - Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de bovinos utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), demonstração da técnica utilizada para a análise morfológica da região abaxial da LE, A: padrão, B: franjeada, C: afiada, D: bifurcada .....33
- Figura 3 - Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de bovinos utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), demonstração dos escores da morfologia das células epidérmicas, A: escore 0, B: escore 1, C: escore 2, D: escore 3. (0- predominância de células epidérmicas com núcleo oval perpendicular à membrana basal, 1- presença de cerca de 50% de células epidérmicas com núcleos ovais perpendiculares à membrana basal e 50% com núcleos redondos, 2- predominância de células epidérmicas com núcleos arredondados, 3- predominância de células epidérmicas com núcleos alongados e achatados ou ausência de núcleos).....34
- Figura 4 - Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de bovinos utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS). LE: lâmina epidermal; LD: lâmina dermal; CC: camada córnea; EQ: eixo queratinizado; P: paraqueratose. Aumentos de 4 e 10X respectivamente ....45
- Figura 5 - Epitélio da mucosa ruminal com focos discretos de vacuolização (degeneração hidrópica multifocal discreta).....50
- Figura 6 - Epitélio da mucosa ruminal com focos discretos de vacuolização, associado a infiltrado de neutrófilos íntegros e degenerados intraepiteliais (degeneração hidrópica multifocal discreta com microabscesso intraepitelial). Na lâmina própria subjacente há discreto infiltrado de neutrófilos, linfócitos e histiócitos.....50

---

## LISTA DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1 - Perfil do pH e teste de redução do azul de metileno de fluido ruminal de novilhos raça Holandês confinados submetidos a duas dietas maior: (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido), durante 91 dias.....	36
Gráfico 2 - Etograma em frequência relativa (%) do tempo de novilhos da raça Holandês alimentados com duas dietas distintas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido) ao longo de 24 horas.....	37
Gráfico 3 - Concentração plasmática média de insulina ( $\mu$ U/ml) em diferentes momentos em relação a uma infusão intravenosa (=tempo 0) de 150 mg/kg de glicose durante o teste de tolerância à glicose intravenosa (TTG) realizados nos dias 0, 39 e 102, em novilhos da raça Holandês alimentados com duas dietas distintas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido). As barras de erro representam SEM.....	39
Gráfico 4 – Área sob a curva (AUC) de glicose (mg/dl) por 120 min nos dias 0, 39 e 102 de novilhos da raça Holandês alimentados com duas dietas distintas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido).....	40
Gráfico 5 - Área sob a curva (AUC) de insulina por 120 min nos dias 0, 39 e 102 de novilhos da raça Holandês alimentados com duas dietas distintas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido).....	41
Gráfico 6 - Comprimento da lâmina epidermal (LE) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biopsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a dieta de confinamento .....	42
Gráfico 7 - Comprimento da lâmina epidermal (LE) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biopsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido) .....	43
Gráfico 8 - Largura da lâmina epidermal (LE) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biopsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e na muralha da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a dieta de confinamento .....	44
Gráfico 9 - Largura da lâmina epidermal (LE) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biopsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e na muralha da unha medial	

do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido) .....	44
Gráfico 10 -Comprimento da paraqueratose ( $\mu\text{m}$ ) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biopsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e na muralha da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a dieta de confinamento .....	46
Gráfico 11 - Comprimento da lâmina epidermal ( $\mu\text{m}$ ) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biopsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e na muralha da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido).....	46
Gráfico 12 – Correlações entre o comprimento da lâmina epidermal, largura da lâmina epidermal e espessura da paraqueratose com a área sob a curva (AUC) de insulina. ....	52

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Composição bromatológica (porcentagem da matéria seca %MS) das dietas utilizadas nos grupos Alto grão (AG) e baixo grão (BG), para bovinos machos, da raça holandês, com 12 meses de idade. ....	30
Tabela 2 - Valores médios da concentração plasmática de glicose (mg/dL), insulina ( $\mu$ IU/mL), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (ng/mL), de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido) ao longo de 91 dias .....	38
Tabela 3 - Médias do formato da lâmina epidermal (padrão, franjeada, bifurcada ou afiada) na muralha da unha lateral do membro posterior de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido), D-40 e D103. ....	47
Tabela 4 - Médias do formato da LE (padrão, franjeada, bifurcada ou afiada) na muralha da unha medial do membro anterior de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (CN; 16,81% amido). ....	47
Tabela 5 - Frequências dos escores de morfologia das células epidérmicas, integridade da membrana basal, células inflamatórias, hemorragia e shunt arteriovenoso na muralha da unha lateral do membro posterior e na muralha da unha medial do membro anterior de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido), D-40 e D103. ....	48
Tabela 6 - Frequências dos escores de morfologia das células epidérmicas, integridade da membrana basal, células inflamatórias, hemorragia e shunt arteriovenoso na sola da unha lateral do membro anterior direito e sola da unha medial do membro posterior esquerdo de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido) D 103. ....	49

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de carnes
AG	Alto grão
AGV's	Ácidos graxos voláteis
AUC	Área sob a curva
BG	Baixo grão
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNFs	Carboidratos não fibrosos
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
GLUT	Moléculas transportadoras de glicose
HE	Hematoxilina e Eosina
LEL	Lâmina epidermal
LPS	Lipopolissacarídeos
MAEM	Unha medial do membro anterior
MMP	Metaloproteinases de matriz
MPDL	Unha lateral do membro posterior direito
PAS	Ácido Periódico de Shiff
pH	Potencial hidrogeniônico
SARA	Acidose ruminal subclínica
TTG	Teste de tolerância à glicose

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos .....	17
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1. Morfologia do casco de bovinos.....	18
3.2. Laminite bovina.....	20
3.3. Rúmen.....	22
3.4. PH ruminal.....	24
3.5. Resistencia a insulina .....	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
4.1. Animais.....	28
4.2. Dieta .....	29
4.3. Coleta de material .....	30
4.3.1. Coleta e análise de fluido ruminal.....	30
4.3.2. Coleta e análise de sangue .....	30
4.3.3. Coleta e análise da histologia.....	31
4.4. Etograma.....	34
4.5. Análise estatística .....	35
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
5.1. Avaliação de parâmetros ruminais .....	35
5.2. Avaliação do comportamento.....	36
5.3. Avaliação da glicose, insulina e IGF-1.....	37
5.4. Teste de tolerância glicose (TTG) .....	38
5.5. Análise da histologia .....	42

5.6.	Correlação entre a AUC de insulina e a histologia das LE .....	51
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Brasil é o país com maior rebanho bovino comercial do mundo com cerca de 218,2 milhões de cabeças (IBGE, 2020) e de acordo com a Abrafrigo, o país movimentou 1.867.594 toneladas em 2021. Uma mudança nas preferências do consumidor, que busca cada vez mais produtos de maior qualidade, sustentáveis e rentáveis, está mudando o perfil da produção na bovinocultura mundial.

Os sistemas de produção, tanto de leite quanto o de corte, estão se intensificando nos últimos anos, devido a necessidade de aumento da produtividade com utilização de menores espaços territoriais (ABIEC, 2019). Porém, para intensificar a produção, um dos pontos fundamentais é o aumento da densidade energética da dieta, utilizando maior quantidade de concentrado.

A busca pelo aumento da eficiência produtiva de bovinos aumentou o número de confinamentos, possibilitando o uso de dietas mais controladas. O uso destas dietas intensivas é uma prática comum em sistemas de produção de bovinos de corte e leite, com o objetivo de promover o maior crescimento e produção de leite respectivamente. Porém, a inclusão de alimentos ricos em carboidratos que são facilmente metabolizados na dieta, é conhecida por aumentar o risco de desenvolver distúrbios metabólicos em animais como acidose ruminal subaguda (Tavares et al., 2019).

A alimentação eficiente com dietas ricas em grãos para ruminantes requer um equilíbrio entre altos níveis de produção e saúde animal. Dietas ricas em grãos resultam em taxas de crescimento rápidas, mas podem aumentar a incidência de doenças (Kleen et al., 2003). O confinamento, ao utilizar dietas com elevada proporção de concentrados e restringir a movimentação e o espaço dos animais pode ocasionar problemas de claudicação em bovinos de corte e leite (Passos, 2019).

A claudicação é considerada um dos três problemas mais comuns na bovinocultura de leite juntamente com a mastite e problemas reprodutivos (Brujnis et al. 2010). Estima-se que as perdas econômicas induzidas pela claudicação perdem apenas para as perdas por mastite e doenças do trato reprodutivo (Greenough, 2007). Os distúrbios locomotores são a principal causa dos impactos negativos atuais no bem-estar animal, causando dor e desconforto prolongados. (Bicalho et al., 2007; Tavares et. al., 2019).

A laminite destaca-se entre as doenças que acometem o aparelho locomotor (Ferreira, 2003). Apesar de ser uma doença multifatorial, onde a relação entre manejo ambiental e condição física pode ser considerada um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença, o manejo nutricional ainda é visto como tendo papel crítico no surgimento da laminite (Barbosa et al., 2020). A laminite pode ser causada por altos níveis de concentrado na dieta, em decorrência do aumento da produção de graxos voláteis, o que resulta em acidose ruminal (Nagaraja e Lechtenberg, 2007).

Porém, muitas vezes, a relação entre a acidose ruminal com a laminite é questionada por não haver ainda um esclarecimento de como a acidose ruminal poderia levar a alterações histológicas do casco. Além disso, apesar de ser bastante estudada a etiologia das alterações histológicas nos casos de laminite não é conhecida.

A hipótese deste trabalho é que bovinos submetidos a uma dieta de confinamento, com diferentes níveis de amido, desenvolvem um quadro de alteração metabólica que leva a alterações histológicas nos cascos que podem contribuir para a laminite subclínica. O objetivo é avaliar as alterações metabólicas causadas pelo consumo de uma dieta de alto grão, rica em amido, em novilhos e possíveis alterações histológicas no casco e outros órgãos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar as alterações metabólicas e histológicas no casco e outros órgãos de novilhos de engorda submetidos a dietas com concentrações altas e baixas de amido.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Avaliar as características do fluido ruminal de bovinos submetidos a dieta com diferentes inclusões de amido;

Avaliar alteração bioquímicas energéticas em bovinos submetidos a dieta com diferentes inclusões de amido;

Avaliar alterações comportamentais em bovinos submetidos a dieta com diferentes inclusões de amido.

Estudar a histopatologia dos cascos, rúmen, pulmão e fígado em bovinos submetidos a dietas com diferentes inclusões de amido.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Morfologia do casco de bovinos

O casco é composto por três camadas: epiderme, derme e subcútis. A derme aderida à falange distal do casco é denominada cório, que é dividido em uma camada reticular superficial e uma camada papilar profunda (constituída por lâminas dérmicas) (Van amstel e Shearer, 2006; König e Liebich, 2011). A epiderme é constituída de camadas de células vivas na parte mais interna e uma espessa camada de células mortas queratinizadas mais externamente. Essa cápsula pode ser chamada de estojo córneo (Greenough, 2007).

As camadas de células vivas da epiderme são divididas em camada basal, denominada *stratum basale*, e a camada mais interna, em contato direto com a membrana basal, onde as células estão em constante divisão mitótica. Na camada seguinte, chamada *stratum spinosum*, ocorre intensa produção de filamentos de queratina que compõem o citoesqueleto. Em regiões como bulbo e perióplo, nas quais o tecido córneo macio é produzido, existe ainda uma terceira camada granulosa, denominada *stratum granulosum*. A camada mais externa da epiderme, é formada por sucessivas camadas de células mortas queratinizadas, denominada *stratum corneum* (Greenough, 2007).

O tecido córneo é formado por um processo dinâmico de proliferação, queratinização e morte celular programada. As células jovens empurram as células mais antigas em direção ao exterior do casco. Para que o processo de queratinização ocorra adequadamente é necessária que a derme, subjacente à epiderme, se encontre íntegra (Noronha Filho, 2017). A epiderme, apesar de possuir camadas de células vivas e em constante divisão, é avascular. Assim, o oxigênio e os nutrientes necessários para a queratinização chegam por difusão da derme, que possui uma rica vascularização, atravessando a membrana basal (Mulling e Greenough, 2006; König e Liebich, 2011). Portanto, se não houver fluxo sanguíneo adequado para a epiderme, ocorrerá formação deficiente do tecido córneo. Sendo assim, a formação de um estojo córneo saudável é dependente da integridade da derme subjacente (König e Liebich, 2011; Noronha Filho, 2017).

O cório é a parte “viva” do casco formada por uma rica rede de vasos e capilares que se entrelaçam em anastomoses arteriovenosas em uma estrutura denominada papila dermal. Essa estrutura auxilia a chegada de nutrientes até a epiderme através de difusão e também promove a exposição a hormônios, que modulam e controlam a diferenciação celular na epiderme, incluindo a formação da queratina. (Amstel e Shearer, 2001; Tomlinson et al., 2004). É também

sobre a papila dermal que as células epidermais produzem células corneificadas em forma de tubos. Os túbulos cornificados são as estruturas que dão força ao casco e sua quantidade por  $\text{mm}^2$  é uma maneira de quantificar a resistência do casco (Amstel e Shearer, 2001).

O cório é dividido em quatro regiões, as quais possuem características próprias produzindo um casco com qualidades e dureza distintas. O cório perióptico é responsável pela produção do talão, cório coronário produz o tecido córneo da muralha, cório laminar produz o tecido córneo da linha branca e o cório solear produz o tecido córneo da sola (Amstel e Shearer, 2001). A quantidade de papilas dermais e, conseqüentemente de túbulos corneificados, é maior no cório coronário com aproximadamente 80 papilas dermais/ $\text{mm}^2$ . Os córios perióptico e solear possuem cerca de 20 papilas dermais/ $\text{mm}^2$ . Dessa forma, a muralha é o tecido córneo de maior resistência com maior quantidade de túbulos corneificados, seguido pela sola e talão (Amstel e Shearer, 2001; Casagrande, 2013). A linha branca, formada pelo cório laminar, não possui a estrutura de túbulos, por isso é o tecido do casco de maior flexibilidade e maciez, e possui uma alta taxa de renovação (Amstel e Shearer, 2001; Casagrande, 2013).

O tecido laminar do casco de bovinos é formado de lâminas dérmicas e epidérmicas intercaladas e aderidas ao estojo córneo do casco (König e Liebich, 2004). A sustentação deste tecido é feita pela derme situada logo abaixo das lâminas do casco (Mendes, 2015), que está aderida à falange distal (Van Amstel e Shearer, 2006). Cada lâmina epidermal possui no interior um eixo queratinizado (König e Liebich, 2004). Nos estudos sobre laminite, o tecido alvo para estudo é o tecido laminar (Nilsson, 1963; Thoenner et al., 2005; Mendes, 2015).

A membrana basal separa a epiderme da derme em todo casco. Três camadas, lâminas densas, raras e fibroreticulares compõem a membrana basal. A camada mais externa é uma lâmina rara que sustenta as células epidérmicas. A camada mais interna é a lâmina fibroreticular que é composta por fibras colágenas que se conectam às fibras colágenas na derme. A derme produz essa camada e é a parte susceptível à degradação por enzimas metaloproteinases da matriz extracelular. A epiderme produz a lâmina rara e densa, que se situa entre a lâmina fibroreticular e a lâmina rara (Greenough, 2007).

A membrana basal sustenta e orienta os queratinócitos durante a proliferação e diferenciação das células da epiderme. Como resultado, danos à membrana basal podem causar perda da organização da epiderme ou anormalidades no padrão de crescimento dos queratinócitos (Van Amstel e Shearer, 2006).

### 3.2. Laminite bovina

O termo laminite significa inflamação do cório laminar do casco (Danscher et al., 2009), porém muitos autores questionam o termo, pelo fato de que a região laminar não é a única afetada (Lischer e Ossent, 2002). Como todos os segmentos dérmicos são acometidos, o termo pododermatite asséptica difusa seria mais adequado (Lischer e Ossent, 2002; Van Amstel, 2009; Noronha Filho, 2017).

A laminite ou pododermatite asséptica difusa, é uma inflamação difusa não infecciosa do cório (Vermunt, 1994; Ossent et al., 1997). A laminite resulta em um processo de queratinização deficiente, com conseqüente produção de um tecido córneo de pior qualidade e menor resistência, tornando o casco mais susceptível a doenças (Hendry et al., 2003; Lean et al., 2013).

A laminite pode se desenvolver de três formas distintas, laminite aguda, laminite subclínica e laminite crônica. A primeira é rara e causa muita dor ao animal que tende a ficar em posições anormais. A inflamação do cório é evidente com dilatação das veias e artérias presentes nas anastomoses. É possível observar as veias dos membros ingurgitadas e a banda coronariana apresenta-se normalmente hiperêmica e com hipertermia local (Ossent et al., 1997; Lean et al., 2013).

A laminite subclínica é uma condição crônica, lenta que só se torna aparente com o tempo, quando é observado um casco de qualidade ruim e macio. Ocorre alterações hemodinâmicas, como hemorragias que são observadas na sola e linha branca e aumento da incidência de doenças como úlcera de sola, sola dupla e doença da linha branca (Ossent et al., 1997; Lean et al., 2013).

A laminite crônica não apresenta sinais sistêmicos e ocorre em decorrência de quadros sucessivos de laminite clínica ou subclínica. Ocorre principalmente em animais mais velhos, apresentando cascos deformados, alongados, largos, planos e com estrias horizontais (Lean et al., 2013). Essa representa uma das principais causas de descarte de vacas de leite (Ossent et al., 1997).

A etiologia da laminite é complexa e multifatorial e apesar de vários fatores de risco terem sido evidenciados, a sua patogênese ainda permanece um desafio para os pesquisadores (Ossent et al., 1997; Danscher et al., 2010; Noronha Filho, 2017). Muitos estudos comprovam a relação da nutrição com a ocorrência de laminite, principalmente o teor de carboidratos rapidamente fermentáveis, capazes de induzir a acidose ruminal subclínica ou clínica (Nocek,

1996; Danscher et al., 2010). Porém a teoria de que a patogênese da laminite está completamente relacionada com a nutrição está sendo questionada (Cook et al., 2004; Mülling e Greenough, 2006; Vermunt, 2006). Pesquisas mais recentes apontam para uma relação não causal entre laminite e acidose ruminal, ou seja, elas podem existir independentemente uma da outra (Lischer e Ossent, 2002; Lean et al., 2013; Bicalho e Oikonomou, 2013).

O consumo de grandes quantidades de concentrado provoca aumento na produção de ácidos graxos voláteis (AGV`s) no interior do rúmen reduzindo o pH ruminal. Essa mudança no ambiente ruminal favorece a multiplicação de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus bovis* e *Lactobacillus sp*) que produzem ácido lático. O ácido lático reduz mais o pH ruminal, resultando na morte de bactérias Gram-negativas e liberação de endotoxinas, os lipopolissacarídeos (LPS) (Nagaraja e Lechtenberg, 2007; Barbosa, 2019). Além disso, ocorrem respostas inflamatórias na mucosa do rúmen aumentando a permeabilidade vascular. As endotoxinas são absorvidas pela corrente sanguínea, e a interação delas com o sistema imune dispara uma cascata de eventos levando a efeitos fisiopatológicos graves, especialmente na microcirculação e liberação de diversas citocinas e proteínas de fase aguda como amiloide sérica A e haptoglobina (Smith, 2005; Dong et al., 2015, Bäbler et al., 2021).

A patogenia da laminite se inicia com distúrbios metabólicos com posterior degradação mecânica (Nocek, 1996). Vários trabalhos demonstram o potencial de substâncias vasoativas que são produzidas em quadros de acidose ruminal, metrite e mastite para alterar a perfusão vascular do casco. A histamina, ácido lático, endotoxinas e serotoninas são as principais substâncias estudadas.

Além dos efeitos na microcirculação, as endotoxinas podem estar indiretamente associadas à liberação e ativação de proteases chamadas metaloproteinases de matriz (MMP) (Noronha Filho, 2017). As MMP causam a degradação das fibras de colágeno e um enfraquecimento do aparelho de sustentação (Leacher e Ossent, 2002; Tarlton et al., 2002). Assim, pode ocorrer o deslocamento da falange distal, aumento da pressão exercida pela falange distal sobre o cório, causando úlcera de sola e hemorragias (Leacher e Ossent, 2002; Tarlton et al., 2002; Danscher et al, 2010).

As alterações histopatológicas que ocorrem no casco de bovinos acometidos por laminite, estão normalmente associados à inflamação e alterações morfológicas nas células epidérmicas e membrana basal (Nilsson, 1963; Thoenner et al., 2005; Danscher et al., 2010; Mendes et al., 2013).

Os cascos dos bovinos sofrem influências do metabolismo animal e ao mesmo tempo dos fatores ambientais externos. A interação entre os processos fisiopatológicos que ocorrem no interior do casco com os fatores externos pode ser o fator determinante para a ocorrência ou não da laminite. Isso é demonstrado no estudo de Bergsten e Frank (1996) que ao investigarem o efeito da dieta e do piso de freestall não encontraram influência na prevalência de hemorragia de sola entre os pisos de concreto ou de borracha ou pela dieta mais rica em grãos (6,5Kg) e menos rica em grãos (0,4 Kg). Porém, ao combinar a dieta mais rica em grãos com o piso de concreto, as novilhas do estudo apresentaram scores de hemorragia de sola piores. Dessa forma, tem se dado cada vez mais importância ao conforto animal principalmente em animais estabulados, cuidados com o casco e ao período de transição (Mülling e Greenough, 2006; Vermunt, 2006; Bicalho e Oikonomou, 2013). Confinamentos mal dimensionados não favorecem o decúbito e são associados a maior incidência de lesões digitais (Bergsten, 2003).

Os fatores ambientais mais importantes são aqueles que interferem no tempo de descanso e tempo em pé, fatores que podem causar acidose ruminal subclínica (SARA) e fatores referentes à superfície do solo que interferem no crescimento, desgaste e interação de forças do casco com o solo (Cook et al., 2004). Aspectos hereditários e inerentes do animal como condição e peso corporal e aprumos das pernas também interferem na ocorrência de laminite (Wells et al., 1993; Nocek, 1996).

### **3.3. Rúmen**

Uma característica evolutiva dos ruminantes é a capacidade de aproveitar de forma eficiente carboidratos estruturais e compostos nitrogenados não proteicos (Valadares Filho e Pina, 2006). Essa capacidade foi adquirida devido ao desenvolvimento de pré-estômagos (rúmen, retículo e omaso) e da simbiose com microrganismos que fermentam os componentes dos alimentos (carboidratos e proteínas), transformando-os em subprodutos como ácidos graxos voláteis (AGVs), proteína microbiana e vitaminas do complexo B e K, que são utilizados pelo metabolismo do animal (Van Soest, 1994). Assim, este tipo de herbívoro se alimenta de forma mais eficiente da celulose, e permite o melhor aproveitamento de recursos forrageiros de qualidade baixa (Higino, 2019).

O ecossistema de microrganismos ativos no interior do rúmen consiste principalmente de bactérias (60 a 90% da massa microbiana), protozoários, fungos anaeróbios e bacteriófagos. Estes microrganismos são mantidos pelos nutrientes dos alimentos consumidos pelo animal e pelas condições físico-químicas ruminais (pH, temperatura, anaerobiose e osmolaridade), que

também são influenciadas pela dieta (Hungate, 1966; Russell e Rychlik, 2001; Kozloski, 2002; Cabral et al., 2016). A qualidade e a quantidade dos produtos da fermentação são dependentes do sinergismo e antagonismo dos diferentes grupos de microrganismos, que resultam na bioconversão dos alimentos na forma que será utilizada pelo animal (Reece, 2006).

O perfil microbiano, assim como a quantidade e proporção dos subprodutos da fermentação microbiana, pode ser influenciado por parâmetros fisiológicos ruminais (pH, temperatura, anaerobiose e taxa de passagem), e estes parâmetros podem sofrer interferência pelo tipo de alimento, a forma que é fornecido e a taxa de passagem da dieta. Há uma especificidade dos microrganismos em digerir determinados nutrientes da dieta. Dietas ricas em forragens resultam em maior atividade de bactérias celulolíticas e sacarolíticas, aumentando a produção, principalmente, de ácido acético. Já as dietas ricas em amido e/ou proteína aumentam a ação das bactérias aminolíticas e/ou proteolíticas, que são produtoras principalmente de ácido propiônico (Church, 1993; Manella et al., 2003). A amônia oriunda da degradação dos compostos nitrogenados, juntamente com o fornecimento de energia, oriundo de carboidratos de rápida fermentação e carbonos, são utilizados pelos microrganismos para síntese de proteína microbiana (Hungate, 1966; Van Soest, 1994; Lima, 2008).

Dentre os fatores citados, que podem influenciar a atividade de fermentação ruminal, a temperatura no interior do rúmen deve ser mantida relativamente constante entre 37°C e 39 °C. No entanto a temperatura da água consumida pode afetar a temperatura do rúmen, influenciando a atividade de fermentação ruminal (Owens e Goetsch, 1993; Berchielli et al., 2006).

A granulometria do alimento fornecido ao animal influencia na taxa de passagem da dieta e na fermentação ruminal. A moagem fina aumenta a densidade e a ingestão da dieta, promovendo rápida passagem do material insolúvel. As dietas que são totalmente moídas levam a perda da estratificação do conteúdo ruminal, permitindo rápida passagem de partículas grosseiras, diminuindo sua degradação e aproveitamento por parte dos microrganismos ruminais. Além disso, dietas que possuem altas taxas de passagem, estão associadas a altas concentrações de acetato (Manella et al., 2003).

Dietas com pouca fibra efetiva elevam a produção de AGVs, levando ao abaixamento do pH ruminal, desfavorecendo o desenvolvimento de algumas espécies de microrganismos que não toleram essas condições. Microrganismos celulolíticos e metanogênicos possuem pouca tolerância ao abaixamento do pH ruminal (Slyter, 1976). Dietas com alto teor de fibra efetiva estimulam maior taxa de ruminção e maior produção de saliva, o que leva ao tamponamento do conteúdo ruminal (Cunha, 2021).

### 3.4. PH ruminal

O rúmen possui um pH ideal (entre 6,6 e 7,4) para que os microrganismos se desenvolvam de forma adequada (Van Soest, 1994). A utilização de forragem pelos ruminantes depende da atividade dos microrganismos ruminais, que são afetados pelas características do ambiente ruminal e sua atividade fermentativa é sensível às variações do pH do meio (Mould e Ørskov, 1983). O pH ruminal é o segundo fator mais importante determinante da comunidade microbiana, depois da disponibilidade de nutrientes (Cabral et al., 2016).

O pH no rúmen é determinado pela relação entre a produção de ácidos pela microbiota ruminal e a eficiência dos mecanismos de tamponamento destes. A produção de ácidos é dependente da quantidade de carboidratos consumida e da sua taxa e extensão de digestão ruminal, enquanto que o seu tamponamento é mantido pela ação da saliva (neutralização por íons bicarbonato e fosfato) e remoção desses ácidos do rúmen, via absorção pelo epitélio ruminal ou passagem para o trato digestivo inferior (Cabral et al., 2016). Portanto, o pH ruminal varia de acordo com a dieta e o com o tempo após o consumo (Silveira et al., 2006). E como foi mencionado anteriormente, o aumento do consumo de amido leva ao acelerado crescimento de bactérias amilolíticas e ao aumento na produção de AGV's no interior do rúmen reduzindo o pH ruminal (Nagaraja e Lechtenberg, 2007; Barbosa, 2019).

As bactérias fibrolíticas e protozoários atuam de forma adequada em uma faixa de pH variando entre 6,2 e 6,8. O pH abaixo de 6,2 aumenta o tempo de colonização da fibra e inibe a sua degradação. No entanto, as bactérias amilolíticas vão atuar em uma faixa de pH mais baixo (5,8) (Van Soest, 1994).

A manutenção do pH em níveis adequados, entre 6,0 e 7,0, depende da capacidade de produção de agentes tamponantes, como sais à base de carbonatos, e da remoção dos AGVs por meio da absorção no rúmen (Van Soest, 1994). A saliva é uma importante fonte de bases tampão (Counotte et al., 1979) e a alcalinidade da saliva de ruminantes é conhecida há quase 200 anos (Tiedemann e Gmelin, 1826). Os ruminantes mantêm os níveis de pH do meio ruminal adequados, através da saliva, que contém bicarbonato de sódio e fosfato (McDougall, 1948) e possui pH em torno de 8,1. A secreção de saliva depende do tipo de dieta que o animal recebe: dietas com alto teor de umidade diminuem a produção de saliva, no entanto alimentos ricos em fibra induzem maior secreção de saliva (Berchielli et al., 2006).

Como a ingestão e a fermentação variam, o pH ruminal também varia ao longo do dia e pode diferir substancialmente dentro de um animal por dias consecutivos. Assim, apenas a

medição contínua do pH ruminal por um período prolongado pode servir para avaliar adequadamente o equilíbrio ácido-base ruminal (Aschenbach et al., 2010). A variação dentro de um dia é afetada pelo consumo da dieta, com o pH diminuindo após uma refeição e se recuperando lentamente até a próxima refeição (Allen, 1997).

As definições de SARA são baseadas no pH do fluido ruminal (Stone, 2004; Duffield et al., 2004). O risco de SARA aumenta quando o pH ruminal cai abaixo de 5,6 por mais de 3 h/d (Plaizier et al., 2008) ou permanece abaixo de 5,8 por mais de 5 a 6 h/d (Zebeli et al., 2008). Este pH pode ser medido após a coleta do líquido ruminal, seja com sonda esofágica ou por rumenocentese (Duffield et al., 2004).

A variação do pH demonstra que a taxa de produção de ácido pode exceder a taxa de remoção de ácido ou tamponamento de prótons. Carboidratos solúveis e amido são mais eficazes em diminuir o pH ruminal rapidamente, enquanto aumentar a quantidade de fibra fisicamente efetiva na dieta é a medida nutricional mais eficiente para aliviar o declínio do pH após uma refeição (Allen, 1997; Zebeli et al., 2008). A fermentação de amido diminui o pH ruminal, por produzir maior quantidade de AGVs, principalmente propionato pela via do ácido láctico, que pode se acumular no rúmen, reduzindo a digestão da fibra (Van Soest, 1994).

Vacas submetidas a dietas ricas em concentrado apresentam menor valor de pH (5,6), devido a rápida fermentação ruminal, já dietas com maior quantidade de volumoso apresentam maior valor de pH (6,3), por induzir maior produção de saliva (Moreira et al. 2009).

Vacas que ingerem dietas ricas em concentrado, podem desenvolver proliferação celular excessiva e diferenciação celular aberrante dentro do epitélio escamoso estratificado da parede ruminal causando paraceratose ruminal bovinos (Steele et al. 2012). Pode ocorrer formações de microabscessos e agregações focais de neutrófilos no estrato córneo (Fergusson et al., 2022). Sasikala et al., (2018) observou degeneração vacuolar maciça do epitélio escamoso resultando em deslocamento de seu núcleo no rúmen em bovinos com lactacidose ruminal. Segundo Jubb (2015), no exame microscópio das papilas ruminiais, há marcada vacuolização citoplasmática das células epiteliais e reação neutrofílica leve a marcante é evidente na mucosa e na submucosa.

Além disso, o consumo destas dietas pode causar ruminite e erosão das junções celulares no epitélio ruminal de bovinos (Steele et al. 2009). Essa lesão no epitélio ruminal leva a perda da função de barreira, o que pode levar à transmigração de endotoxinas e bactérias do rúmen para a circulação sistêmica e reduz a absorção de AGV's (Plaizier et al., 2008).

### 3.5. Resistencia a insulina

O metabolismo da glicose nos mamíferos é de grande interesse, pois células de órgãos vitais utilizam apenas a glicose como substrato para a produção de energia. O metabolismo de glicose nos ruminantes é caracterizado por baixas concentrações de glicose periférica e baixa resposta insulínica (Brockman, 1986; Kaske et al., 2001).

Diferentemente dos monogástricos, a maior parte da glicose circulante nos ruminantes se origina da gliconeogênese hepática e renal, sendo o propionato o precursor mais importante quantitativamente (60-74%) seguido por lactato (16- 26%) (De Koster et al., 2013).

Como já foi discutido nas seções anteriores, dietas baseadas em grandes quantidades de concentrados proporcionam maior proliferação de bactérias amilolíticas no rúmen (Slyter, 1976; Manella, 2003). Estas bactérias são responsáveis pela produção de lactato no rúmen, que pode ser utilizado pelo fígado para a produção de glicose (Nocek, 1996). Porém, uma grande e/ou rápida produção de lactato pode ser prejudicial à saúde do bovino devido ao maior risco de acidose ruminal (De Koster et al., 2013).

Como a glicose não consegue passar pela membrana plasmática que envolve as células, a captação ocorre por difusão facilitada ou cotransporte. Sendo que a maioria das células captam a glicose por difusão facilitada, através de moléculas transportadoras de glicose (GLUT) (De Koster et al., 2013).

A ação metabólica da insulina é manter a homeostase da glicose no corpo e promover a utilização eficiente da glicose. A insulina estimula a captação de glicose no músculo esquelético e adipócitos e a síntese de glicogênio no músculo e no fígado, com inibição simultânea da gliconeogênese no fígado (Geor, 2008). A nível celular, a insulina promove sua ação ligando-se ao seu receptor específico, no músculo esquelético, isso resulta no recrutamento de GLUT-4 para a superfície celular, facilitando a captação de glicose (Saltiel, 2001).

A resistência à insulina é definida como um estado em que uma concentração normal de insulina possui menor capacidade em estimular a utilização de glicose nos tecidos sensíveis à insulina. A resistência à insulina pode ser atribuída a uma diminuição na resposta à insulina, uma diminuição na sensibilidade à insulina ou ambos (Kahn, 1978).

Vacas leiteiras são resistentes à insulina no final da gestação e no início da lactação. Essas adaptações homeoréticas são fundamentais para garantir o suprimento de glicose adequado para o útero gravídico e a glândula mamária em lactação. Entretanto, a resistência à

insulina também pode possuir causas patológicas como a obesidade, cetose e inflamação sistêmica (De Koster et al., 2013). Isso ocorre devido a uma falha da sinalização dos receptores de insulina nas paredes celulares, prejudicando a ligação da insulina em seus receptores (Corry e Tuck, 2001).

A associação entre resistência à insulina e risco de laminite em equídeos é estudada a alguns anos (Treiber et al., 2006; Meier et al., 2018) e recentemente vem sendo mais pesquisada em ruminantes (Bäbler et al., 2021). Em cavalos e pôneis, assim como em humanos, a obesidade parece ser um importante fator causador da resistência à insulina (Carter et al., 2009). A obesidade induz um estado inflamatório crônico, e esta inflamação desempenha um papel importante na patogênese da resistência à insulina (Muio, 2008).

O excesso de nutrientes pode levar à disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e também estresse de membrana e retículo endoplasmático, prejudicando a sinalização da insulina e aumenta a produção de citocinas inflamatórias (Bäbler et al., 2021).

Segundo Bäbler et al., (2021) a redução da sensibilidade à insulina, resulta em hiperinsulinemia compensatória. Asplin et al., (2007) demonstraram que a hiperinsulinemia pode desencadear laminite em equinos, levando a alterações histológicas como disqueratose, aumento da apoptose e proliferação das lamelas epidérmicas no cório dos cascos.

No estudo de Bäbler et al., (2021) uma ampla gama de efeitos metabólicos de uma ingestão cronicamente aumentada de nutrientes (energia, amido e proteína) foi demonstrada por análise metabolômica. A maioria das alterações nos perfis metabólitos de touros com dietas ricas em energia e proteína foi associada a alterações negativas do metabolismo, levando estes animais a um risco metabólico aumentado para desenvolver distúrbios metabólicos inflamatórios, como laminite.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais com o protocolo 192/19 e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Este experimento faz parte de um projeto maior, por isso muitas das metodologias foram descritas em detalhes por Martins, 2020. Entretanto iremos repetir alguma delas para melhor esclarecimento.

#### **4.1. Animais**

Foram utilizados 16 bovinos machos inteiros da raça Holandês, com aproximadamente doze meses de idade e peso médio inicial de  $250 + 25,5$  kg. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais por pares, de acordo com o peso inicial. Ao grupo alto grão (AG) foi fornecido uma dieta de maior teor de amido, visando um ganho de peso médio diário de 1,5 kg por dia. Ao grupo baixo grão (BG), foi fornecido uma dieta com menor inclusão de amido, visando ganho de peso médio diário previsto de 0,7 kg por dia. A dieta foi fornecida por três meses e no final os animais foram destinados ao abate em frigorífico comercial.

Os animais foram pesados em balança a cada 30 dias para realização do cálculo de ganho de peso diário. Durante o período experimental os animais permaneceram em um galpão fechado, em sistema de tie stall, com cocho de água e de alimento individual, contendo telas para controle de ectoparasitas e com cama de tapetes de borracha. A instalação era provida de ventilação natural e de ventiladores, além da presença de exaustores no telhado.

Os animais de ambos os grupos foram diagnosticados com babesiose no 11º dia experimental, por esfregaço sanguíneo. Todos os animais foram tratados com Dipropionato de Imidocarb (1,2 mg/kg) por via subcutânea. O volume globular desses animais foi monitorado a cada 48 horas, e as coletas experimentais retornaram quando os valores de volume globular atingiram níveis fisiológicos, e o consumo voluntário retornou ao observado anteriormente a doença. No dia 44, todos os animais apresentaram riquetsemia de *Anaplasma marginale* leve a moderada, com três deles apresentando volume globular inferior a 25%. Todos os animais foram tratados com enrofloxacino (7,5mg/kg) por via intramuscular e acompanhados clinicamente até ao restabelecimento do volume globular. De acordo com o último episódio, todos os animais foram tratados com enrofloxacino novamente no dia 70. Não houve coletas do experimento durante as fases consideradas como doença.

## 4.2. Dieta

Os animais desde o desaleitamento recebiam dietas a base de silagem de milho e concentrado. No início do experimento foi realizado um período de adaptação da dieta de vinte e oito dias. Os animais do grupo AG começaram o período experimental com quarenta por cento do total de concentrado do que ingeriram ao final do período de adaptação. Ocorreu um acréscimo de dez por cento em média a cada quatro dias. Ao final dos vinte e oito dias de experimento os animais do grupo AG já estavam ingerindo a proporção calculada de concentrado para dieta deste grupo. O BG permaneceu com dieta semelhante à ofertada anteriormente ao experimento, com ajuste da quantidade para atender as exigências de ganho de peso desejado.

Para formulação da dieta total foi utilizado software comercial específico para gado de corte (SuperCrac Bovinos Corte 4.9) e os requerimentos nutricionais foram calculados de acordo com NRC 2001. A dieta do grupo AG era composta de 19,59% de volumoso e 80,41% de concentrado e do grupo BG era de 74,95% de volumoso e 25,05% de concentrado em matéria seca.

O volumoso utilizado foi silagem de milho e o concentrado constituído de fubá e farelo de soja na proporção de 70% e 30% respectivamente e sal mineral comercial para bovinos (FOSBOVI® 40), fornecido 100g por animal/dia, individualmente para garantir a ingestão total por cada animal. As dietas de ambos os grupos foram compostas pelos mesmos ingredientes, variando apenas a proporção dos mesmos. Nenhum tipo de aditivo foi adicionado a dieta.

As dietas foram distribuídas duas vezes ao dia, as oito e às dezoito horas, e ao longo do dia o alimento foi revirado nos cochos dos animais. Os alimentos fornecidos, assim como as sobras, eram pesados individualmente para calcular o consumo e ajustar a quantidade que seria fornecida no dia seguinte. A quantidade da dieta oferecida foi ajustada diariamente para garantir, no mínimo, 5% de sobra no cocho.

Tabela 1 - Composição bromatológica (porcentagem da matéria seca %MS) das dietas utilizadas nos grupos Alto grão (AG) e baixo grão (BG), para bovinos machos, da raça holandês, com 12 meses de idade.

Descrição (%MS)	AG	BG
Matéria Seca	59,51	34,13
Proteína Bruta	14,36	11,89
Proteína Disponível	13,9	11,05
FDA	15,04	29,38
FDN	26,82	45,2
Lipídeos	3,56	2,58
Cinzas	5,78	10,49
Lignina	2,33	4,9
Amido	36,98	16,81
Amido %CNF	72,29	53,33
CNF	51,15	31,53
NDT	76,33	60,58

CNF – Carboidrato não fibroso

### 4.3. Coleta de material

#### 4.3.1. Coleta e análise de fluido ruminal

As coletas de fluido ruminal ocorreram nos dias 0, 7, 28, 35, 63 e 91. O dia 0 representa o início e o dia 28 o final do período de adaptação à dieta e o dia 91 o final do experimento. Esses procedimentos foram realizados através de sondagem esofágica logo antes do primeiro fornecimento da dieta no dia, e após 4, 6, 8 e 10 horas do fornecimento (T0, T4, T6, T8 e T10, respectivamente).

Foram coletadas amostras de 200ml de fluido ruminal que posteriormente foram coadas em peneiras revestidas por gazes e o pH mensurado com um phmetro digital portátil (Phmetro Medidor de pH Digital Kasvi com KCL), previamente calibrado. Em seguida foi realizada a prova de redução do azul de metileno de acordo com Rodrigues et al. (2013).

#### 4.3.2. Coleta e análise de sangue

As coletas de sangue ocorreram por venopunção de jugular utilizando-se tubos a vácuo seco, contendo EDTA e fluoreto de sódio. Os momentos de coleta seguiram o mesmo padrão das coletas de fluido ruminal (dias 0, 7, 28, 35, 63 e 91).

Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos, para a retirada do soro e do plasma. Em seguida congelados à -20° C em tubo tipo eppendorf para posteriores análises

bioquímicas. A bioquímica clínica foi realizada por espectrofotometria em aparelho automático (Cobas Mira Plus), utilizando reagentes de kits comerciais da marca Biotécnica: glicose. A dosagem de insulina e IGF-1 foi realizada por quimiluminescência em analisador automático IMMULITE 2000, utilizando kits comerciais.

Os testes de tolerância à glicose (TTG) foram realizados nos dias D0, D39, D102 de acordo com Holtenius et al. (2003). Os animais permaneceram em jejum uma hora antes e durante o TTG. Um cateter foi inserido em uma das veias jugulares, para evitar a coagulação, o cateter foi revestido com heparina sódica. Realizou-se a infusão de 150 mg/kg de glicose. O tempo de infusão da solução glicosada foi de aproximadamente 8min. As amostras de sangue foram coletadas -15, 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min em relação à infusão da solução glicosada. As medições do teste de tolerância à glicose incluíram as curvas de glicose e insulina e a área sob da curva das curvas de insulina.

#### **4.3.3. Coleta e análise da histologia**

Amostras do tecido lamelar da muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo foram obtidas 40 dias antes do início do experimento em todos os animais, conforme técnica de biópsia previamente estabelecida (Mendes et al. 2015). Outra coleta desse tecido foi feita após o abate dos animais (D 103), retirando fragmentos da muralha da unha lateral do membro posterior direito, muralha da unha medial do membro anterior esquerdo, sola da unha lateral do membro anterior direito e sola da unha medial do membro posterior esquerdo. Além disso, também foram coletadas amostras histológicas de rúmen, fígado e pulmão após o abate. As amostras obtidas foram fixadas em formol tamponado a 4% por 48 horas, processadas histotecnica e inclusas em parafina. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram obtidos em lâminas e corados por Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Shiff (PAS), para avaliação histológica das amostras.

As avaliações foram realizadas em um microscópio Nikon Eclipse E 200 acoplado à câmera Tucsen 2.0 e com auxílio do software TC Capture. Utilizou-se o software para fazer a medição das lâminas epidermais após calibração conforme o manual.

O comprimento da lâmina epidermal (LE), foi registrado em todas as amostras de tecido lamelar por meio da medida da reta situada a partir do limite da lâmina epidermal com a derme até o final do estrato espinhoso, conforme demonstrado na Figura 1. Da mesma forma obtiveram-se as larguras das LE, foi definida como a distância entre as extremidades da LE na porção axial. Também medimos a distância de uma camada normal constituída de células

nucleadas entre o tecido lamelar e o início da camada córnea que supostamente não deveria existir (paraqueratose). O comprimento e largura das LE foram mensuradas nas lâminas coradas com PAS, que facilita a visualização da membrana basal, enquanto que a paraqueratose foi mensurada nos cortes histológicos corados com HE, que facilita a visualização da camada córnea.

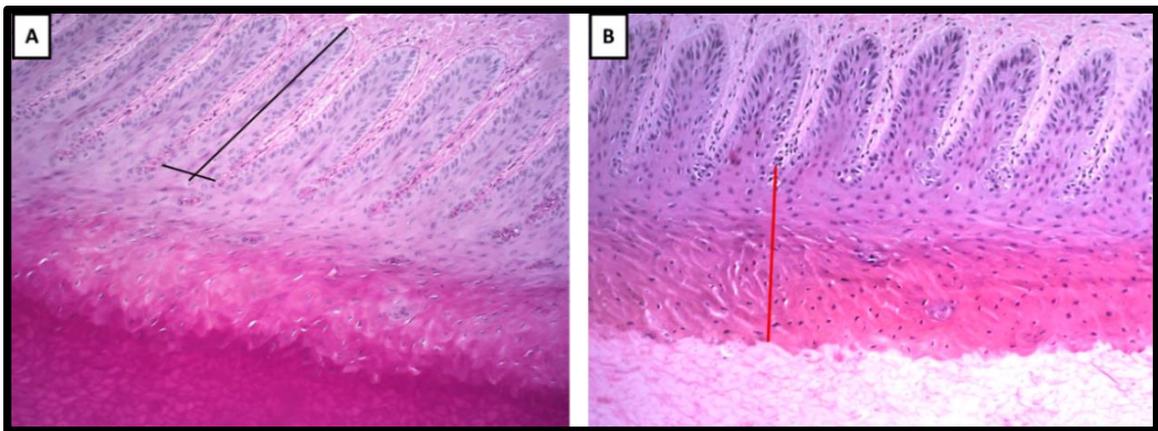


Figura 1 - Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de bovinos utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS) figura A e hematoxilina e eosina (HE) figura B, demonstrando a determinação do comprimento e largura da lâmina epidermal (linha preta) e comprimento da paraqueratose (linha vermelha). Aumento de 10X

Para determinar a quantidade de LE que deveriam ser medidas para se obter a média aritmética de cada amostra, foi mensurado o comprimento e largura de 100 LE e calculado a média e o desvio padrão. Posteriormente foi-se reduzindo o número de lâminas mensuradas e calculando-se o desvio padrão e a média. O menor número de lâminas mensuradas sem que a média e o desvio padrão alterasse foi de 25. A partir de então, foi mensurado o comprimento e largura de 25 LE em cada corte histológico. As lâminas também foram classificadas de acordo com seu formato na região abaxial como padrão, bifurcada, franjeada e afiada, adaptado de Ribeiro (2017) (Figura 2).

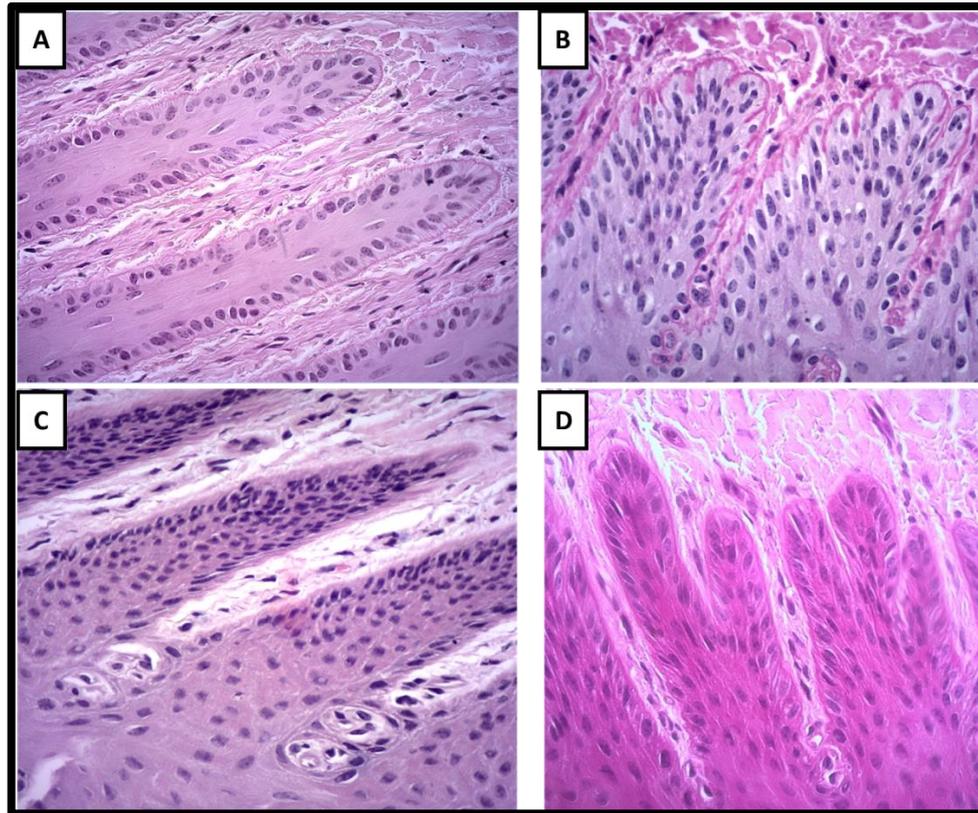


Figura 2 - Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de bovinos utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), demonstração da técnica utilizada para a análise morfológica da região abaxial da LE, A: padrão, B: franjeada, C: afiada, D: bifurcada

A avalia o histológica foi realizada adaptada de Boosman et al., (1989). Na colora o HE, os escores foram graduados para achados relacionados a hemorragia, infiltrado inflamatório na derme e shunt arteriovenoso. As pontua es foram graduadas de 1 a 4 para a presença de hemorragia (1-nenhuma hemorragia, 2- pequenos pontos hemorrágicos, 3- hemorragias colunares finas, 4- grandes hemorragias irregulares). As pontua es foram graduadas de 1 a 4 para a presença de células inflamatórias (1- sem leucócitos ou linfócitos, 2- alguns leucócitos e/ou linfócitos dispersos, 3- alguns leucócitos e/ou linfócitos com leve infiltra o focal, 4- alguns leucócitos dispersos e / ou linfócitos com grande infiltra o focal). As pontua es foram graduadas de 1 a 3 para a presença de shunt arteriovenoso (1- sem shunts A-V proeminentes, 2- alguns pequenos shunts irregulares de A-V, 3- número moderado de pequenos shunts a-v com forma o inicial "neo-capilar").

A morfologia das células epidérmicas e a integridade da membrana basal foram avaliadas nas lâminas coradas com PAS de acordo com Mendes et al. (2013). As células epidérmicas foram examinadas no terço médio das lâminas e aferido um escore de 0 a 3 (0- predominância de células epidérmicas com núcleo oval perpendicular à membrana basal, 1-

presença de cerca de 50% de células epidérmicas com núcleos ovais perpendiculares à membrana basal e 50% com núcleos redondos, 2- predominância de células epidérmicas com núcleos arredondados, 3- predominância de células epidérmicas com núcleos alongados e achatados ou ausência de núcleos) (Figura 3). A membrana basal foi examinada em toda a sua extensão e graduada de 0 a 4 de acordo com a intensidade das irregularidades (0- ausente, 1- discreto, 2- leve, 3- moderado, 4- marcado).

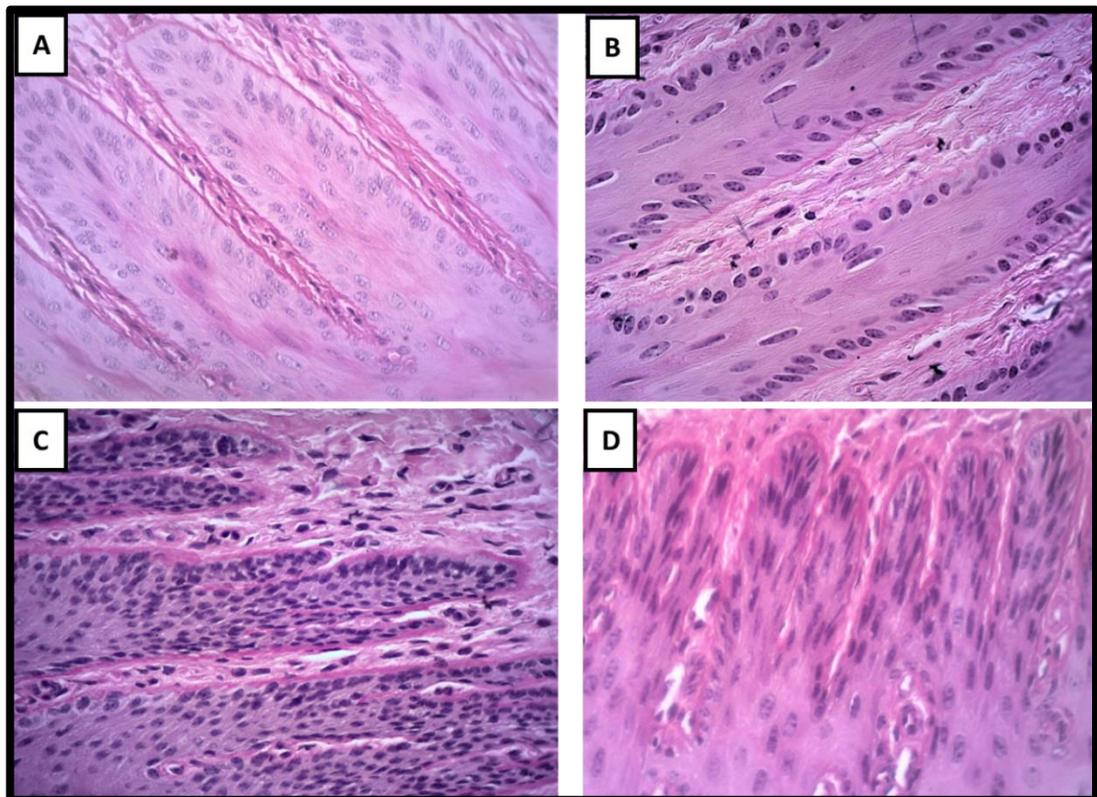


Figura 3 - Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de bovinos utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS), demonstração dos escores da morfologia das células epidérmicas, A: escore 0, B: escore 1, C: escore 2, D: escore 3. (0- predominância de células epidérmicas com núcleo oval perpendicular à membrana basal, 1- presença de cerca de 50% de células epidérmicas com núcleos ovais perpendiculares à membrana basal e 50% com núcleos redondos, 2- predominância de células epidérmicas com núcleos arredondados, 3- predominância de células epidérmicas com núcleos alongados e achatados ou ausência de núcleos).

#### 4.4. Etograma

Como descrito por Martins (2020), no dia 80, foi realizada a avaliação do etograma durante 24 horas seguidas. Para o registro do tempo destinado ao consumo de alimento e água, ruminância deitado e em pé, ócio deitado e em pé, adotou-se observação visual dos animais a

cada 5 minutos. Durante as observações noturnas, o ambiente foi mantido com iluminação artificial. As observações foram realizadas por duplas de observadores que foram trocados a cada duas horas, sem repetição de observadores ao longo das vinte e quatro horas.

#### **4.5. Análise estatística**

Foi realizada análise descritiva de todas as variáveis de muralha e sola. Para as variáveis da muralha da unha lateral do membro posterior, foi realizada análise de variância após ajuste de modelo misto considerando os efeitos de dieta, momento e dieta x momento como fixos. O efeito de animal foi considerável como aleatório para comportar as medidas repetidas no tempo. Para os dados da muralha da unha medial do membro anterior, sola da unha lateral do membro anterior direito e sola da unha medial do membro posterior esquerdo, foi realizado o teste T para comparação das dietas ou o teste de Mann-Whitney de acordo com a satisfação para as premissas do teste paramétrico. O teste de Shapiro-Wilk e análises gráficas dos resíduos foram utilizados para avaliar a normalidade e a homocedasticidade. Todas as avaliações foram realizadas por meio do software R 4.0.2.

### **5. Resultados**

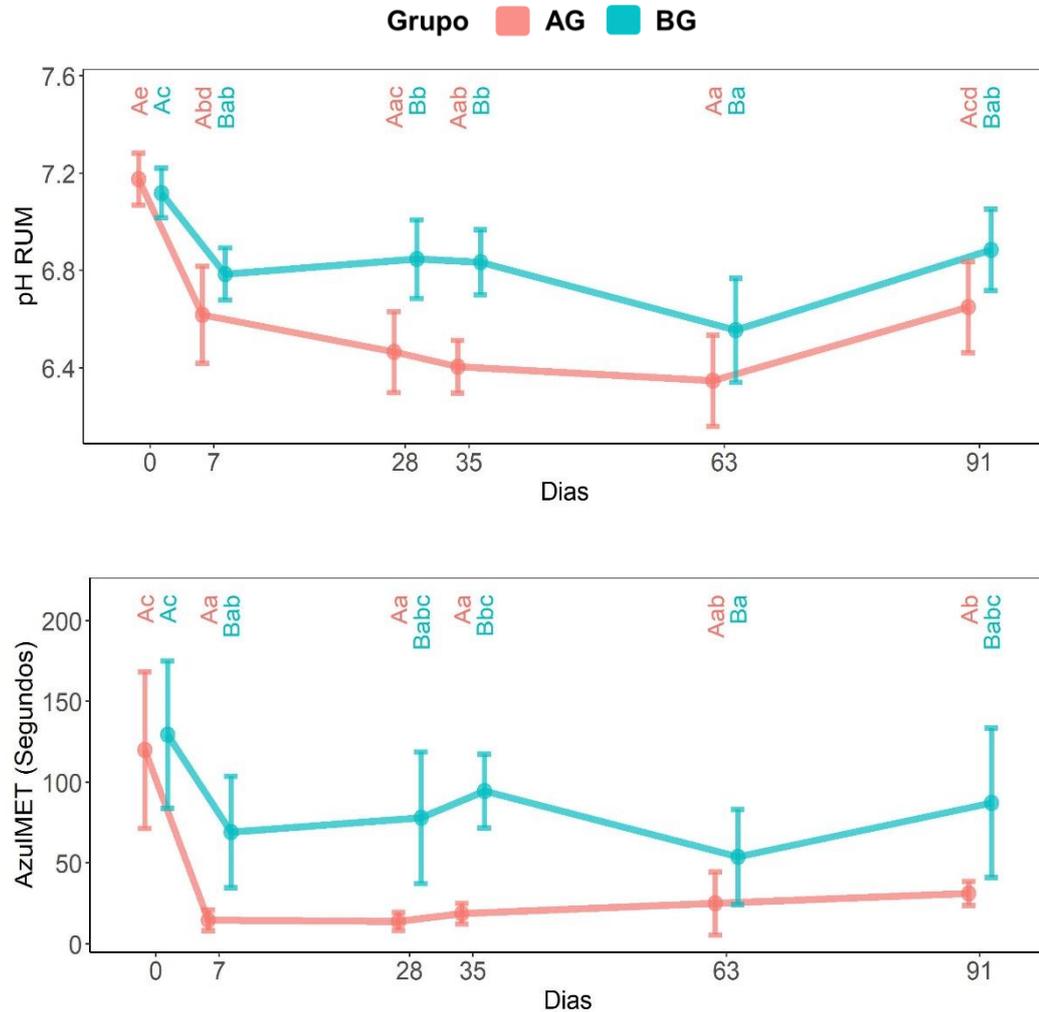
#### **5.1. Avaliação de parâmetros ruminais**

Como descrito por Martins (2020), a partir do sétimo dia do experimento houve diminuição dos valores de pH ruminal de ambos os grupos ( $p < 0,05$ ) em relação ao primeiro dia. Ao longo do experimento, o pH médio do fluido ruminal no grupo AG foi menor do que no grupo BG em todos os momentos a partir do D7 ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 1).

A partir do sétimo dia de experimento, o aspecto do fluido ruminal distinguiu entre os grupos. O líquido ruminal do grupo AG apresentou coloração amarelada e aspecto leitoso, e o fluido ruminal do BG permaneceu com coloração castanho esverdeado, permanecendo assim até a última coleta. A queda mais brusca do pH ocorreu na primeira semana, quando os animais do grupo AG começaram a consumir 60% da matéria seca da dieta em concentrado (Martins, 2020).

A prova de redução de metileno (Gráfico 1) revelou que houve boa atividade microbiana em ambos os grupos, com tempos de redução inferiores a três minutos, conforme descrito por Dirksen (2008). Porém, a redução do azul de metileno ocorreu de forma mais rápida no grupo AG ( $p < 0,001$ ).

Gráfico 1 - Perfil do pH e teste de redução do azul de metileno de fluido ruminal de novilhos raça Holandês confinados submetidos a duas dietas maior: (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido), durante 91 dias

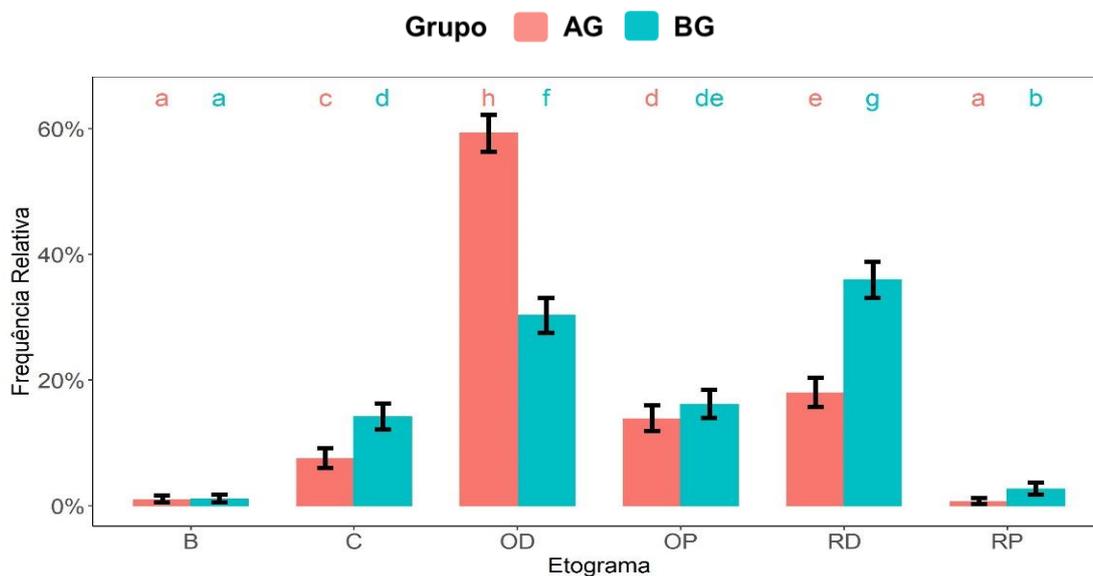


Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre grupos e letras minúsculas distintas indicam diferença entre tempos em um mesmo grupo

## 5.2. Avaliação do comportamento

Como descrito por Martins (2020), as avaliações de comportamento mostraram que o tempo dedicado ao consumo alimentar foi menor no AG do que no BG, com média de 1,8 e 3,38 h/dia, respectivamente ( $p < 0,05$ ). O tempo diário total médio gasto ruminando dos animais do BG foi maior (9,24 horas) do que do AG (4,44 horas) ( $p < 0,05$ ). O AG passou em média 17,54h/dia e o BG 11,11 horas do dia em ócio ( $p < 0,05$ ), sendo que, deste tempo em ócio, 3,31h e 3,86h foram em pé ( $p > 0,05$ ), respectivamente. Não houve diferença no tempo gasto bebendo água entre os grupos ( $p > 0,05$ ), tendo em média gasto 0,22 (AG) e 0,24 h/dia (BG) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Etograma em frequência relativa (%) do tempo de novilhos da raça Holandês alimentados com duas dietas distintas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido) ao longo de 24 horas



Valores seguidos por letras minúsculas distintas diferem entre si ( $P < 0,05$ ). B – bebendo água; C – comendo; OD – Ócio deitado; OP – Ócio em pé; RD – Ruminando deitado; RP – Ruminando em pé.

### 5.3. Avaliação da glicose, insulina e IGF-1

Como descrito por Martins (2020), não houve diferença nos níveis glicêmicos entre os grupos no primeiro dia do experimento (D0), com valores dentro da normalidade segundo Kaneko et al. (2008) (45 -75 mg/dL).

A partir do D7 até o D91 o grupo AG apresentou maiores concentrações plasmáticas de glicose do que os animais do BG ( $p < 0,05$ ). Os animais que mais consumiram amido (AG) apresentaram valores superiores aos valores de referência (Kaneko et al., 2008), enquanto que os do grupo com menor teor de amido na dieta (BG) mantiveram seus níveis glicêmicos dentro da faixa de referência (Tabela 2).

Os níveis de insulina não diferiram estatisticamente entre os grupos em nenhum momento (Tabela 2). Na primeira semana, os níveis de IGF-1 foram maiores no grupo que ingeriu mais energia em relação ao grupo que ingeriu menos, embora os animais do AG tenham recebido uma dieta que continha aproximadamente metade do valor total do concentrado dado ao final do período de adaptação (Martins, 2020). Durante o experimento, os níveis de IGF-1 foram menores no grupo BG, porém esses animais também tiveram aumento nos níveis de IGF-1 do dia 7 ao 91 (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios da concentração plasmática de glicose (mg/dL), insulina ( $\mu$ IU/mL), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (ng/mL), de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido) ao longo de 91 dias

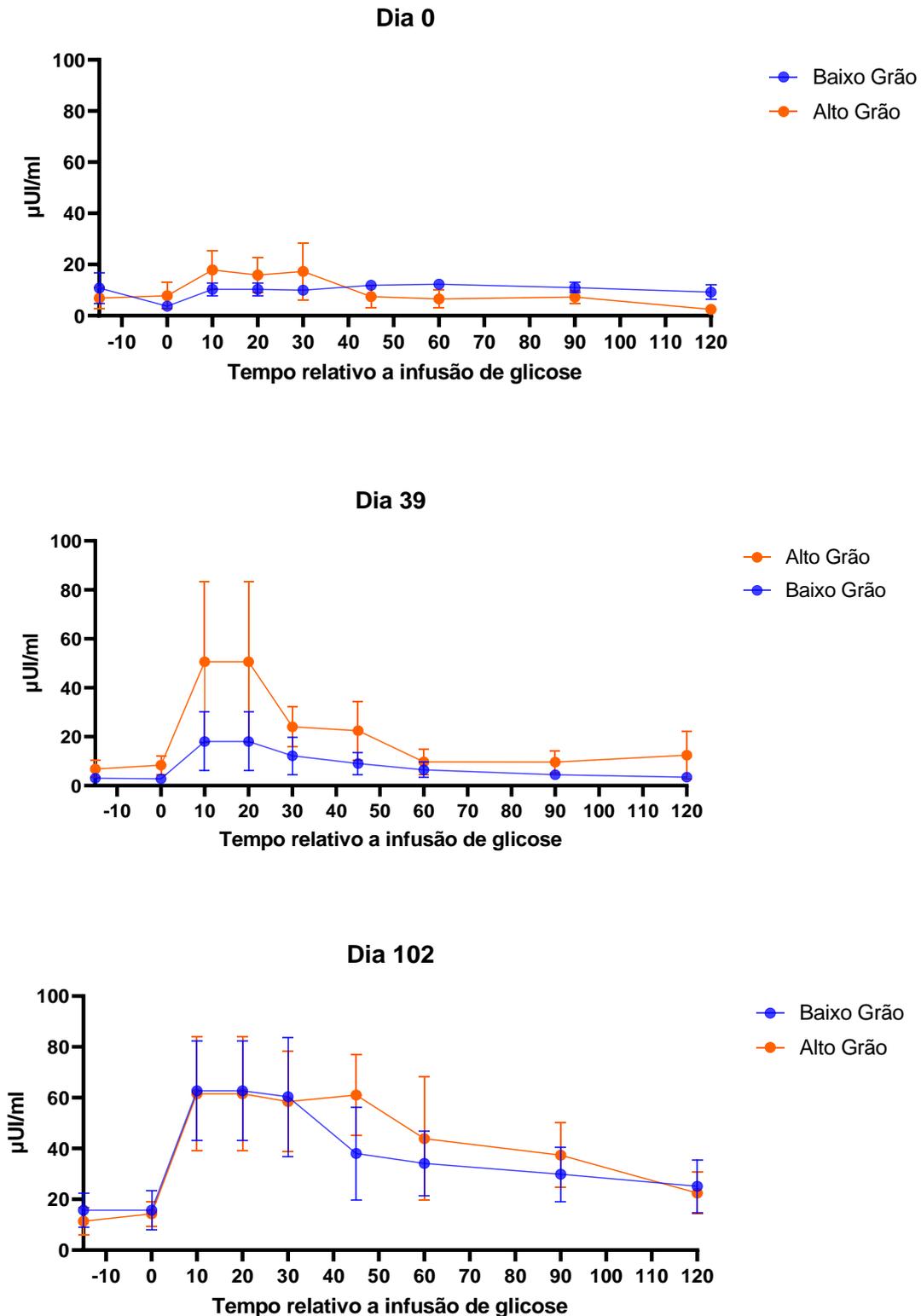
Dias	AG						BG					
	Glicose	SE	Insulina	SE	IGF-1	SE	Glicose	SE	Insulina	SE	IGF-1	SE
<b>0</b>	71,5 Aa	2					69,9 Adef	1,4				
<b>7</b>	77,9 Bbc	1,6	19,68 Aa	8,4	248,5 Ba	18	66,6 Abd	1	11,5 Aa	1	171,84Aa	14,9
<b>28</b>	83,8 Bd	1,8					65 Abc	1,2				
<b>35</b>	84,4 Bcd	1,9	14,08 Aa	4,8	398,58 Bb	37,4	67 Abcde	1,8	9,9 Aa	$\frac{1}{3}$	222,25Aab	23,9
<b>63</b>	82,3 Bcd	1,1					70,3 Acef	1,6				
<b>91</b>	86,9 Bd	2,7	21,54 Aa	7,8	350,56 Bb	20,5	73,7 Af	2,4	12,6 Aa	3	235,55Ab	17,7

Valores seguidos por letras maiúsculas na mesma linha diferem entre grupos e letras minúsculas na mesma coluna diferem entre tempos ( $P < 0,05$ ). SE – erro padrão

#### 5.4. Teste de tolerância glicose (TTG)

A concentração plasmática média de insulina durante o TTG não diferiu entre os grupos ( $p > 0,5$ ) no D0, sendo que ambos os grupos mantiveram concentrações baixas de insulina. No D39 a concentração plasmática média de insulina do grupo AG tendeu a ser mais alta após a infusão de glicose nos minutos 10 e 20. No D102 a concentração plasmática média de insulina não diferiu entre os grupos durante o TTG, porém as médias das concentrações plasmáticas de insulina eram superiores nos dois grupos em comparação as médias do D0 (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Concentração plasmática média de insulina ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ ) em diferentes momentos em relação a uma infusão intravenosa (=tempo 0) de 150 mg/kg de glicose durante o teste de tolerância à glicose intravenosa (TTG) realizados nos dias 0, 39 e 102, em novilhos da raça Holandês alimentados com duas dietas distintas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido). As barras de erro representam SEM.



A área sob a curva (AUC) da glicose não diferiu entre os grupos AG e BG em todos os TTG (Gráfico 4). As dietas de confinamento aumentaram a AUC ao longo do experimento, sendo que a AUC no dia 102 foi a maior ( $p=0,0085$ ). Quando analisados separadamente, o grupo AG tendeu a ter maior AUC de insulina durante TTG foi no D 102 ( $p=0,0637$ ) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Gráfico 4 – Área sob a curva (AUC) de glicose (mg/dl) por 120 min nos dias 0, 39 e 102 de novilhos da raça Holandês alimentados com duas dietas distintas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG;16,81% amido).

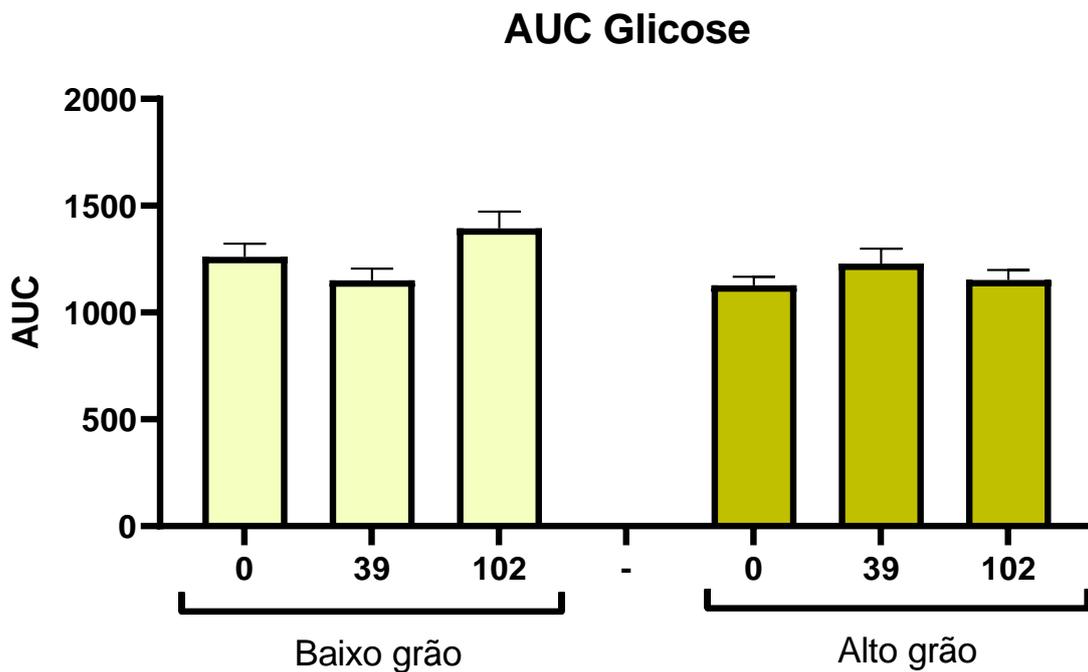
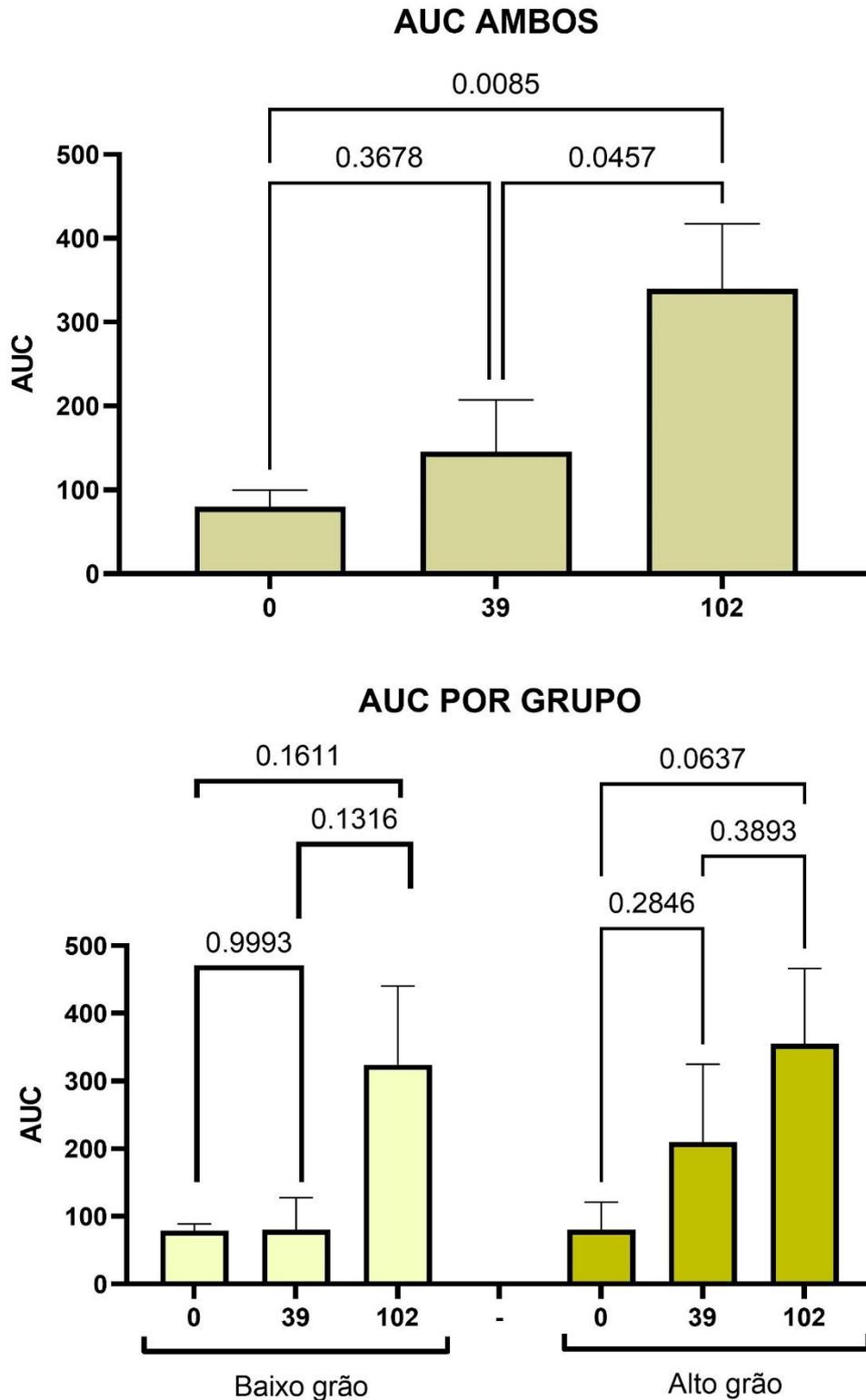


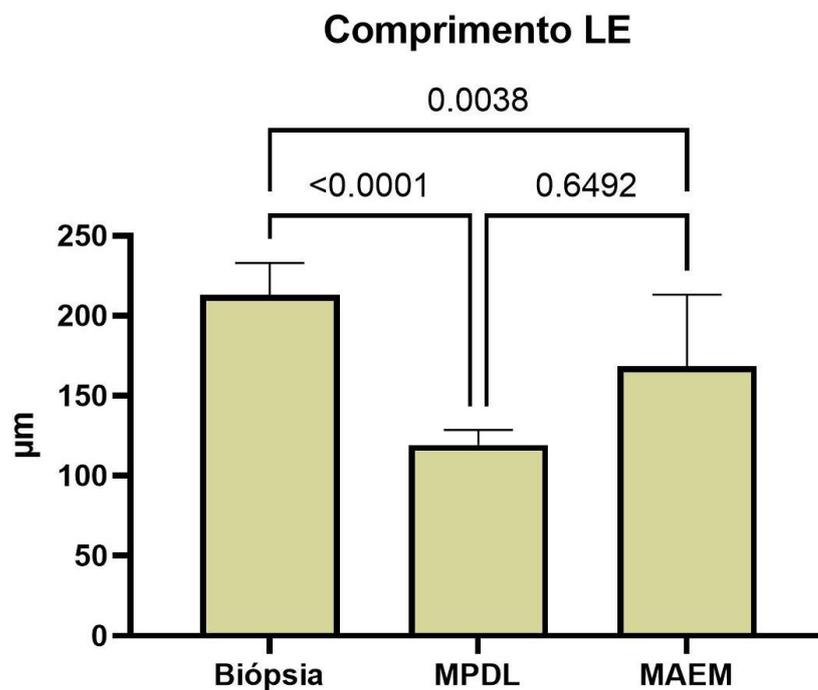
Gráfico 5 - Área sob a curva (AUC) de insulina por 120 min nos dias 0, 39 e 102 de novilhos da raça Holandês alimentados com duas dietas distintas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG;16,81% amido).



### 5.5. Análise da histologia

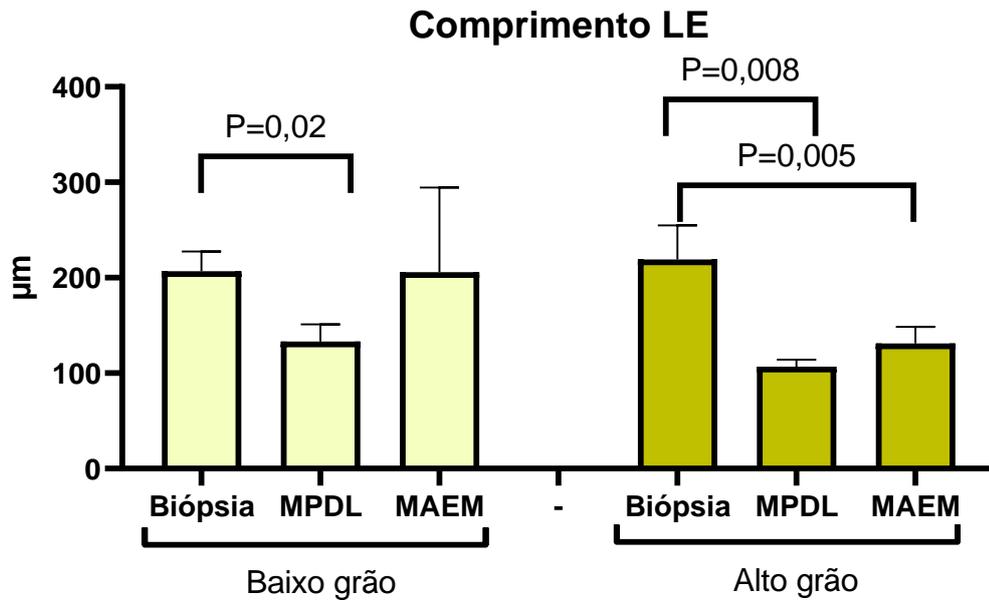
Os animais foram analisados de duas maneiras diferentes: primeiro, os animais foram analisados como um único grupo para determinar se dietas de confinamento causam lesões no tecido laminar do casco e, segundo, os animais foram analisados nos grupos com base na diferente concentração de amido. As dietas de confinamentos, reduziram o comprimento da LE na muralha da unha lateral do membro posterior ( $p < 0,001$ ) e da LE na muralha da unha medial do membro anterior ( $p < 0,0038$ ) (Gráfico 1Gráfico 6).

Gráfico 6 - Comprimento da lâmina epidermal (LE) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biópsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a dieta de confinamento



Nos dois grupos houve redução no comprimento da LE da muralha da unha lateral do membro posterior, quando comparadas as médias nos diferentes momentos (D -40 e D103), tendo uma redução de 51% no grupo AG ( $p = 0,008$ ) e 36% no grupo BG ( $p = 0,02$ ), não tendo diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O comprimento da LE da muralha da unha medial do membro anterior reduziu apenas no grupo AG ( $p = 0,005$ ) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Gráfico 7 - Comprimento da lâmina epidermal (LE) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biópsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido)



As dietas de confinamentos reduziram a largura da LE na muralha da unha lateral do membro posterior e na muralha da unha medial do membro anterior ( $p < 0,0001$ ) (Gráfico 8). Ambos os grupos reduziram a largura das LE nas duas unhas, sendo que o grupo AG reduziu a largura da LE em 36,85% ( $p = 0,0007$ ) e o BG em 43,08% ( $p = 0,0001$ ) na unha lateral do membro posterior. E na unha medial do membro anterior, o grupo AG reduziu a largura da LE em 38% ( $p = 0,001$ ) e o BG em 42% ( $p = 0,0001$ ) (Gráfico 9).

Gráfico 8 - Largura da lâmina epidermal (LE) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biópsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e na muralha da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a dieta de confinamento

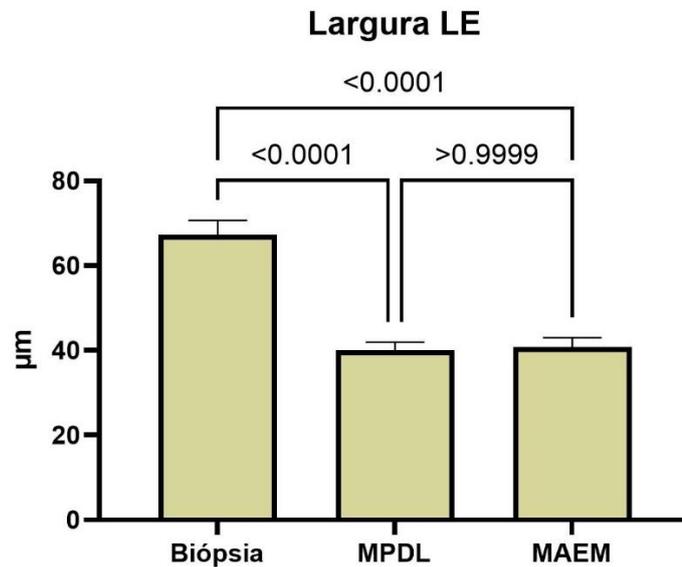
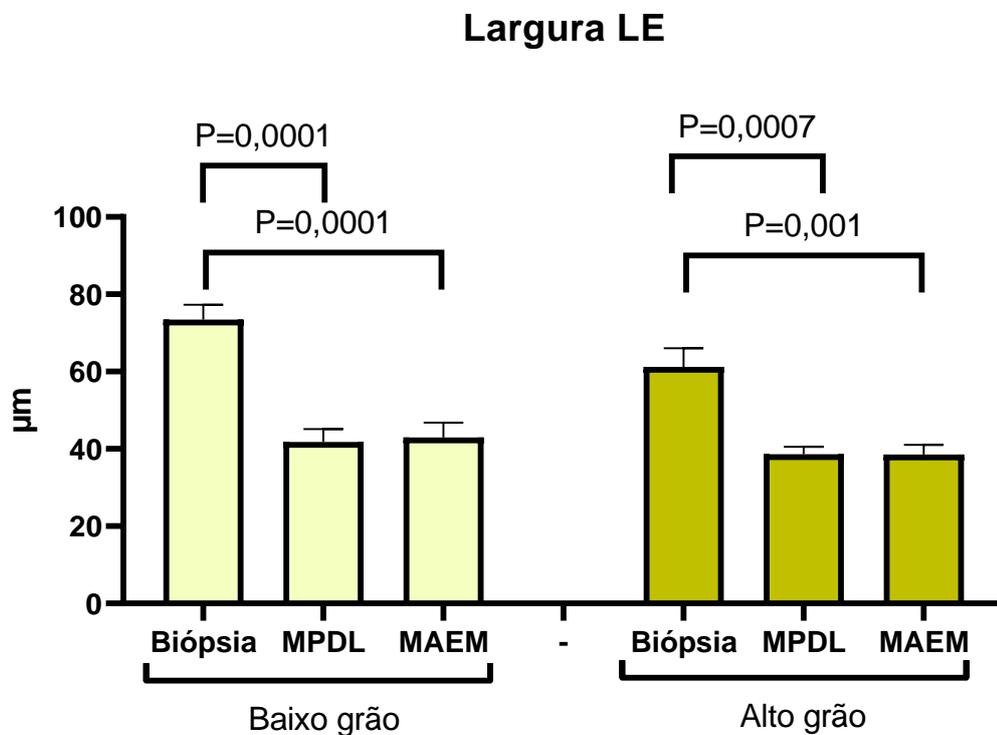


Gráfico 9 - Largura da lâmina epidermal (LE) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biópsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e na muralha da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido)



Diversas amostras dos cascos dos animais apresentavam perda do eixo queratinizado das LE e uma a presença de células nucleadas (paraqueratose) entre as lâminas epidermais

(extrato interno) e o início da camada córnea (extrato médio) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

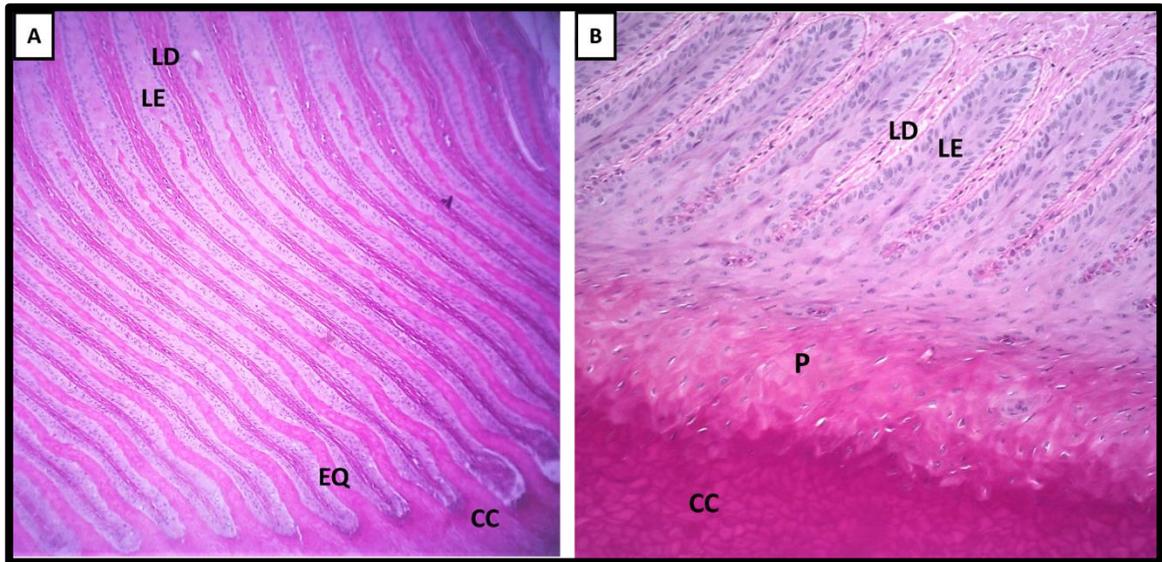


Figura 4 - Fotomicrografia das lâminas epidérmicas e dérmicas do casco de bovinos utilizando o corante ácido periódico-Schiff (PAS). LE: lâmina epidermal; LD: lâmina dermal; CC: camada córnea; EQ: eixo queratinizado; P: paraqueratose. Aumentos de 4 e 10X respectivamente

As dietas de confinamentos aumentaram o comprimento da camada de paraqueratose na muralha da unha lateral do membro posterior ( $p=0,0417$ ) e na muralha da unha medial do membro anterior não teve diferença ( $p=0,0097$ ) (Gráfico 10). Entretanto, quando analisamos os grupos, o BG não teve aumento significativo no comprimento da paraqueratose tanto na unha lateral ( $p=0,17$ ) quanto na medial ( $p=0,15$ ). Diferentemente, o grupo AG teve aumento do comprimento da paraqueratose de 40% na unha lateral ( $p=0,025$ ) e de 51% medial ( $p=0,014$ ) (Gráfico 11).

Gráfico 10 - Comprimento da paraqueratose ( $\mu\text{m}$ ) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biópsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e na muralha da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a dieta de confinamento

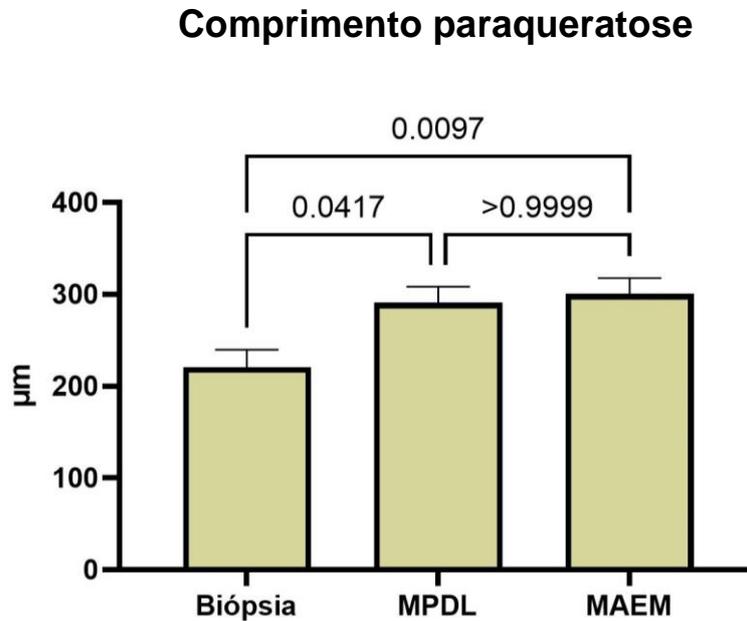
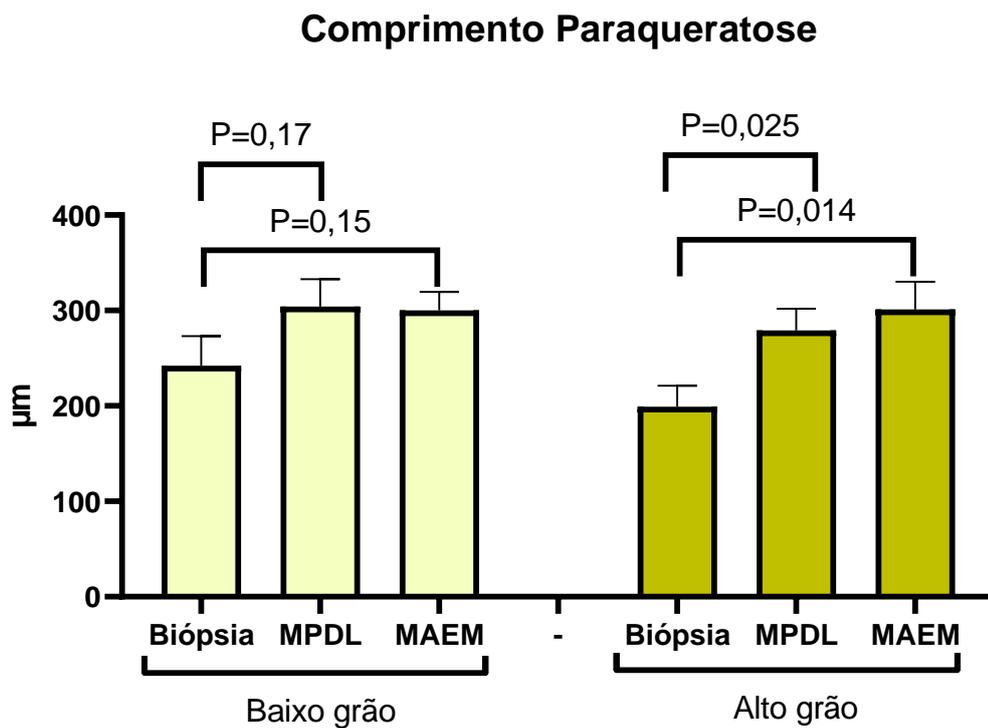


Gráfico 11 - Comprimento da lâmina epidermal ( $\mu\text{m}$ ) na muralha da unha lateral do membro pélvico esquerdo (Biópsia), da unha lateral do membro posterior (MPDL) e na muralha da unha medial do membro anterior (MAEM) de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido)



Não houve diferença no formato da LE entre grupos ou tempos ( $p>0,05$ ) na muralha da unha lateral do membro posterior. Entretanto, mais da metade das LE teve seu formato alterado em ambos os grupos, sendo o formato franjeado o mais prevalente. Além disso, mais de 50% das LE da amostra coletada antes do início do experimento já apresentavam seu formato alterado (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias do formato da lâmina epidermal (padrão, franjeada, bifurcada ou afiada) na muralha da unha lateral do membro posterior de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido), D-40 e D103.

Unha lateral do membro posterior							
Formato da LE <sup>a</sup>	D -40			D 103			P momento x momento
	AG	BG	P	AG	BG	P	
	Média	Média		Média	Média		
Padrão	43% (31%)	46% (21%)	0,613	42% (15%)	49% (26%)	0,613	0,919
Franjeada	28% (28%)	38% (18%)	0,704	28% (15%)	22% (16%)	0,704	0,273
Bifurcada	24% (25%)	15% (16%)	0,788	17% (12%)	21% (16%)	0,788	0,956
Afiada	6% (0%)	0% (0%)	0,214	13% (12%)	9% (4%)	0,347	0,150 x 0,130

a - largura da lâmina epidermal

Também não houve diferença no formato LE entre grupos ( $p>0,05$ ) na muralha da unha medial do membro anterior, sendo que, quase metade dos animais apresentavam alteração no formato da LE, sendo o franjeado o mais prevalente (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias do formato da LE (padrão, franjeada, bifurcada ou afiada) na muralha da unha medial do membro anterior de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (CN; 16,81% amido).

Unha medial do membro anterior - Pós morte			
Formato da LE <sup>a</sup>	AG	CN	P
	Média	Média	
Padrão	54% (20%)	53% (30%)	0,9388
Franjeada	22% (13%)	27% (33%)	0,7243
Bifurcada	18% (13%)	18% (16%)	0,8935
Afiada	6% (4%)	1% (0%)	0,1611

a - largura da lâmina epidermal

Na unha lateral do membro posterior não houve diferença nos escores quanto à infiltração inflamatória, hemorragia e shunt na derme entre os grupos e entre os momentos ( $p>0,05$ ). Também não houve diferença quanto a integridade da membrana basal entre os grupos e entre os momentos ( $p>0,05$ ), porém mesmo no início do experimento 100% e 62,5% dos animais do grupo AG e BG apresentaram escore maior que 1, respectivamente. Houve diferença na morfologia das células epidérmicas entre os grupos ( $p = 0.01088$ ) D -40, sendo que 100% dos

animais do BG apresentaram escore menor que 2 e 62,5% do AG apresentaram escore maior que 1 (Tabela 5). Na unha medial do membro anterior não houve diferença nos escores quanto à infiltrado inflamatório, hemorragia, shunt, integridade da membrana basal e morfologia das células epidérmicas entre os grupos ( $p>0,05$ ) (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequências dos escores de morfologia das células epidérmicas, integridade da membrana basal, células inflamatórias, hemorragia e shunt arteriovenoso na muralha da unha lateral do membro posterior e na muralha da unha medial do membro anterior de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido), D-40 e D103.

		Escore	Morf_Epid <sup>a</sup>	Memb_Basal <sup>b</sup>	Cel_Inf <sup>c</sup>	Hemorragia	Shunt <sup>d</sup>
Unha lateral D-40	AG	0	0,0%	0,0%	-	-	-
		1	25,0%	0,0%	37,5%	0,0%	87,5%
		2	37,5%	37,5%	62,5%	0,0%	12,5%
		3	25,0%	37,5%	0,0%	12,5%	0,0%
		4	-	25,0%	0,0%	87,5%	-
	BG	0	12,5%	0,0%	-	-	-
		1	87,5%	37,5%	62,5%	25,0%	100,0%
		2	0,0%	25,0%	37,5%	0,0%	0,0%
		3	0,0%	25,0%	0,0%	25,0%	0,0%
		4	-	12,5%	0,0%	50,0%	-
	P	0,0108	0,173	0,364	0,108	0,381	
Unha lateral D103	AG	0	12,5%	0,0%	-	-	-
		1	25,0%	25,0%	50,0%	25,0%	75,0%
		2	62,5%	50,0%	37,5%	0,0%	25,0%
		3	0,0%	25,0%	12,5%	50,0%	0,0%
		4	-	0,0%	0,0%	25,0%	-
	BG	0	0,0%	0,0%	-	-	-
		1	57,1%	0,0%	62,5%	25,0%	62,5%
		2	14,3%	42,9%	37,5%	12,5%	37,5%
		3	28,6%	28,6%	0,0%	37,5%	0,0%
		4	-	14,3%	0,0%	25,0%	-
	P	0,901	0,0848	0,669	0,867	0,647	
<b>Unha lateral D-40 x D103</b>		<b>P</b>	<b>0,58 x 0,25</b>	<b>0,04 x 0,41</b>	<b>0,76 x 1</b>	<b>0,06 x 0,67</b>	<b>0,77 x 0,14</b>
Unha medial D103	AG	0	0,0%	0,0%	-	-	-
		1	25,0%	25,0%	50,0%	62,5%	62,5%
		2	75,0%	25,0%	50,0%	0,0%	25,0%
		3	0,0%	50,0%	0,0%	25,0%	12,5%
		4	-	0,0%	0,0%	12,5%	-
	BG	0	12,5%	14,3%	-	-	-
		1	25,0%	14,3%	50,0%	37,5%	62,5%
		2	37,5%	14,3%	50,0%	0,0%	37,5%
		3	12,5%	28,6%	0,0%	37,5%	0,0%
		4	-	28,6%	0,0%	25,0%	-
	p	0,9534	0,6731	0,6694	0,3596	0,902	

a – morfologia das células epidérmicas, b – integridade da membrana basal, c – células inflamatórias, d – shunt arteriovenoso

Na sola da unha lateral do membro anterior direito não houve diferença nos escores quanto à infiltrado inflamatório, hemorragia, shunt, integridade da membrana basal e morfologia das células epidérmicas entre os grupos ( $p>0,05$ ). Na sola da unha medial do membro posterior esquerdo, o grupo AG teve 75 % dos animais com escore de hemorragia superior a 2, enquanto o grupo BG teve 62,5 % com escore de 1 ( $p = 0,006$ ). Não houve diferença nos escores quanto à infiltrado inflamatório, shunt, integridade da membrana basal e morfologia das células epidérmicas entre os grupos ( $p>0,05$ ) (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequências dos escores de morfologia das células epidérmicas, integridade da membrana basal, células inflamatórias, hemorragia e shunt arteriovenoso na sola da unha lateral do membro anterior direito e sola da unha medial do membro posterior esquerdo de novilhos da raça Holandês, submetidos a duas dietas: maior (AG; 36,96% amido) e menor densidade energética (BG; 16,81% amido) D 103.

		Escore	Morf_Epid <sup>a</sup>	Memb_Basal <sup>b</sup>	Cel_Inf <sup>c</sup>	Hemorragia	Shunt <sup>d</sup>
Sola da unha lateral do membro torácico direito	AG	0	0,0%	0,0%	-	-	-
		1	62,5%	0,0%	87,5%	75,0%	12,5%
		2	25,0%	0,0%	12,5%	0,0%	87,5%
		3	12,5%	62,5%	0,0%	12,5%	0,0%
		4	-	37,5%	0,0%	12,5%	-
	BG	0	0,0%	0,0%	-	-	-
		1	75,0%	0,0%	50,0%	0,0%	50,0%
		2	25,0%	12,5%	50,0%	0,0%	25,0%
		3	0,0%	25,0%	0,0%	37,5%	25,0%
		4	-	62,5%	0,0%	62,5%	-
	<b>P</b>		0,367	0,587	0,160	0,325	0,647
Sola da unha medial do membro pélvico esquerdo	AG	0	0,0%	-	-	-	-
		1	75,0%	0,0%	37,5%	37,5%	0,0%
		2	25,0%	0,0%	62,5%	0,0%	62,5%
		3	0,0%	75,0%	0,0%	12,5%	37,5%
		4	-	25,0%	0,0%	50,0%	-
	BG	0	12,5%	-	-	-	-
		1	75,0%	0,0%	75,0%	62,5%	75,0%
		2	12,5%	0,0%	25,0%	0,0%	25,0%
		3	0,0%	87,5%	0,0%	12,5%	0,0%
		4	-	12,5%	0,0%	25,0%	-
	<b>P</b>		0,561	0,555	0,133	0,0061	0,595

a – morfologia das células epidérmicas, b – integridade da membrana basal, c – células inflamatórias, d – shunt arteriovenoso

Na histologia ruminal, 50% dos animais do grupo AG possuíam alterações compatíveis com acidose ruminal. A histopatologia mostrou que estes animais apresentavam no epitélio da mucosa ruminal focos discretos de vacuolização (degeneração hidrópica multifocal discreta),

por vezes associados ao infiltrado de neutrófilos íntegros e degenerados intraepiteliais (microabscessos intraepiteliais). Na lâmina própria subjacente há discreto infiltrado de neutrófilos, linfócitos e histiócitos. Na histologia ruminal dos animais do grupo BG não foram encontradas alterações histológicas significativas. A histologia do pulmão e fígado não possuíam alterações histológicas significativas.

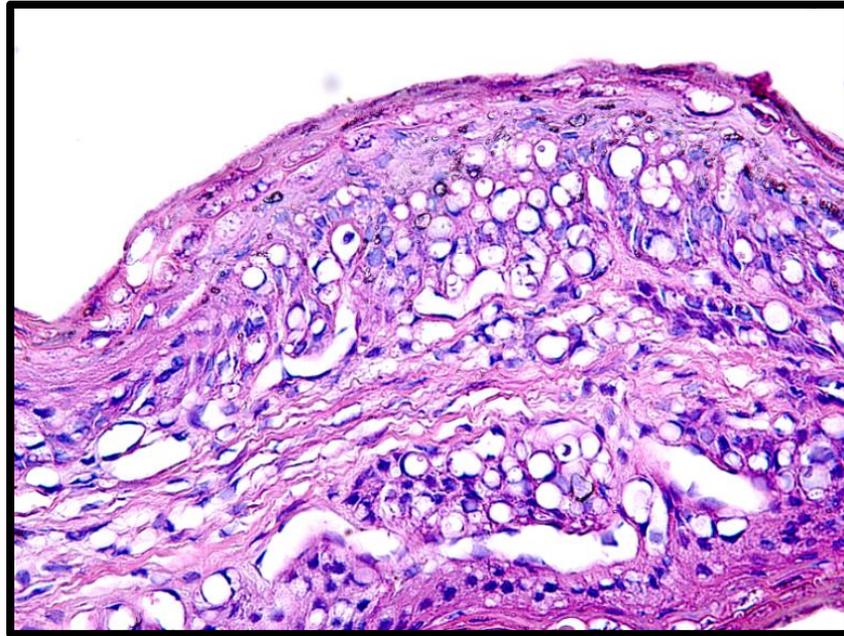


Figura 5 - Epitélio da mucosa ruminal com focos discretos de vacuolização (degeneração hidrópica multifocal discreta).

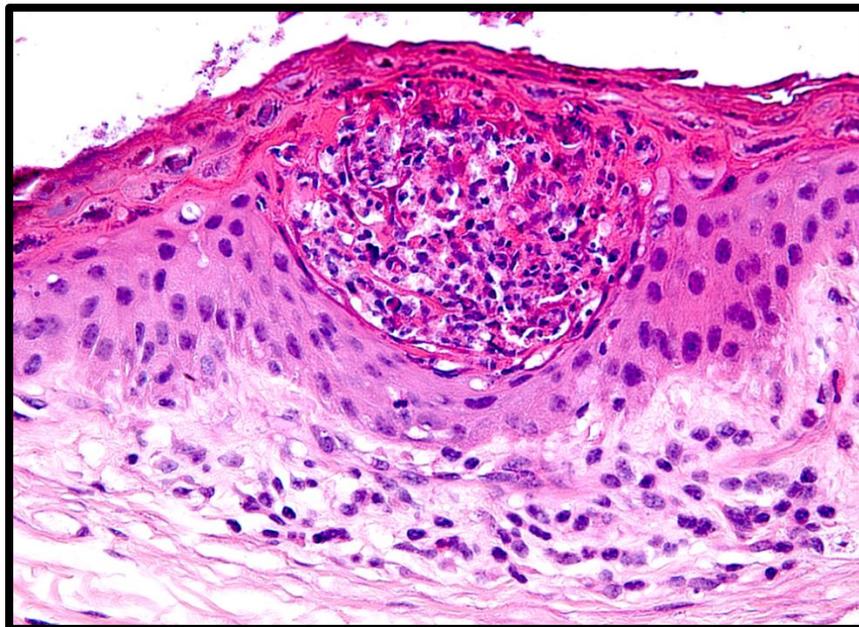
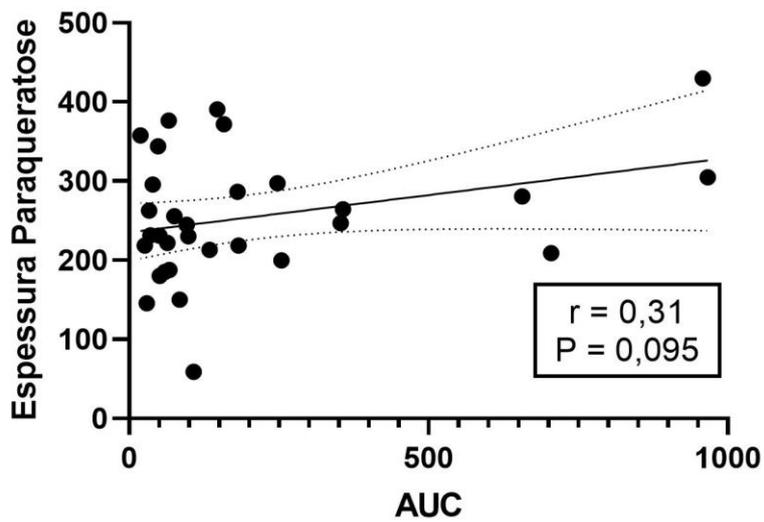
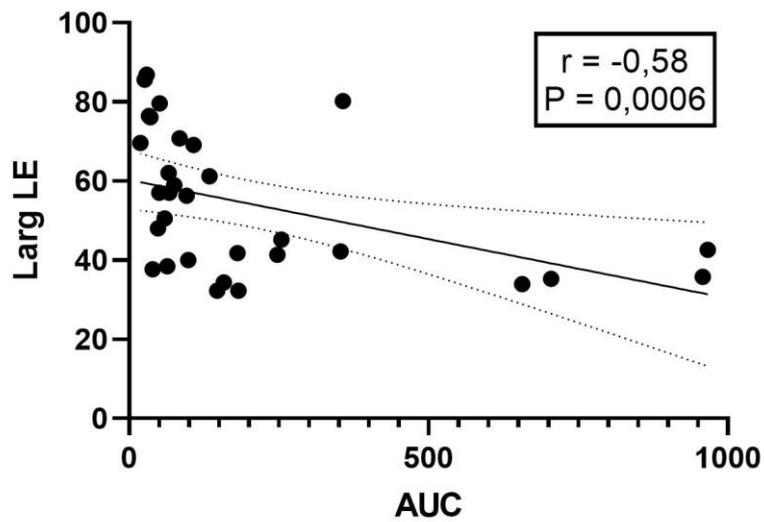
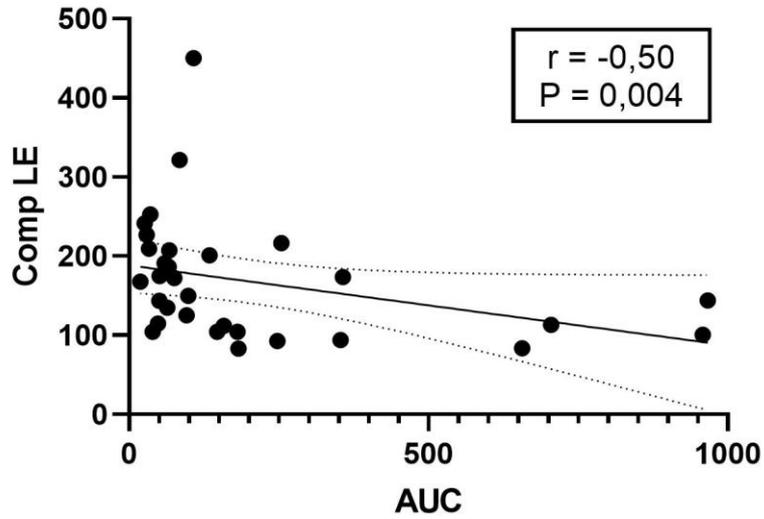


Figura 6 - Epitélio da mucosa ruminal com focos discretos de vacuolização, associado a infiltrado de neutrófilos íntegros e degenerados intraepiteliais (degeneração hidrópica multifocal discreta com microabscesso intraepitelial). Na lâmina própria subjacente há discreto infiltrado de neutrófilos, linfócitos e histiócitos.

### **5.6. Correlação entre a AUC de insulina e a histologia das LE**

Existe uma correlação negativa e significativa entre o comprimento e a AUC da insulina ( $p=0,04$ ), e também existe uma correlação negativa e significativa entre a largura da LE e a AUC da insulina ( $p=0,0006$ ). Não há correlação entre a espessura da camada de paraqueratose e a AUC da insulina ( $p=0,095$ ) (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Correlações entre o comprimento da lâmina epidermal, largura da lâmina epidermal e espessura da paraqueratose com a área sob a curva (AUC) de insulina.



## 6. DISCUSSÃO

O objetivo do trabalho foi avaliar as alterações metabólicas e histológicas no casco e outros órgãos de novilhos de engorda submetidos a dietas com concentrações altas e baixas de amido.

Durante o experimento, o grupo AG que recebeu dieta com mais amido apresentou valores de pH mais baixos em seu fluido ruminal, sendo que a menor média de pH do grupo AG foi de 5,9. Segundo Plaizier et al., (2008) o risco de SARA aumenta quando o pH ruminal cai abaixo de 5,6 por mais de 3 h/d ou permanece abaixo de 5,8 por mais de 5 a 6 h/d (Zebeli et al., 2008). Devido à frequência e repetição das coletas, o fluido ruminal foi coletado por meio de sondagem esofágica, e este método pode influenciar o pH do rúmen devido à contaminação com saliva e heterogeneidade entre os locais de amostragem dentro do rúmen. Duffield et al. (2004) verificaram que o pH da amostra do fluido ruminal coletado por meio de sonda estomacal (sonda oro-ruminal) era em média 0,35 unidade superior ao pH da amostra coletada pela rumenocentese. Esses autores propuseram que quando se utiliza sonda oral para coleta de amostras de líquido ruminal, os limiares para pH anormalmente indicativo de SARA deveria ser 5,9. Plaizier (2004) usou um limiar de pH indicativo de SARA de 6,0 quando amostras de fluido ruminal foram coletadas com sonda estomacal em aproximadamente 4 h após a alimentação. Portanto, os animais do grupo AG tiveram níveis pH indicativos de SARA.

Os valores de pH mais baixos foram após seis horas do fornecimento da dieta e, após dez horas do fornecimento da dieta, os valores de pH não retornaram aos valores da primeira coleta. A demora no retorno do pH demonstra alguma dificuldade no controle do pH ruminal. Alterações na capacidade de produzir agentes tamponantes, bem como uma diminuição na entrada de bicarbonato no rúmen, seja por saliva ou na parede ruminal, podem afetar o retorno do pH após oito horas de alimentação. De acordo com Yang e Beauchemin (2006), fornecer mais grãos e menos fibras aos animais reduz o tamanho das partículas da dieta, e reduz o tempo gasto na ruminação, o que foi demonstrado no experimento com os animais AG ruminando diariamente 4,44h enquanto os BG passaram 11,11h ruminando diariamente. O tempo de ruminação é um indicativo utilizado como um meio de monitoramento de sanidade, estado nutricional e conforto, usado por exemplo com maior frequência em rebanhos leiteiros para prognosticar afecções metabólicas (Soriani et al., 2013; Kaufman et al., 2016). Além disso, a motilidade ruminal aumenta a absorção dos ácidos graxos de cadeia curta, favorecendo o equilíbrio ácido-básico do conteúdo ruminal (Allen, 1997).

A dieta do grupo AG alterou as características do fluido ruminal, conferindo-lhe uma coloração amarelada e aspecto leitoso. Diferentemente das características do fluido ruminal do grupo que recebeu a dieta de menor densidade energética (16.81% amido), que manteve uma coloração castanho esverdeado ao longo do estudo e níveis de pH mais elevados.

Ambos os grupos tiveram boa atividade microbiana, revelada na prova de redução de metileno, com tempos de redução inferiores a três minutos, conforme descrito por Dirksen (2008). Porém, a redução do azul de metileno ocorreu mais rapidamente no grupo AG, indicando maior metabolismo dos microorganismos ruminais. Geralmente no início do quadro de acidose ruminal pode ser observado um tempo de redução diminuído, menor que um minuto indicando microbiota muito ativa (Afonso e Mendonça, 2007).

A queda do pH foi mais abrupta na primeira semana, quando os animais do grupo AG passaram a consumir 60% da matéria seca da dieta em concentrado, corroborando que aumentos repentinos na quantidade de carboidratos ingeridos são mais desafiadores e predispõem mais a acidose ruminal que a quantidade total de carboidratos na dieta (Jubb, 2015). De acordo com Cabral et al., (2016), a ocorrência de acidose ruminal em bovinos de corte em confinamento é mais comum no período de adaptação (primeiros 14-28 dias) às dietas com elevada proporção de concentrado.

Os carboidratos não fibrosos (CNFs) são digeridos de forma rápida e quase completa, resultando em uma maior quantidade de AGVs e promovem, proporcionalmente, menor estímulo à mastigação (Cabral et al., 2016). Além do menor aporte de saliva para tamponar o rúmen, a falta de adaptação do rúmen em absorver essa grande quantidade de AGVs faz com que o pH ruminal caia. De acordo com Cabral et al. (2016) a utilização de dietas ricas em concentrado (>65%, com base na matéria seca), com a redução do pH do rúmen (<6,0) e aumento da disponibilidade de amido e glicose, pode causar depressão da digestão de fibra e desordens nutricionais.

De acordo com Jubb (2015) o exame microscópico da mucosa ruminal é a forma mais confiável de confirmar o diagnóstico de rumenite química. A alimentação fornecida ao grupo AG (36,96% amido) foi capaz de causar alterações histológicas ruminais, em 50% dos animais, associadas a lesões de acidose ruminal como formações de microabscessos (Fergusson et al., 2022) e vacuolização citoplasmática das células epiteliais e reação neutrofílica leve (Jubb, 2015), comprovando que esses animais tiveram quadros de acidose ruminal.

Bovinos alimentados com dieta de maior densidade energética (36.96% amido) gastam menos tempo se alimentando, devido aos animais ingerirem menos matéria natural. Estes animais também ruminam menos (4,44 horas) dos que ingerem dietas menos densas (9,24 horas) devido ao menor estímulo para a ruminação como a FDN. Por gastar menos tempo nessas atividades, os animais que consomem dietas mais densas, passam mais horas do dia em ócio (17,54h/dia)

A maior glicemia encontrada no grupo AG pode ser explicada pela maior produção de AGV's e talvez até uma maior proporção de propionato, uma vez que este é o principal substrato para a gliconeogênese nos ruminantes (Cabral et al., 2016). Além disso, os valores médios de IGF-1 e de insulina, apesar deste último não haver diferença estatística, do grupo AG foi superior ao do BG refletindo um estado anabólico destes animais. Semelhante aos nossos resultados, Vivenza (2012) encontrou níveis de insulina crescentes em novilhos em dieta de manutenção (8.276  $\mu$ IU/mL), em dieta para ganho de peso de 0,500 kg/dia (13.611  $\mu$ IU/mL) e em dieta para ganho de peso de 0,900 kg/dia (21.659  $\mu$ IU/mL).

A AUC da glicose não diferiu entre os grupos AG e BG em todos os TTG. As concentrações de glicose durante o TTG dependem do consumo de glicose pelos tecidos periféricos, produção endógena de glicose, excreção renal de glicose e absorção intestinal de glicose (Pires et al., 2007). As dietas de confinamento aumentaram a AUC de insulina durante o experimento, sendo que a AUC no último TTG foi a maior. Segundo Zachut et al. (2013), a maior AUC da insulina para eliminar a mesma dose de glicose indica um grau de resistência à insulina. Isto indica que as dietas de confinamento foram capazes de ocasionar um grau de resistência à insulina nos animais.

A resistência à insulina pode ser atribuída a uma diminuição na resposta à insulina, uma diminuição na sensibilidade à insulina, ou ambos (Koster et al., 2013). Ao final do experimento, no D102, as duas dietas de confinamento fizeram com que os animais tivessem maiores níveis séricos de insulina frente ao desafio do TTG. Isto demonstra que com o maior tempo de ingestão das dietas de confinamento, a de menor densidade energética, foi capaz de causar alterações metabólicas semelhantes a dieta de maior densidade energética.

As mudanças mais significativas na histologia do casco foram as reduções no comprimento e largura do LE, o que é um fato interessante, visto que, até onde sabemos, nenhum estudo comparou o comprimento e a largura do LE antes e depois dos animais serem alimentados com dietas diferentes. Após o trabalho de Mendes (2015) este tipo de comparação se tornou possível. As dietas de confinamento foram capazes de reduzir a largura da LE, tanto

na do membro anterior, quanto na do membro posterior, demonstrando que os cascos foram afetados de forma sistêmica.

Durante a execução do experimento, percebemos a necessidade de mensurar a distância de uma camada normal constituída de células nucleadas entre o tecido lamelar e o início da camada córnea que supostamente não deveria existir (paraqueratose). Normalmente essa distância não é mensurada, pois a LE possui um eixo queratinizado e a camada córnea fica imediatamente após o seu término (Figura 4A). Entretanto, percebemos na histologia dos cascos dos animais, que muitos não possuíam o eixo queratinizado na LE e que existia essa paraqueratose (Figura 4**Erro! Fonte de referência não encontrada.**B).

O comprimento da camada de paraqueratose aumentou no grupo AG após o período experimental. Segundo König e Liebich (2004) o tecido laminar do casco de bovinos é formado de lâminas dérmicas e epidérmicas que se intercalam e encontram-se aderidas ao estojo córneo do casco. O aumento desta paraqueratose faz com que o tecido laminar não esteja aderido ao estojo córneo do casco, provavelmente deixando o tecido menos estável. Sendo assim, a dieta do grupo AG fez com que o tecido laminar dos cascos dos animais fosse menos estável. Além disso, esta paraqueratose indica o desaparecimento do eixo queratinizado nas LE dos animais. Nos casos de laminite aguda, há parcial ou total desaparecimento do eixo queratinizado, o que resulta no encurtamento da LE (Maclean, 1971; Greenough, 2007), que ocorreu nos animais de ambos os grupos.

Sendo assim, a redução do comprimento e da largura das LE do tecido laminar destes animais e o aumento da camada de paraqueratose, indicam que os tecidos laminares dos animais alimentados com dietas de confinamento são menos estáveis. Sendo que a dieta de maior densidade energética fez com que a camada de paraqueratose destes animais fossem maior.

Em trabalhos em que a laminite aguda foi induzida por oligofrutose, na histologia do casco foi descrito o arredondamento das células epidérmicas (Thoefner et al., 2005; Danscher et al., 2010). No presente estudo houve apenas diferença na morfologia das células epidérmicas entre os grupos na histologia do casco no dia D-40, tendo os animais do grupo AG começado o experimento com escores maiores. Ao final do presente estudo os grupos não diferiam, tendo mais de 60% dos animais apresentando o escore maior ou igual a 2. Semelhante a Mendes et al., (2013) que não encontrou diferença na morfologia das células epidérmicas entre animais com ou sem sinais clínicos de laminite. Tavares et al., (2019) encontrou um pequeno número de animais (n=5, 12,5%) que apresentou células epidérmicas dentro dos padrões fisiológicos, com predomínio de células ovais perpendiculares à membrana basal.

A dieta não interferiu na presença de hemorragia e infiltrado inflamatório, apesar deste último estar presente em ambos os grupos em grau leve. Mendes et al., (2013) descreveram resultado semelhante sem diferenças nos escores de hemorragia e infiltrado inflamatório ao avaliarem a histologia de animais sem claudicação e sem lesões secundárias à laminite, sem claudicação e com lesões associadas, e com claudicação e com lesões associadas à laminite.

Apesar de não diferirem, ambos os grupos tiveram escores altos de irregularidades na membrana basal. Mendes et al., (2013) encontrou irregularidades na membrana basal, em vacas com e sem lesões macroscópicas do casco associadas à laminite naturalmente adquirida. Além disso, semelhante ao trabalho de Mendes et al., (2013), durante a avaliação histológica foi observada a presença de irregularidades ao longo do comprimento da membrana basal, diferentemente de Thoenes et al., (2005) e Danscher et al., (2010) que observaram colapso da membrana basal em bovinos com laminite induzida.

Apesar da diferença entre os momentos, não houve muita diferença entre os grupos. Isso pode ter ocorrido porque o tempo em que os animais foram submetidos a diferentes dietas não foi longo o suficiente ou as diferenças entre as dietas não foram grandes o suficiente. Uma limitação deste estudo, é que durante o período experimental os animais, de ambos os grupos, tiveram quadros de babesiose e anaplasmose. Apesar das amostras de sangue e fluido ruminal não terem sido coletadas durante os estágios da doença, essas intercorrências podem ter influenciado a visualização das diferenças de grupos na histologia do casco, pois esses agentes causam alterações hemodinâmicas e que potencialmente podem alterar a histologia dos cascos. De acordo com Bock et al., (2004) a *Babesia* causa vasodilatação, hipotensão, aumento da permeabilidade capilar, edema, colapso vascular, distúrbios de coagulação, dano endotelial e estase circulatória na microcirculação.

Uma segunda limitação do estudo é que os animais, de ambos os grupos, começaram o experimento com alterações histológicas no casco. Mais da metade das LE, da histologia coletada antes do início do experimento, apresentavam alterações morfológicas. Ambos os grupos começaram o experimento com escores altos de irregularidades na membrana basal, sendo que o 100% dos animais do AG possuíam escore maior ou igual a 2. Os animais começaram o experimento com a distância entre as LE e o início da camada córnea alta, ou seja, os animais tinham LE com perda do eixo queratinizado. Estes animais foram criados desde o desaleitamento com dietas a base de silagem de milho e concentrado, alimentos que são ricos em amido, diferentemente de animais criados a pasto com dietas menos densas. Essa pré-exposição desses animais a essas dietas energéticas pode ter ocasionado estas alterações no

tecido laminar anterior ao experimento. Além disso, a restrição de movimentação que estes animais tinham, devido ao sistema de *tie stall*, pode ter influenciado no desenvolvimento das lesões dos cascos.

O objetivo do nosso trabalho era verificar se um desafio alimentar, que ocorre a campo, seria capaz de causar laminite e alterar a histologia do casco. A alteração no formato da LE mais encontrada foi o franjamento, apesar do afilamento da LE estar presente. Diferentemente de Thoenes et al., (2005), encontraram lesões de afilamento da LE, como a alteração de formato mais presente, nos animais que tiveram laminite induzida com oligofrutose, ou seja, um quadro de laminite induzida a partir de acidose ruminal aguda.

Rahnama et al., (2020), confirmaram que o IGF1 pode ter um papel importante na laminite induzida por insulina em equinos. Os autores demonstraram que todos os cavalos tratados com insulina desenvolveram laminite dentro de 30 h, enquanto que os cavalos tratados com uma versão equinizada de um anticorpo monoclonal terapêutico anti-IGF-1R humano apresentaram menor afundamento da falange distal e alterações histológicas mais leves, com alongamento menor nas pontas das lamelas epidérmicas secundárias. No nosso trabalho as dietas de confinamento, aumentaram os níveis séricos de IGF-1, aumentando a AUC de insulina. Este aumento de IGF-1 pode ter favorecido o desaparecimento do eixo queratinizado com o encurtamento das lâminas epidermais, a proliferação de células nucleadas entre o tecido lamelar e o início da camada córnea que supostamente não deveria existir (paraqueratose), tornando o tecido lamelar mais instável. Há uma correlação negativa significativa entre o comprimento e a largura da LE com a AUC de insulina, indicando que o aumento da AUC está relacionado com o encurtamento das lâminas epidermais do tecido laminar, reduzindo a estabilidade e qualidade deste tecido.

Muitas questões ainda precisam ser respondidas sobre a patogênese da laminite. Estudos já demonstraram que a sobrecarga com oligofrutose é capaz de levar ao quadro de laminite, entretanto pesquisas são necessárias para determinar a relação entre uma dieta rica em carboidratos, predispondo a SARA e o quadro de laminite. Além disso, estudos são necessários para determinar se o IGF-1, que aumenta seus níveis nestas dietas ricas em amido, possui um papel importante na laminite em bovinos. Futuros estudos com menor tempo de adaptação, maior tempo de desafio com a dieta rica em amido, e/ou tornando a dieta com maior inclusão de carboidratos, analisando os níveis de IGF-1 devem ser conduzidos para investigar a relação entre acidose ruminal subclínica, alterações metabólicas e alterações histológicas do casco.

## 7. CONCLUSÃO

A dieta fornecida aos animais do grupo de alto grão foi capaz de induzir um quadro de acidose ruminal subclínica, confirmado pelas alterações do pH ruminal, das características etológicas e, principalmente, pelas lesões histológicas da parede ruminal. Isso enfatiza a importância da histologia do rúmen no diagnóstico da acidose ruminal. A biopsia de casco, realizada no período pré experimental, se mostrou eficiente para estudos dos distúrbios relacionados a laminite em bovinos. As dietas de confinamento foram capazes de reduzir o comprimento e largura das lâminas epidermais. A dieta de maior densidade energética foi capaz de aumentar o comprimento da paraqueratose no tecido laminar. Apesar do fato de que houve alterações histológicas nos cascos, não houve muita diferença entre as dietas com diferentes inclusões de amido. O aumento de IGF1 e o aumento da AUC de insulina, provocado pelas dietas de confinamento, pode ter favorecido o encurtamento das lâminas epidermais do tecido laminar com desaparecimento do eixo queratinizado com a proliferação de células nucleadas entre o tecido lamelar e o início da camada córnea que supostamente não deveria existir (paraqueratose), reduzindo a estabilidade e qualidade do tecido lamelar. Futuros estudos com menor tempo de adaptação, maior tempo de desafio com a dieta com maior inclusão de amido, e/ou tornando mais diversificadas as dietas de diferentes grupos, analisando os níveis de IGF1 devem ser conduzidos para investigar a relação entre acidose ruminal subclínica, alterações metabólicas e alterações histológicas de casco.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. *BeefREPORT Perfil da Pecuária no Brasil*, 2019.

AFONSO, J. A. B.; MENDONÇA, C.L. *Acidose Lática Ruminal*. Doenças de Ruminantes e Equídeos. 3ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p. 313-319.

ALLEN, M. S. Relationship Between Fermentation Acid Production in the Rumen and the Requirement for Physically Effective Fiber. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 7, p. 1447–1462, 1997.

ASCHENBACH, J. R.; KRISTENSEN, N. B.; DONKIN, S. S.; et al. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life*, v. 62, n. 12, p. 869–877, 2010.

ASPLIN, K. E.; SILLENCE, M. N.; POLLITT, C. C.; et al. Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *The Veterinary Journal*, v. 174, n. 3, p. 530–535, 2007.

BARBOSA, A. A.; ARAÚJO, M. C. N.; MAFFI, A. S.; et al. Clinical, hematological and histopathological aspects of experimental induction of laminitis in cattle through lipopolysaccharide infusion. *Ciência Rural*, v. 50, n. 8, p. 1-12, 2020.

BÄSSLER, S. C.; KENÉZ, Á.; SCHEU, T.; et al. Association between alterations in plasma metabolome profiles and laminitis in intensively finished Holstein bulls in a randomized controlled study. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 12735, 2021.

BERCHIELLI, T. T. A. V. P.; OLIVEIRA, S. G. DE. *Nutrição de ruminantes*. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

BERGSTEN, C.; FRANK, B. Sole Haemorrhages in Tied Heifers in Early Gestation as an Indicator of Laminitis: Effects of Diet and Flooring. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 37, n. 4, p. 375–382, 1996.

BERGSTEN, C.; GREENOUGH, P. R.; GAY, J. M.; et al. Effects of Biotin Supplementation on Performance and Claw Lesions on a Commercial Dairy Farm. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 12, p. 3953–3962, 2003.

BICALHO, R. C.; CHEONG, S. H.; CRAMER, G.; et al. Association Between a Visual and an Automated Locomotion Score in Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 7, p. 3294–3300, 2007.

BICALHO, R. C.; OIKONOMOU, G. Control and prevention of lameness associated with claw lesions in dairy cows. *Livestock Science*, v. 156, n. 1–3, p. 96–105, 2013.

BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. *Parasitology*, v. 129, n. S1, p. S247–S269, 2004.

BOOSMAN, R.; KOEMAN, J.; NAP, R. Histopathology of the Bovine Pododerma in Relation to Age and Chronic Laminitis1. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v. 36, n. 1–10, p. 438–446, 1989.

BROCKMAN, R. P.; LAARVELD, B. Hormonal regulation of metabolism in ruminants; a review. *Livestock Production Science*, v. 14, n. 4, p. 313–334, 1986.

- BRUIJNIS, M. R. N.; HOGEVEEN, H.; STASSEN, E. N. Assessing economic consequences of foot disorders in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 6, p. 2419–2432, 2010.
- CARTER, R. A.; GEOR, R. J.; BURTON STANIAR, W.; et al. A. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *The Veterinary Journal*, v. 179, n. 2, p. 204–210, 2009.
- CASAGRANDE, F. P. *Perfil metabólico e mineral de vacas no período peri-parto: qualidade e conformação dos cascos*. 2013, 149p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COOK, N. B.; NORDLUND, K. V.; OETZEL, G. R. Environmental Influences on Claw Horn Lesions Associated with Laminitis and Subacute Ruminant Acidosis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. E36–E46, 2004.
- CORRY, D. B.; TUCK, M. L. Selective aspects of the insulin resistance syndrome: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 10, n. 4, p. 507–514, 2001.
- COUNOTTE, G. H. M.; VAN'T KLOOSTER, A. Th.; VAN DER KUILEN, J.; PRINS, R. A. An Analysis of the Buffer System in the Rumen of Dairy Cattle. *Journal of Animal Science*, v. 49, n. 6, p. 1536–1544, 1979.
- CUNHA, G. S. P.; MAIA, M. de A.; FERNANDES, L. M. G.; et al. Physically effective fiber changes nutrient levels of total mixed ration and fecal parameters in beef feedlots. *Ciência Rural*, v. 51, n. 5, p. 1-6, 2021.
- DANSCHER, A. M.; ENEMARK, J. M. D.; TELEZHENKO, E.; et al. Oligofructose overload induces lameness in cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 2, p. 607–616, 2009.
- DANSCHER, A. M.; TOELBOELL, T. H.; WATTLE, O. Biomechanics and histology of bovine claw suspensory tissue in early acute laminitis. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 1, p. 53–62, 2010.
- DE KOSTER, J. D.; OPSOMER, G. Insulin Resistance in Dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 29, n. 2, p. 299–322, 2013.
- DIRKSEN G. *Sistema digestivo*. In: Exame Clínico dos Bovinos. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008, p. 166-228.
- DONG, S.-W.; ZHANG, S.-D.; WANG, D.-S.; et al. Comparative proteomics analysis provide novel insight into laminitis in Chinese Holstein cows. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 161, 2015.
- DUFFIELD, T. et al. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 1, p. 59–66, 2004.
- FERGUSON, H. J.; KOH-TAN, H. H. C.; JOHNSTON, P. E. J.; et al. Light microscopic observations of the ruminal papillae of cattle on diets with divergent forage to cereal ratios. *Animal*, v. 16, n. 3, p. 100462, 2022.
- GEOR, R. J. Metabolic Predispositions to Laminitis in Horses and Ponies: Obesity, Insulin Resistance and Metabolic Syndromes. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 28, n. 12, p. 753–759, 2008.
- GREENOUGH, P. R. *Bovine laminitis and lameness: a hands on approach*. Elsevier, p 311, 2007.

- HENDRY, K. A.; KNIGHT, C. H.; GALBRAITH, H.; et al. Basement membrane integrity and keratinization in healthy and ulcerated bovine hoof tissue. *Journal of Dairy Research*, v. 70, n. 1, p. 19–27, 2003.
- HIGINO, B. D. S. S.; TARSO, S. G. S. De. O rúmen como marcador de saúde: revisão de literatura. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 13, n. 3, p. 309, 2019.
- HUNGATE, R. E. *The Rumen Protozoa: The Rumen and its Microbes*, 1966, p. 91–147.
- IBGE. Indicadores IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE*, 2020.
- JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. *Alimentary System*. In: Pathology of domestic animals. 6ª ed. Academic press, 2016, v. 2, p 1-257.
- KAHN, C. R. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: A necessary distinction. *Metabolism*, v. 27, n. 12, p. 1893–1902, 1978.
- KAUFMAN, E. I.; LEBLANC, S. J.; MCBRIDE, B. W.; et al. Association of rumination time with subclinical ketosis in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 7, p. 5604–5618, 2016.
- KASKE, M. et al. Insulin responsiveness of sheep, ponies, miniature pigs and camels: results of hyperinsulinemic clamps using porcine insulin. *Journal of Comparative Physiology B*, v. 171, n. 7, p. 549-556, 2001.
- KLEEN, J. L.; HOOIJER, G. A.; REHAGE, J.; et al. Subacute Ruminant Acidosis (SARA): a Review. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v. 50, n. 8, p. 406–414, 2003.
- KÖNIG, H.E. E LIEBICH, H. *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido*. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- KOZLOSKI, G. B. *Bioquímica dos ruminantes*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 139p.
- LEAN, I. J.; WESTWOOD, C. T.; GOLDBER, H. M.; et al. Impact of nutrition on lameness and claw health in cattle. *Livestock Science*, v. 156, n. 1–3, p. 71–87, 2013.
- LIMA, A. S. *Avaliação do perfil hormonal de garrotes submetidos à carência energética prolongada*. 2005. 139p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
- LIMA, M. L. M. Padrão de fermentação ruminal de bovinos recebendo produto homeopático. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 4, p. 969–975, 2008.
- MANELLA, M. D. Q.; LOURENÇO, A. J.; LEME, P. R. Recria de bovinos Nelore em pastos de *Brachiaria brizantha* com suplementação protéica ou com acesso a banco de proteína de *Leucaena leucocephala*. Características de fermentação ruminal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 4, p. 1002–1012, 2003.
- MARTINS, R. A. *Perfil metabólico de bovinos confinados com dietas de diferentes densidades energéticas*. 2020. 128p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- MCDOUGALL, E. I. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical journal*, v 43, p. 99-109, 1948.
- MEIER, A. D.; DE LAAT, M. A.; REICHE, D. B.; et al. The oral glucose test predicts laminitis risk in ponies fed a diet high in nonstructural carbohydrates. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 63, p. 1–9, 2018.
- MENDES, H. M. F.; CASAGRANDE, F. P.; LIMA, I. R.; et al. Histopathology of dairy cows' hooves with signs of naturally acquired laminitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 5, p. 613–619, 2013.
- MENDES, H. M. F. *Desenvolvimento e teste de viabilidade de instrumento cirúrgico específico para realização de biópsias de casco em bovinos*. 2015. 74p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MOREIRA, P. et al. Avaliação do pH do fluido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções concentrado: volumoso. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, v. 36, n. 6, p. 1201-1218, 2009.
- MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Animal Feed Science and Technology*, v. 10, n. 1, p. 1–14, 1983.
- MULLING, C. K. W.; GREENOUGH, P. R. Applied physiopathology of the foot. *World Buiatrics Congress*. p 1-15, 2006.
- MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, n. 3, p. 193–205, 2008.
- NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Acidosis in Feedlot Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 23, n. 2, p. 333–350, 2007.
- NILSSON, S. A. et al. Clinical, morphological, and experimental studies of laminitis in cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 4, n. Suppl. 1, 1963.
- NOCEK, J. E. Bovine Acidosis: Implications on Laminitis. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 5, p. 1005–1028, 1997.
- NRC – National Research Council. *Nutrient requirements of dairy cattle*. Washington, DC, USA: National Academy Press, 362 p. 2001.
- OSSENT, P.; LISCHER, C. Post mortem examination of the hooves of cattle, horses, pigs and small ruminants under practice conditions. *In Practice*, v. 19, n. 1, p. 21–29, 1997.
- OWENS, F. N., AND A. L. GOETSCH. *Ruminal fermentation: The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition* 5.ed. New Jersey: Englewood, Cliffs, 1993. p.145-171.
- PASSOS, L. T. *Alteração nos dígitos bovinos relacionadas à dieta e a à própria anatomia*. 2019. 75p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- PLAIZIER, J. C.; GARNER, T.; DROPO, T.; et al. Nutritional practices on Manitoba dairy farms. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 84, n. 3, p. 501–509, 2004.
- PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; GOZHO, G. N.; et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal*, v. 176, n. 1, p. 21–31, 2008.
- RAHNAMA, Samira et al. Effects of an anti-IGF-1 receptor monoclonal antibody on laminitis induced by prolonged hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *PloS one*, v. 15, n. 9, p. e0239261, 2020.
- REECE, W.O. *Metabolismo dos carboidratos: Fisiologia dos animais domésticos*. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006 p. 462-475.
- RIBEIRO, R. M. *Relação entre obesidade e laminite endocrinopática em equinos: aspectos clínicos, laboratoriais, morfométricos e patológicos*. 2017, 149p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, v. 292, n. 5519, p. 1119–1122, 2001.
- SALTIEL, A. R. New Perspectives into the Molecular Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Cell*, v. 104, n. 4, p. 517–529, 2001.
- SASIKALA, K.; VIJAYAKUMAR, G.; SIVARAMAN, S.; et al. Ruminoscopy in Cattle (*Bos taurus*) with Ruminant Lactacidosis - A Rapid and Novel Method to Visualize Rumen Papillary Changes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 7, n. 05, p. 3112–3119, 2018.
- SHEARER, J. K.; VAN AMSTEL, S. R. Toe lesions in dairy cattle. *Proceedings 46th Florida Dairy Production Conference*. p 1-9, 2009.
- SILVEIRA, M. F. et al. Ganho de peso vivo e fermentação ruminal em novilhos mantidos em pastagem cultivada de clima temperado e recebendo diferentes suplementos. *Ciencia Rural*, v. 36, n. 3, p. 898–903, 2006.
- SMITH, G. W. Supportive therapy of the toxic cow. *Veterinary Clinics of North America*, v. 21, n. 3, p. 595-614, 2005.
- SORIANI, N.; PANELLA, G.; CALAMARI, L. Rumination time during the summer season and its relationships with metabolic conditions and milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 8, p. 5082–5094, 2013.
- STEELE, M. A.; ALZAHAL, O.; HOOK, S. E.; et al. Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 51, n. 1, p. 39, 2009.
- STEELE, M. A.; GREENWOOD, S. L.; CROOM, J.; et al. An increase in dietary non-structural carbohydrates alters the structure and metabolism of the rumen epithelium in lambs. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 92, n. 2, p. 123–130, 2012.
- STONE, W. C. Nutritional Approaches to Minimize Subacute Ruminal Acidosis and Laminitis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 87, p. 13–26, 2004.

- SLYTER, L. L. Influence of acidosis on rumen function. *Journal of animal science*, v. 43, n. 4, p. 910–929, 1976.
- TARLTON, J. F.; HOLAH, D. E.; EVANS, K. M.; et al. Biomechanical and Histopathological Changes in the Support Structures of Bovine Hooves around the Time of First Calving. *The Veterinary Journal*, v. 163, n. 2, p. 196–204, 2002.
- TAVARES, N. C.; BARBOSA, A. A.; BERMUDEZ, R. F.; et al. Impact of high-energy diets on the rumen environment and digital cushion in confined cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 39, n. 12, p. 970–977, 2019.
- THOEFNER, M. B.; WATTLE, O.; POLLITT, C. C.; et al. Histopathology of Oligofructose-Induced Acute Laminitis in Heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 8, p. 2774–2782, 2005.
- TIEDEMANN, F.; GMELIN, L. I. Die Verdauung nach Versuchen. *Karl Gross*, v 1, 1826.
- TOMLINSON, D. J.; MÜLLING, C. H.; FAKLER, T. M. Invited Review: Formation of Keratins in the Bovine Claw: Roles of Hormones, Minerals, and Vitamins in Functional Claw Integrity. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 4, p. 797–809, 2004.
- TREIBER, K. H.; KRONFELD, D. S.; GEOR, R. J. Insulin Resistance in Equids: Possible Role in Laminitis. *The Journal of Nutrition*, v. 136, n. 7, p. 2094S-2098S, 2006.
- VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. *Fermentação Ruminal: Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p
- VAN AMSTEL, S. R.; SHEARER, J. K. Abnormalities of Hoof Growth and Development. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 17, n. 1, p. 73–91, 2001.
- VAN AMSTEL, S. R.; SHEARER, J. K. Review of Pododermatitis Circumscripta (Ulceration of the Sole) in Dairy Cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 20, n. 4, p. 805-811, 2006.
- VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2 ed. Cornell: Cornell University Press, 1994. 476p
- VERMUNT, J. J. One step closer to unravelling the pathophysiology of claw horn disruption: For the sake of the cows' welfare. *The Veterinary Journal*, v. 174, n. 2, p. 219–220, 2007.
- VERMUNT, J. J.; GREENOUGH, P. R. Predisposing factors of laminitis in cattle. *British Veterinary Journal*, v. 150, n. 2, p. 151–164, 1994.
- VIVENZA, P. A. D. *Perfil metabólico e hormonal de novilhos f1 holandês x gir submetidos à respirometria, sob diferentes planos nutricionais, em jejum e realimentação*. 2012. 110f. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- WELLS, S. J.; TRENT, A. M.; MARSH, W. E.; et al. Individual cow risk factors for clinical lameness in lactating dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 17, n. 1–2, p. 95–109, 1993.
- YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of Grain Processing, Forage to Concentrate Ratio, and Forage Particle Size on Rumen pH and Digestion by Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 84, n. 10, p. 2203–2216, 2001.

ZACHUT, M. et al. Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 9, p. 5656-5669, 2013.

ZEBELI, Q.; DIJKSTRA, J.; TAJAJ, M.; et al. Modeling the Adequacy of Dietary Fiber in Dairy Cows Based on the Responses of Ruminal pH and Milk Fat Production to Composition of the Diet. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 5, p. 2046–2066, 2008.