

CONTROLE DA ENDOTOXEMIA PELA ADMINISTRAÇÃO DE VIRGINIAMICINA EM EQUINOS COM SOBRECARGA POR CARBOIDRATOS*

ENDOTOXAEMIA CONTROL BY THE VIRGINIAMYCIN ADMINISTRATION IN HORSES WITH CARBOHYDRATE OVERLOAD

Erica Cristina da Rocha Roier¹, Tatiana Pessoa dos Reis¹, Marcus Sandes Pires², Rita de Cássia Campbell Machado Botteon³, Fernando Queiroz de Almeida³ e Paulo de Tarso Landgraf Botteon³

ABSTRACT. Roier E.C.R., Reis T.P., Pires M.S., Botteon R.C.C.M, Almeida F.Q. & Botteon P.T.L. [Endotoxaemia control by the virginiamycin administration in horses with carbohydrate overload]. Controle da endotoxemia pela administração de virginiamicina em equinos com sobrecarga por carboidratos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 33(2):120-124, 2011. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, 23851-970, RJ, Brasil. E-mail: pbotteon@ufrj.br

This work aimed to verify the efficiency of the administration of virginiamycin in starch overload horses to control the harmful effects of this overload. 17, 6 g/kg of starch was administered by a nasogastric tube. It was used four horses with a right ventral colon fistula with four treatments in a Latin square 4 x 4. T1 – control, without virginiamycin administration; T2 - virginiamycin administration at same time of corn starch; T3 – virginiamycin administration 12 hours after corn starch; T4 - virginiamycin administration at same time of corn starch and 12 hours after it. Clinical examinations and blood samples were collected before the assay (zero time), 12, 24, 36 and 48 hours after carbohydrate overload. Besides the clinical evaluation, the endotoxin serum levels of the horses were determinate. There were not observed changes on mucosa color and refill time on treatments that virginiamycin were administered in overload moment. Increase the hooves temperature and digital pulse was observed in all groups, However, there was no lameness in any group. The administration of virginiamycin at the time of the corn starch overload or even 12 hours after was effective in minimizing the clinical signs and the values of endotoxemia after the corn starch overload. In the control treatment the plasma levels of endotoxin increased significantly at 24 hours after corn starch overload ($p < 0.05$).

KEY WORDS. Endotoxaemia, horse, virginiamycin, probiotic, therapy, carbohydrate overload.

RESUMO. Quatro equinos machos adultos, fistulados no cólon ventral direito, foram utilizados num delineamento quadrado latino 4x4 com o objetivo de avaliar o efeito da virginiamicina (V) em casos de sobrecarga por amido (SA). Os animais foram avaliados em quatro grupos: 1-

controle (C) – (SA, sem V); 2-(V¹²) - 5mg/kg de V, 12 horas após a SA; 3 - (V⁰) - 5mg/kg de V no momento da SA; 4 -(V^{0,12}) - 5mg/kg no momento da SA e 12 horas após a SA. NO momento da SA e 12, 24, 36 e 48 horas após SA, após realização de exames clínicos e coletadas

* Recebido em 29 de novembro de 2010

Aceito em 8 de abril de 2011.

¹ Médico-veterinário. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). BR 465 km 7, Seropédica, 23890-000, RJ. E-mail: eroier@terra.com.br

² Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). BR 465 km 7, Seropédica, 23890-000, RJ. E-mail: marcussandes@yahoo.com.br - bolsista de IC-PIBIC (CNPq/UFRRJ).

³ Médico-veterinário, DSc. Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ. BR 465 km 7, Seropédica, 23890-000, RJ. E-mail: pbotteon@ufrj.br

amostras de sangue para avaliação hematológica, os níveis séricos de endotoxina foram mensurados nos momentos 0, 12 e 24 horas após a SA. A virginiamicina administrada no momento da SA promoveu estabilidade nos valores de endotoxina ao longo do tempo, e não foram observadas alterações clínicas nos parâmetros coloração de mucosas e TPC. Somente o grupo controle apresentou elevação significativa na endotoxemia (112 ng/L), observada 24h após a SA. O aumento da temperatura dos cascos e do pulso digital foi registrado nos animais de todos os tratamentos. Porém, não se observou claudicação em nenhum grupo. A administração de virginiamicina no momento da SA ou mesmo 12 horas após, foi eficaz em minimizar os sinais clínicos e os valores de endotoxemia após da SA. No tratamento controle houve elevação dos valores de endotoxina plasmática 24h após a SA ($p < 0,05$).

PALAVRAS-CHAVE. Endotoxemia, equino, virginiamicina, probiótico, terapia, sobrecarga por carboidrato.

INTRODUÇÃO

Endotoxemia é a maior causa de mortalidade em eqüinos (Moore 2001). É frequentemente uma seqüela de distúrbios gastrintestinais, assim como de doenças onde há crescimento excessivo ou morte de bactérias gram-negativas, como nos casos de peritonite, pleurite, metrite e pneumonia e sobrecarga por carboidratos. Dietas ricas em carboidratos propiciam a ocorrência de distúrbios fermentativos no intestino grosso de eqüinos. Estes distúrbios favorecem o crescimento das bactérias ácido resistente como *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus bovis*, que produzem ácido lático, acarretando uma queda brusca do pH. A ação deste meio ácido sobre a mucosa pode resultar em colite, cólica, endotoxemia, acidose metabólica e laminite (Moore et al. 1979).

Animais acometidos por cólicas em função deste distúrbio, com frequência desenvolvem laminite e em alguns casos podem ficar incapacitados para a prática de suas atividades normais, ocasionando grandes perdas econômicas, o que justifica o empenho e a relevância de pesquisas que visam a prevenção.

A virginiamicina é um produto da fermentação do *Streptomyces virginiae* atuando no bloqueio da síntese de proteínas bacterianas no ribossomo, sendo o único antibiótico ionóforo indicado para eqüinos (Skrivanová 1999). Possui ação bactericida *in vivo* sobre microrganismos gram positivos, tais como os do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus*, produtoras de ácido lático, ac. butírico e ac. fórmico, enquanto as bactérias que degradam o ácido lático demonstraram resistência a esta droga (Nagaraja & Taylor 1987). Em eqüinos,

sua adição à dieta teve efeito no controle da produção e no acúmulo de ácido lático em animais alimentados com altos teores de concentrados (Rowe et al. 1994).

O presente estudo teve por objetivo verificar se a administração da virginiamicina em casos de sobrecarga por amido é eficiente em controlar os efeitos deletérios desta dieta e o desenvolvimento de endotoxemia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados quatro equinos, sem raça definida, machos, castrados, com idades entre 2,5 e 5 anos, estimadas pela dentição (Silva et al. 2003), peso entre 230 e 344 kg e escore corporal de dois a três em uma escala de 1 a 5 (Speirs 1999).

Seleção dos animais

Os animais foram selecionados a partir de avaliação clínica, e posteriormente testados para anemia infecciosa eqüina, sendo verificado resultado negativo para todos os animais. Em seguida foram pesados, numerados de 01 a 04 e mantidos aos pares em baias de dimensões 3,0 X 4,0 metros, com piso de cimento. Receberam água e feno Coast cross (*Cynodon dactylon*) *ad libitum* e 15g diárias de sal mineralizado⁴ para padronização da condição física. Foram tratados com vermífugo à base de ivermectina, pamoato de praziquantel e pamoato de pirantel⁵ e receberam banhos com deltametrina⁶. Após esta etapa os animais foram submetidos à cirurgia para criação de uma fístula no cólon ventral direito segundo a técnica descrita por Lopes et al. (2010) modificada. A seguir, os animais foram mantidos aos pares, em baias com piso de concreto, de dimensões 3,0 X 4,0 metros durante todo o período de experimentação.

A indução de sobrecarga por amido

Esta foi realizada de acordo com o protocolo a seguir: após jejum alimentar e hídrico de 12 horas, os animais receberam 17,5g de amido de milho⁷/kg de peso corporal, segundo modificação do modelo experimental citado por Weiss et al (1994). Cada quilo de amido de milho foi dissolvido em um litro de água, sendo administrado através de sonda nasogástrica.

Exame clínico dos animais

Feno, água e mistura mineral voltaram a ser oferecidos, como descrito anteriormente, aproximadamente duas horas após a administração do amido.

⁴ Equifos 70 - Purina - Brasil.

⁵ Centurion-Valleé. Brasil.

⁶ Butox-Intervet AS. Brasil.

⁷ Maizena - Unileverl. Brasil

⁸ Cambrex®

Os animais foram avaliados em quatro tratamentos: 1- controle (C) – (SA, sem V); 2-(V¹²) - 5mg/kg de V, 12 horas após a SA; 3 - (V⁰) - 5mg/kg de V no momento da SA; 4 -(V^{0,12}) - 5mg/kg no momento da SA e 12 horas após a SA. Nos momentos 0, 12, 24, 36 e 48 horas após SA, foram realizados exames clínicos e coletadas amostras de sangue, soro e conteúdo intestinal.

No exames clínicos foram avaliados os parâmetros: temperatura retal (T), tempo de enchimento capilar (TEC), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), coloração das mucosas ocular e oral, pulso digital, temperatura dos cascos, grau de claudicação pela escala de Obel, a motilidade intestinal. As amostras de sangue jugular foram colhidas em frascos sem anticoagulante. A endotoxemia foi avaliada através da determinação dos níveis séricos de endotoxinas, determinada através de *kit* Cromogênico Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) QCL-1000⁸ nos momentos 0, 12 e 24 horas.

Análise estatística

O delineamento utilizado foi um quadrado latino 4 x 4 num modelo split-plots. Os tratamentos representaram os grupos (plots) e os tempos representaram os subgrupos. Após cada etapa de SA, os animais foram tratados clinicamente, através de hidratação oral e parenteral, e administração de antiinflamatório (flunixin meglumine) quando necessário, e mantidos em repouso até sua recuperação clínica, estabelecendo-se um intervalo de no mínimo 30 dias entre cada etapa.

Os dados relativos à FC, FR, T, endotoxemia e pH intestinal foram analisados pelo método ANOVA. Posteriormente, as médias foram submetidas ao teste de Tukey.

Os dados relativos à motilidade intestinal, pulso digital e claudicação foram analisados pelo teste de Friedman. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sintomas clínicos associados à endotoxemia são: depressão, anorexia, hipertermia seguida de hipotermia, taquicardia seguida de diminuição do rendimento cardíaco, redução da pressão sanguínea sistêmica, pele e extremidades frias, diarreia, congestão de mucosas, aumento do tempo de preenchimento capilar e fraqueza muscular que pode levar o animal ao decúbito. (Kiku et al. 2003).

No presente estudo não foram observadas manifestações de dor abdominal ou claudicação, sintoma esperado em caso de laminite. Os parâmetros FC, FR, coloração das mucosas e TPC apresentaram pequena va-

riação, sem diferença significativa entre os grupos. A temperatura retal manteve-se dentro da faixa de normalidade (37,5 a 38,5°C) na maioria dos momentos, exceto para os animais do grupo C, 36 horas após a SA, quando esteve abaixo da normalidade (36,95°C), diferindo significativamente dos demais tratamentos ($p < 0,05$). Os animais do grupo C tiveram alterações digestivas mais graves que os demais tratamentos, levando ao desenvolvimento de diarreia e desidratação, fatores que podem ter promovido hipotermia. O mesmo pode ocorrer em decorrência rápida absorção de endotoxinas (Reed & Bayly 2000).

Em todos os tratamentos avaliados houve alteração da motilidade intestinal; porém, houve redução dos movimentos peristálticos de modo mais intenso nos animais que não receberam virginiamicina no momento da indução (C e V¹²). Esta diminuição dos movimentos foi observada a partir das 24 h após a SA e permaneceu diminuído por todo o período de observação. Nos que receberam o antibiótico no tempo zero (V⁰ e V^{0,12}) esta diminuição dos borborismos ocorreu somente às 36 h, voltando ao normal às 48h.

A consistência das fezes dos animais que receberam virginiamicina no momento da indução (V⁰ e V^{0,12}) só se alterou (fezes amolecidas) 36 h após a SA, enquanto que o amolecimento das fezes foi observado às 24 h nos animais que não receberam o antibiótico no tempo zero (C e V¹²).

Estas alterações digestivas estão em consonância com as descrições de Robinson et al. (1976) que observaram que a ingestão de 17,6g/kg PV de uma dieta composta de 85% de amido de milho e 15% de serragem moída através de sonda nasogástrica promove alteração na consistência das fezes de cavalos que passaram a apresentar fezes amolecidas (de pastosa à líquida), aumento nos sons abdominais e a distensão abdominal. A diminuição da motilidade, Segundo White (1990) deve-se à ingestão de grande quantidade de carboidratos, que exerce um efeito inibitório sobre a musculatura intestinal e sobre o plexo neural intrínseco. Reed & Bayly 2000 relatam ainda, que a endotoxemia, associada à inflamação intestinal, causa redução da motilidade intestinal.

Alterações na coloração das mucosas e no TEC foram observadas nos animais submetidos aos tratamentos C e V¹², que apresentaram mucosas de coloração variando entre o rubro e o cianótico, e um TEC em torno de 3 segundos. Nos tratamentos V⁰ e V^{0,12} não foram observadas alterações quanto à coloração de mucosas e o TEC ficou em torno de 1 a 2 segundos. Estas duas variáveis são associadas aos quadros de endotoxemia e

indicam que houve comprometimento vascular periférico (MAIR et al. 2003). A análise destes dados sugere uma lesão precoce na mucosa intestinal, que não pode ser evitada com a administração do antibiótico após a sobrecarga (V^{12}). Por outro lado, nos animais em que a V foi aplicada deste o momento da sobrecarga (hora zero), estas alterações foram menos evidentes, sugerindo que lesão foi menos intensa. Este mesmo efeito foi observado em outros parâmetros clínicos como o aumento da temperatura dos cascos e do pulso digital, que foram menos evidentes nos animais submetidos aos tratamentos V^0 e $V^{0,12}$.

Foi observada diferença estatística entre os tratamentos, para a variável frequência cardíaca, somente na hora 36, porém nenhum dos tratamentos foi eficiente para controlar o aumento desta variável, visto que, em todos eles os animais apresentaram valores acima da normalidade, porém sem ultrapassar o valor médio de 59 batimentos por minuto.

O aumento da frequência cardíaca, observado principalmente nos animais submetidos aos tratamentos 1 e 3, parece estar associado ao desconforto abdominal que estes animais apresentavam, decorrente da diminuição dos sons intestinais, produção excessiva de gás, associado a diarreia e a inflamação causada pelo conteúdo intestinal ácido. Segundo Reed & Bayly (2000) a endotoxemia associada a inflamação intestinal, causa redução na motilidade intestinal, que somada a grande produção de gás pela excessiva fermentação, causa distensão da parede intestinal e sintomas de dor abdominal.

Os valores de pH intestinal foram significativamente menores nos tratamentos C e V^{12} , caracterizando maior acidez do conteúdo colônico, com valores de 5,41 e 5,15, respectivamente nos momentos 24 e 12h após a SA) e as maiores médias de pH foram verificadas nos tratamentos 2 e 4, onde o antibiótico foi administrado no tempo zero, conforme pode ser observado na Tabela 1 e na Figura 1. Ao final das observações os animais submetidos aos tratamentos 2 e 4 apresentaram pH do cólon superior a 7,0, o que não foi observado nos tratamentos 1 e 3.

Tabela 1. Valores médios de pH do conteúdo colônico observados nos intervalos zero, 12, 24, 36 e 48 horas após a indução da sobrecarga por carboidratos.

Hora	C	V^{12}	V^0	$V^{0,12}$
0	6,90 a	6,88 a	6,82 a	6,85 a
12	5,47 a	6,51 b	5,15 a	6,45 b
24	5,41 a	6,12 a	5,49 a	5,79 a
36	6,23 a	6,90 a	6,27 a	7,03 a
48	6,77 a	7,44 a	6,87 a	7,44 a

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na linha não diferem estatisticamente para $p < 0,05$.

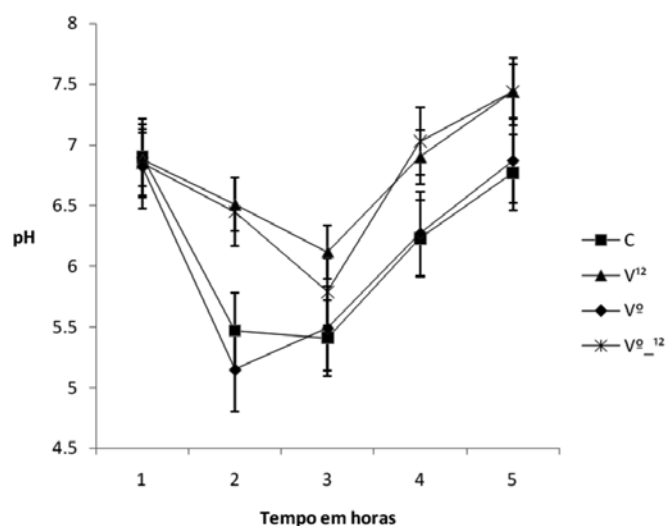


Figura 1. Variação do pH do conteúdo colônico nos intervalos zero, 12, 24, 36 e 48 horas após a indução da sobrecarga de carboidrato de acordo com o tratamento empregado

Este conteúdo intestinal ácido observado nos grupos submetidos aos tratamentos C e V^{12} , segundo Sprouse et al. (1987) é cáustico para a mucosa, causando necrose do tecido, além da destruição em massa de bactérias gram negativas, o que libera grande quantidade de endotoxina no lúmen, que pode ser absorvida para a circulação pela perda da integridade do epitélio intestinal.

A elevação do pH intestinal dos animais do grupo V^{12} , observada após a administração da virginiamicina, sugere que o produto pode ser empregado mesmo após o quadro de acidose já instalado, e não somente como profilático. Por outro lado, a ação observada nos grupos V^0 e $V^{0,12}$, demonstram a eficácia do produto em impedir a proliferação de bactérias produtoras de ácido láctico. O mesmo efeito foi citado por Rowe et al. (1994).

Nos animais não tratados com V (Grupo C), houve aumento dos níveis de endotoxinas de 7,46 vezes, em relação aos valores observados no momento da indução (15 ng/L na hora 0 para 112 ng/L na hora 24). Nos grupos V^0 , V^{12} e $V^{0,12}$, onde houve administração de virginiamicina não houve variação significativa nos valores de endotoxina no sangue ao longo do tempo. Todos

Tabela 2. Valores médios de endotoxina, expressos em ng/L, observados nas horas zero, 12 e 24 horas após a indução de sobrecarga por amido (SA).

Hora	C	V^{12}	V^0	$V^{0,12}$
0	14.8 Aa	13.9 Aa	11.8 Aa	9.9 Aa
12	22.4 Aa	46.0 Aa	12.7 Aa	41.0 Aa
24	116.0 Ba	8.1 Ab	18.3 Ab	45.8 Ab

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente para $P < 0,05$; C - (controle); V^0 - virginiamicina no momento da SA (hora zero); V^{12} - virginiamicina 12 horas após a SA; $V^{0,12}$ - virginiamicina na hora zero e 12 horas após a SA.

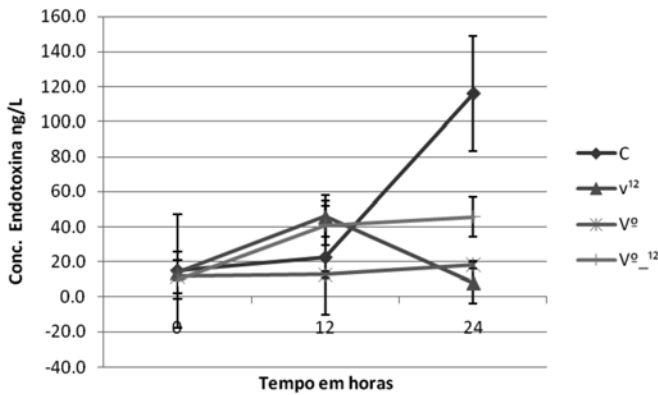


Figura 2. Variação da concentração de endotoxina nos intervalos zero, 12 e 24 horas após a sobrecarga por amido de acordo com o tratamento empregado C - (controle); V¹² - virginiamicina 12 horas após a indução; V⁰ - virginiamicina no momento da indução (hora zero); V^{0,12} - virginiamicina na hora zero e 12 horas após a indução.

os tratamentos com V diferiram significativamente ($P < 0,05$) do tratamento C, conforme demonstrado na Tabela 2 e Figura 2.

A presença de endotoxina no trato digestivo é comum em eqüinos, Moore et al. (1979) fizeram referência a valores de endotoxina de 80 mg/L em fluido cecal de eqüinos clinicamente normais, e Mackay (1992) estimou que o ceco e o cólon ventral de eqüinos saudáveis contenham mais que 2 g de endotoxina livre. Esta endotoxina é restrita ao lúmen intestinal por uma eficiente barreira mucosa, porém pequenas quantidades que a atravessam, são absorvidas pela circulação portal, não alcançando a circulação sistêmica, pois são retiradas pelo fígado (Moore & Barton 2003). Esta linha de defesa contra endotoxemia é composta pelo sistema retículo endotelial hepático (células de Kupffer), eficientes na remoção de endotoxinas absorvidas do sangue portal e da circulação sistêmica (Jacob et al. 1977). Quando há insuficiência hepática ou a quantidade de endotoxina supera a capacidade dos mecanismos normais de remoção, desenvolve-se a endotoxemia.

CONCLUSÃO

Nas doses empregadas, a virginiamicina não impediu o desenvolvimento de endotoxemia. Porém, os gru-

pos tratados com a virginiamicina apresentaram valores menores de endotoxina circulantes e manifestações clínicas mais brandas, sugerindo um efeito protetor através da inibição do crescimento microbiano, e assim promovendo uma proteção, ainda que parcial à parede intestinal e como resultado menor absorção de endotoxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jacob A.I., Goldberg P.K., Bloom N., Degenshein G.A. & Kozinn, P.J. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology*, 72: 1268-1270, 1977.
- Kiku Y., Kusano, K., Miyake, H., Fukuda, S., Talahashi, J., Inotsume, M., Hirano S., Yoshihara T., Roribio R.E., Okada H. & Yoshino T. Flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells induced by experimental endotoxemia in horse. *J. Vet. Med. Sci.*, 65: 857-863, 2003.
- Lopes M.A.F., White Ii, N.A., De Lima, L.R. & Costa, P.R.S. Large Experimental Fistula of the Right Dorsal Colon in Horses. *J. Equine Vet. Sc.*, 30: 213 - 219, 2010.
- Mackay, R.J. Endotoxemia In. Robinson, N.E. *Current therapy in equine medicine*. 3. ed., Philadelphia, W.B. Saunders, 1992. p. 225-232,
- Moore J.N., Garner H.E., Berg J.N. & Sprouse, R.F. Intracecal endotoxin and lactate during onset of equine laminitis: a preliminary report. *Am. J. Vet. Res.*, 40: 722-723, 1979.
- Moore J.N. & Barton M.H. Treatment of endotoxemia. *Vet. Clin.: Equine Pract.*, 19: 681-695, 2003.
- Reed S.M. & Bayly W.M. *Medicina Interna Equina*. 1ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2000. 938p.
- Rowe J. B., Lees M.J. & Pethick D.W. Prevention of acidosis and laminitis associated with grain feeding in horses. *J. Nutri.*, 124: 2742-2744, 1994.
- Skrivanova V., Marounek M. & Klein P. Effects of virginiamicin and salinomycin on performance, digestibility of nutrients and mortality of rabbits. *Ani. Feed Sci. Technol.*, 77:139-147, 1999. Speirs V.C. *Exame clínico de eqüinos*. 1ª ed. Porto Alegre, Artes Médicas Sul Ltda, 1999. 270 p.
- Sprouse, R.F.; Garner, H.E. & Green, E.M. Plasma endotoxin levels in horses subjected to carbohydrate induced laminitis. *Equine Vet. J.*, 19:25-28, 1987.
- Weiss D.J., Geor R.J. & Johnston G. Microvascular thrombosis associated with onset of acute laminitis in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, 55: 606-612, 1994.
- White N.A. *The Equine Acute Abdomen*. 1ª ed., Philadelphia, Lea & Fiieger, 1990. p. 373-374