

# **Veterinária e Zootecnia**

**Vet e Zootec.**

**2018 março; 25(1): 001-172**

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**

**ISSN Impresso 0102-5716**

**ISSN Eletrônico 2178-3764**

**Botucatu - SP – Brasil**

## Veterinária e Zootecnia

**ISSN Impresso 0102-5716**  
**ISSN Eletrônico 2178-3764**

VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
UNESP – Campus de Botucatu  
R. Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n – 18618-681 – Botucatu/SP  
Portal: <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>  
E-mail: [vetzootecnia.fmvz@unesp.br](mailto:vetzootecnia.fmvz@unesp.br)  
Tel. +55 14 3880 2094

Publicação trimestral  
Solicita-se permuta / *Exchange desired*  
Biblioteca do Campus de Botucatu  
Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin  
Bairro: Distrito de Rubião Junior  
18618-689 – Botucatu – SP – Brasil

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Veterinária e Zootecnia / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. – Vol. 1, n. 1(1985) – Botucatu, SP : FMVZ, 1985

Trimestral  
Texto em português/inglês/espanhol  
Descrição baseada em: Vol. 25, n.1, mar. (2018)  
ISSN Impresso 0102-5716  
ISSN Eletrônico 2178-3764

1. Medicina veterinária. 2. Zootecnia. I. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu.

Os artigos publicados na *Revista VETERINÁRIA E ZOOTECNIA* são indexados por:  
Lilacs, PERIÓDICA – Índice de Revistas Latinoamericanas em Ciências, Cambridge  
Scientific Abstracts, CAB Abstracts e GALE- Cengage Learning.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Administração Geral da UNESP**

**Reitor**

Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

**Vice-Reitor**

Prof. Dr. Sergio Roberto Nobre

**Pró-Reitor de Pesquisa**

Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff

**Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Prof. Dr. João Lima Sant'Anna Neto

**Pró-Reitor de Graduação**

Profa. Dra. Gladis Massini-Cagliari

**Pró-Reitor de Extensão Universitária**

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta

**Pró-Reitor de Administração**

Prof. Dr. Leonardo Theodoro Büll

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Administração da FMVZ**

**Diretor**

Prof. Dr. Celso Antonio Rodrigues

**Vice-Diretor**

Prof. Dr. Cezinande de Meira

**Botucatu**  
**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**FMVZ**  
**2018**

**EXPEDIENTE****Comissão Editorial**

Helio Langoni (Editor chefe)  
Márcio Garcia Ribeiro  
André Mendes Jorge

**Assessoria Técnica**

**Editoração Eletrônica:** José Luis Barbosa de Souza, Neilson Cassimiro da Silva

**Normalização Bibliográfica:** Rinaldo José Ortiz

**Revisor – Espanhol:** Selene Daniela Babboni

**Secretaria/apoio:** Neilson Cassimiro da Silva

A Revista **Veterinária e Zootecnia**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, Campus de Botucatu, publica artigos científicos originais, artigos de revisão bibliográfica, relatos de casos e comunicações curtas, referentes às áreas de Medicina Veterinária e de Zootecnia, com periodicidade trimestral, em português, espanhol, ou inglês, sendo os conceitos e opiniões emitidas, de responsabilidade exclusiva dos autores. Poderá editar e disponibilizar em sua página na internet, suplementos de eventos científicos.

A publicação está condicionada à avaliação preliminar do presidente da Comissão Editorial, que analisa o mérito e os aspectos formais do trabalho, de acordo com a categoria do artigo submetido e normas editoriais estabelecidas. Se adequado, adotando-se o mérito da avaliação por pares, é encaminhado para dois assessores (relatores), de acordo com a área. Os pareceres são mantidos sob sigilo absoluto, não havendo possibilidade de identificação entre autores e pareceristas. Os artigos não publicados são devolvidos.

Os trabalhos devem ser encaminhados pela página da internet:  
**<http://www.fmvz.unesp.br/rvz>**.

**Prof. Dr. Helio Langoni**  
**Revista “Veterinária e Zootecnia”**  
**UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**R. Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n**  
**18618-681 – Botucatu/SP – Brasil**

## Corpo Editorial

- Aristeu Vieira da Silva (UEFS/Feira de Santana)  
Antônio Felipe P. F. Wouk (UFPR – Escola de Agronomia e Veterinária)  
Benedito Correa (ICB – USP)  
Carlos Robles (Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – Argentina)  
Geraldo Heleno Silveira Alves (UFMG – Escola de Veterinária)  
Guilherme J. M. Rosa (School of Veterinary Medicine/Madison – Wisconsin – USA)  
Hélio Autran de Moraes (Oregon State University - College of Veterinary Medicine - USA)  
Italmar Teodorico Navarro (UEL/Londrina)  
José Eduardo P. Santos (University of Florida – USA)  
Juan A. M. Hirose (Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal - México)  
Julio César Cambraia Veado (UFMG – Escola de Veterinária)  
Leonardo José Richtzenhain (FMVZ – USP)  
Luiz Cláudio Lopes Correia da Silva (FMVZ – USP)  
Luciano dos Santos Bersot (UFPR/Palotina)  
Maria Inácia Corrêa de Sá (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária – Portugal)  
Maria Julia B. F. Flaminio (Cornell University – Cornell – USA)  
Maurício Costa Alves da Silva (UFBA/Salvador)  
Ney Luiz Pippi (UFMS/Santa Maria)  
Pamela Ruegg (School of Veterinary Medicine/Madison – Wisconsin – USA)  
Paulo de Camargo Duarte (Colorado State University – USA)  
Paulo Roberto Leme (USP – FZEA – Pirassununga)  
Rinaldo Aparecido Mota (UFRPE/Recife)  
Roberto Mauricio Carvalho Guedes (UFMG – Escola de Veterinária)  
Rogério de Paula Lana (UFV/Viçosa)  
Rômulo Cerqueira Leite (UFMG – Escola de Veterinária)  
Solange Maria Gennari (FMVZ – USP)  
Walter Motta Ferreira (UFMG – Escola de Veterinária)

## SUMÁRIO/CONTENTS/SUMARIO

EDITORIAL .....	9
ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLES/ARTÍCULOS DE REVISIÓN	
<b>DIAGNÓSTICO POR IMAGEM DE HÉRNIA DISCAL HANSEN TIPO I, II E III EM CÃES / IMAGING DIAGNOSTIC OF HANSEN TYPE I, II AND III DISC HERNIATION IN DOGS / DIAGNÓSTICO POR IMAGEN DE LA HERNIA DISCAL HANSEN TIPO I, II Y III EN LOS PERROS.</b> Lidiane da Silva Alves .....	10
<b>ESTUDO SOBRE AS DIFERENTES TÉCNICAS DE SEXAGEM DE ESPERMATOZOIDES / STUDY OF DIFFERENT SPERMATOOA SEXING TECHNIQUES / ESTUDIO SOBRE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE SEXAJE DE ESPERMATOZOIDES.</b> Caroline Scott, Fabiana Ferreira Souza, Gabriele Barros Mothé, Viviana Helena Vallejo Aristizabal, José Antonio Dell'Aqua Junior.....	21
<b>CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE: ALTERNATIVA PARA SEXAGEM ESPERMÁTICA EM CÃES? / DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION: ALTERNATIVE FOR SEXING SPERM IN DOGS? / CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD: ALTERNATIVA PARA SEXAR ESPERMATOZOIDES CANINOS?</b> Gabriele Barros Mothé, Caroline Scott, Fabiana Ferreira de Souza .....	30
<b>SISTEMAS DE MANEJO PARA MAXIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS DE CORTE NOS TRÓPICOS / MANAGEMENT SYSTEMS TO MAXIMIZE THE REPRODUCTIVE EFFICIENCY IN BEEF CATTLE IN THE TROPICS / SISTEMAS DE GESTIÓN PARA MAXIMIZAR LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN GANADO DE CARNE EN LAS ZONAS TROPICALES.</b> Fernanda Cavallari de Castro, Hugo Fernandes, Cláudia Lima Verde Leal .....	41
<b>ALTERAÇÕES DA MEDULA ÓSSEA E A IMPORTANCIA DO MIELOGRAMA NO DIAGNÓSTICO DA EHRlichiose MONOCÍTICA CANINA – REVISÃO / BONE MARROW CHANGES AND THE IMPORTANCE OF THE MYELOGRAM IN DIAGNOSING CANINE MONOCYTICS EHRlichiosis – A REVIEW / ALTERACIONES EN LA MÉDULA ÓSEA Y LA IMPORTANCIA DEL MILOGRAMA EN EL DIAGNOSTICO DE EHRlichiosis MONOCITICA CANINA – REVISIÓN.</b> Marília Salgado Caxito, Fernanda Panseri Rodrigues, Isis Indaiara Gonçalves Granjeiro Taques, Daniel Moura de Aguiar, Regina Kiomi Takahira, Antônio Carlos Paes .....	61
REVISÃO DE LITERATURA/LITERATURE REVIEW/REVISIÓN DE LA LITERATURA	
<b>AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR DO NEONATO OVINO – REVISÃO DE LITERATURA / EVALUATION OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM OF OVINE NEONATE – LITERATURE REVIEW / EVALUACIÓN CARDIOVASCULAR DEL RECIÉN NACIDO OVINO – REVISIÓN DE LA LITERATURA.</b> Carla Maria Vela Ulian, Raissa Karolliny Salgueiro Cruz, Maria Lucia Gomes Lourenço, Simone Biagio Chiacchio.....	67
RELATOS DE CASO/CASE REPORTS/INFORMES DEL CASO	
<b>COLANGITE CRÔNICA ASSOCIADA À INFESTAÇÃO DE TREMATÓDEO POR <i>PLATYNOSOMUM FASTOSUM</i>, CONCOMITANTE À VESÍCULA BILIAR DUPLA EM UM GATO – RELATO DE CASO / CHRONIC CHOLANGITIS ASSOCIATED WITH LIVER FLUKE INFESTATION CAUSED BY <i>PLATYNOSOMUM FASTOSUM</i>, CONCURRENT WITH GALLBLADDER DUPLICATION IN A DOMESTIC CAT – CASE REPORT / COLANGITIS CRÓNICA ASOCIADA A LA INFESTACIÓN POR TREMATODO HEPÁTICO CAUSADO POR <i>PLATYNOSOMUM FASTOSUM</i>, CONCURRENTENTE CON LA DUPLICACIÓN DE LA VESÍCULA BILIAR EN EL GATO DOMÉSTICO – PRESENTACIÓN DE UN CASO.</b> Karina Maria Basso, Alexandre Arenales, Nazilton de Paula Reis Filho, Mauro José Lahm Cardoso, Celmira Calderón .....	79

- PRE-PUBIC TENDON RUPTURE IN EWE / RUPTURA DO TENDÃO PRÉ-PÚBICO EM OVELHA / RUPTURA DEL TENDÓN PRE-PÚBICO EN OVEJAS.** Gabriel Augusto Monteiro, Fernanda Saules Ignacio, Rosiara Rosária Dias Maziero, Carmo Emanuel Almeida Biscarde, Maria Clara Costa Mattos, Patrícia Alves Dutra, Sony Dimas Bicudo .....85
- MELANOCITOMA PERIVULVAR CONGÊNITO EM BOVINO / PERIVULVAR BOVINE CONGENITAL MELANOCYTOMA / MELANOCITOMA PERIVULVAR CONGÉNITO EN BOVINO.** Juliane Teramachi Trevizan, Maria Emília Franco Oliveira, Alexandre Arenales, Daniela Bernadete Rozza, Carlos Antonio Miranda Bomfim, Marion Burkhardt Koivisto .....89
- ENDOCARDITE VEGETATIVA EM LEITÕES CAUSADA POR *STREPTOCOCCUS SUIS* SOROTIPO 9 / VEGETATIVE ENDOCARDITIS IN PIGLETS CAUSED BY *STREPTOCOCCUS SUIS* SEROTYPE 9 / ENDOCARDITIS VEGETATIVA EN LECHONES CAUSADAS POR *STREPTOCOCCUS SUIS* SEROTIPO 9.** Thais Schwarz Gaggini, Thomas Bierhals, Glauber Machado, Wagner C. G. Bragança, Fernando Pandolfo Bortolozzo .....94
- CONTROLE POPULACIONAL DE ESPÉCIES SILVESTRES INVASORAS POR MEIO DE LAQUEADURA E VASECTOMIA EM PRIMATAS *CALLITHRIX PENICILLATA*: RELATO DE CASO / POPULATION CONTROL OF INVASIVE WILD SPECIES THROUGH TUBAL LIGATION AND VASECTOMY IN PRIMATES *CALLITHRIX PENICILLATA*: CASE REPORT / CONTROL DE LA POBLACIÓN DE ESPECIES SILVESTRES INVASORAS MEDIANTE LIGADURA DE TROMPAS Y VASECTOMÍA EN PRIMATAS *CALLITHRIX PENICILLATA*: INFORME DEL CASO.** Davi Fragôso da Silva, Elisângela Barboza da Silva, André Preturlon Terra.....99
- ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS
- EFETIVIDADE NA RECICLAGEM DO GEL DE AGAROSE EM LABORATÓRIO COMERCIAL / EFFECTIVENESS IN RECYCLING AGAROSE'S GEL IN COMMERCIAL LABORATORY / EFICACIA DEL RECICLAJE DE GEL DE AGAROSA EN LABORATORIO COMERCIAL.** Daniel Dávida, Paulo Roberto Rodrigues Ramos .....105
- DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE COLESTEROL-LDL DE EQUINOS POR ESPECTROFOTOMETRIA SUBMETIDOS A EXERCÍCIO EM ESTEIRA E SUPLEMENTADOS COM VITAMINA "E" / DETERMINATION OF EQUINE'S LDL CHOLESTEROL BY SPECTROPHOTOMETRY SUBMITTED TO EXERCISE ON TREADMILL AND SUPPLEMENTED WITH VITAMIN "E" / DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE COLESTEROL LDL EQUINA POR ESPECTROFOTOMÉTRICA SOMETIDOS A EJERCICIO EN ESTERA Y SUPLEMENTADOS CON VITAMINA "E".** Pollyanny Ferreira Costa, Maria Carolina Gobbi de Oliveira, Letícia Andreza Yonezawa, Marcos Jun Watanabe, Aguemí Kohayagawa, Tatiana de Sousa Barbosa .....112
- LIPID CONTENT, MITOCHONDRIAL ACTIVITY AND EARLY EMBRYO DEVELOPMENT IN OOCYTE COLLECTED FROM CROSSBRED COWS (*BOS TAURUS INDICUS*) / CONTEÚDO LIPÍDICO, ATIVIDADE MITOCONDRIAL E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE DE OÓCITOS COLETADOS DE VACAS MISTIÇAS (*BOS TAURUS INDICUS*) / CONTENIDO LIPÍDICO, ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO DE OVOCITOS PROVENIENTES DE VACAS MESTIZAS (*BOS TAURUS INDICUS*).** Yoeli Mendez, Nohely Parra, Francisco Baez, Robert Valeris, Patricia Villamediana .....120
- A PRÁTICA DO TRATAMENTO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS, CUIDADOS E PROTOCOLOS / TREATMENT PRACTICE IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS (CVL) IN VETERINARY CLINICS, CARE AND PROTOCOLS / LA PRÁCTICA DEL TRATAMIENTO EN LA LEISHMANIOSIS VISCERAL CANINA (LVC) EN CLÍNICAS VETERINÁRIAS, CUIDADOS Y PROTOCOLOS.** Ana Luísa Holanda de Albuquerque, Helio Langoni .....132

- DIVERSIDADE E BIOMASSA FITOPLANCTÔNICA EM VIVEIRO DE CARCINICULTURA MARINHA NO ESTADO DO PARÁ / DIVERSITY AND BIOMASS PHYTOPLANKTON IN MARINE SHRIMP FARMING IN PARA STATE / DIVERSIDAD Y BIOMASA DE FITOPLANCTON EN EL CULTIVO DE CAMARÓN MARINO DEL ESTADO DE PARÁ.** Rayette Souza da Silva, Alex da Silva Lobão de Souza, Glauber David Almeida Palheta, Maria Sintia Monteiro da Costa, Nuno Filipe Alves Correia de Melo .....142
- CHARACTERIZATION OF RABIES EXPOSURE IN COLOMBIA, 2007-2011 / CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO À RAIVA NA COLÔMBIA, 2007-2011 / CARACTERIZACIÓN DE LAS EXPOSICIONES RÁBICAS EN COLOMBIA, 2007-2011.** Daniel Alejandro Buitrago Medina, Claudia Patricia Roncanci, Hugo Grisales, Noel Barengo .....155
- ANÁLISE AMBIENTAL, SANITÁRIA E ECONÔMICA DE UM SISTEMA DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS SÓLIDOS E EFLUENTES EM UMA GRANJA DE SUÍNOS / ENVIRONMENTAL, SANITARY AND ECONOMIC ANALYSIS OF A SYSTEM OF TREATMENT OF SOLID WASTE AND EFFLUENTS IN A SWINE FARM / ANÁLISIS AMBIENTAL, SANITÁRIA Y ECONÓMICA DE UN SISTEMA DE TRATAMIENTO DE RESIDUOS SÓLIDOS Y EFLUENTES EN UNA GRANJA DE CERDOS.** Evelyne Cazarotto Farezin, Juliana Sarubbi, Jean Louis Rabello de Morais, Waldemar Hazoff Junior, Francisco Rafael Martins Soto .....164
- ETIOLOGIA DAS MASTITES: PESQUISA DE MICRO-ORGANISMOS DA CLASSE *MOLLICUTES* / ETIOLOGY OF MASTITIS: PARTICIPATION OF MOCROORGANISMS OF THE CLASS *MOLLICUTES* / ETIOLIGIA DE LAS MASTITIS: PARTICIPACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA CLASE *MOLLICUTES*.** Bruna Churocof Lopes, Marcela de Pinho Manzi,, Helio Langoni .....173

## EDITORIAL

## OS AVANÇOS EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Nos últimos anos a inovação possibilitou ganhos para a ciência e tecnologia, resultando em práticas modernas tanto na produção de alimentos quanto nos diagnósticos de enfermidades em plantas e nos animais. No que diz respeito à Medicina Veterinária, atualmente é possível a utilização de equipamentos de última geração para o diagnóstico por imagem à semelhança da medicina humana, como tomografia e ressonância magnética. Hoje há centros especializados para dar suporte aos clínicos veterinários, incluindo-se centros especializados em endoscopia veterinária, com possibilidade de intervenção para procedimentos complexos e cirurgias avançadas, como a endoscopia intervencionista e videocirurgias torácicas e abdominais, bem como cirurgias na área oncológica e gastroenterologia, doenças do trato reprodutivo e em nefrologia.

Aliado a esses aspectos, temos que enaltecer os profissionais dessas áreas quanto à importância no agronegócio que suporta positivamente o PIB na geração de renda para o país, que independente do modelo de seu crescimento e dos fatores associados ao seu desempenho, coloca o Brasil em destaque. Reforçam essa colocação resultados de pesquisas que utilizam indicadores que mostram o desempenho e a importância desse segmento. Importantes, ainda, as reformas positivas de políticas socioeconômicas e setoriais que formam o cenário sobre o qual as atividades produtivas organizaram-se nos últimos anos. Não se deve deixar de lado que a pesquisa e o desenvolvimento explicam também o sucesso do agronegócio.

O presente número da Revista Veterinária e Zootecnia traz artigos interessantes inéditos, contribuindo com o desenvolvimento científico em diferentes áreas do conhecimento. Como artigos de revisão: Diagnóstico por Imagem de Hérnia Discal Hansen Tipo I, II e III em Cães; Estudo sobre as Diferentes Técnicas de Sexagem de Espermatozoides; Centrifugação em Gradiente de Densidade: Alternativa para Sexagem Espermática em Cães?; Sistemas de Manejo para Maximização da Eficiência Reprodutiva em Bovinos de Corte nos Trópicos; Alterações da Medula Óssea e a Importância do Mielograma no Diagnóstico da Ehrlichiose Monocítica Canina – Revisão; Avaliação Cardiovascular do Neonato Ovino – Revisão de Literatura. Os relatos de caso: Colangite Crônica Associada à Infestação de Trematódeo por *Platynosomum fastosum*, Concomitante à Vesícula Biliar Dupla em um Gato – Relato de Caso; Ruptura do Tendão Pré-Púbico em Ovelha; Melanocitoma Perivulvar Congênito em Bovino; Endocardite Vegetativa em Leitões Causada por *Streptococcus suis* Sorotipo 9; Controle Populacional de Espécies Silvestres Invasoras por Meio de Laqueadura e Vasectomia em Primatas *Callithrix penicillata*: Relato de Caso. Os artigos originais: Efetividade na Reciclagem do Gel de Agarose em Laboratório Comercial; Determinação dos Valores de Colesterol-LDL de Equinos por Espectrofotometria Submetidos a Exercício em Esteira e Suplementados com Vitamina “E”; Conteúdo Lipídico, Atividade Mitocondrial e Desenvolvimento Embrionário Precoce de Oócitos Coletados de Vacas Mestiças (*Bos taurus indicus*); A Prática do Tratamento na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em Clínicas Veterinárias, Cuidados e Protocolos; Diversidade e Biomassa Fitoplanctônica em Viveiro de Carcinicultura Marinha no Estado do Pará; Caracterização da Exposição a Raiva na Colômbia, 2007-2011; Análise Ambiental, Sanitária e Econômica de um Sistema de Tratamento de Resíduos Sólidos e Efluentes em uma Granja de Suínos; Etiologia das Mastites: Pesquisa de Micro-Organismos da Classe *Mollicutes*.

**Prof. Helio Langoni**  
Editor-Chefe

## DIAGNÓSTICO POR IMAGEM DE HÉRNIA DISCAL HANSEN TIPO I, II E III EM CÃES

Lidiane da Silva Alves<sup>1</sup>

### RESUMO

Para o presente trabalho, foi realizado um levantamento bibliográfico abordando os métodos diagnósticos da hérnia discal, a qual é a discopatia mais comum em cães e está relacionada aos distúrbios neurológicos que envolvem a medula espinhal. A hérnia discal é a principal causa para a investigação imagenológica da coluna vertebral em pequenos animais. O diagnóstico por imagem é fundamental para obter o conhecimento da doença, da localidade da lesão e da gravidade. Os exames mais comuns realizados na rotina veterinária são a radiografia e a mielografia, por serem mais acessíveis, porém o diagnóstico preciso se dá por meio da tomografia computadorizada ou da ressonância magnética, sendo esta última a técnica primordial para as discopatias. Esses fatores, bem como sua etiologia, fisiopatologia e predisposição serão abordados também neste estudo.

**Palavras-chave:** disco intervertebral, radiografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética

## IMAGING DIAGNOSTIC OF HANSEN TYPE I, II AND III DISC HERNIATION IN DOGS

### ABSTRACT

For the present study was reviewed bibliography about the diagnostic methods of disc herniation, which it is the discopathy most common in dogs and it is related to neurological disorders involving the spinal cord. Disc herniation is the main cause for the imaging investigation of the spine in small animal. Diagnostic imaging is fundamental to have knowledge of the disease, the location and severity of the lesion. The most common examinations performed in veterinary medicine are radiography and myelography, because they are more accessible, but an accurate diagnosis is made through computed tomography or magnetic resonance, being the latter the primary technique to the discopathy. These factors, as well as the etiology and pathophysiology will be approached also in this study.

**Keywords:** intervertebral disc, radiography, computed tomography, magnetic resonance

## DIAGNÓSTICO POR IMAGEN DE LA HERNIA DISCAL HANSEN TIPO I, II Y III EN LOS PERROS

### RESUMEN

Para este estudio, se realizó una literatura sobre los métodos de diagnóstico de la hernia de disco, que es la enfermedad del disco más común en los perros y se relaciona con trastornos neurológicos que implican la médula espinal. La hernia de disco es la causa principal para la investigación por imagen de la columna vertebral en los animales pequeños. El diagnóstico por imagen es esencial para la comprensión de la enfermedad, la localización de la lesión y la gravedad. Las pruebas más comunes que se realizan en la medicina veterinaria son la radiografía y la mielografía, debido a que son más asequibles, pero el diagnóstico exacto es a través de la tomografía computarizada o reso-

---

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Campus Botucatu.

nancia magnética, siendo esta última la principal técnica de discopatías. Estos factores, así como su etiología, fisiopatología y la predisposición también serán abordados en este trabajo.

**Palabras claves:** disco intervertebral, radiografía, tomografía computarizada, resonancia magnética

## INTRODUÇÃO

A degeneração do disco intervertebral e, conseqüentemente, a hérnia discal são as causas mais comuns de alterações neurológicas em cães (1-6). Tais causas podem levar a compressão da medula espinhal ou das raízes nervosas (2,6). Essa alteração ocorre em raças condrodistróficas e não condrodistróficas (7).

A apresentação clínica é variável, dependendo da localização da lesão, do volume de material no interior do canal (1,2,5,8), da velocidade com que este material é ejetado (2,5) e da duração da lesão (1,5,8). Os sinais clínicos podem ser ataxia e paresia, nos casos brandos, e paralisia com ou sem a perda da função sensitiva caudalmente à lesão, nos casos mais graves (1,9).

O diagnóstico baseia-se na resenha, anamnese e exame neurológico (1,8), além da realização de exames complementares para o diagnóstico preciso e definitivo do local de extrusão ou protrusão do disco herniado (8), como a radiografia simples e contrastada (mielografia), a tomografia computadorizada e mielotomografia, e a ressonância magnética (7). Embora a radiografia seja o exame de primeira escolha, é um método não confirmatório para o diagnóstico de hérnia de disco intervertebral (10). A mielografia e a ressonância magnética são exames de diagnóstico definitivo de cães com suspeita de herniação (3,9,10). Uma imagem precisa pode estabelecer a presença e a gravidade da doença do disco intervertebral, permitindo que os clínicos determinem o prognóstico e realizem o tratamento (6).

O tratamento depende do tipo e grau da lesão (8), havendo muitas controversas quanto à determinação de uma técnica específica para cada caso (2). O tratamento pode ser clínico conservativo, utilizando analgésicos e anti-inflamatórios associados ao repouso absoluto sob confinamento (1,2), ou então cirúrgico, utilizando técnicas descompressivas como a hemilaminectomia e laminectomia (2,7,9), a facetectomia (7), a fenestração ventral, a fenestração lateral (1) e ainda a pediclectomia (11). Outras formas de tratamento que vem sendo bastante utilizadas na medicina veterinária são acupuntura (12), fisioterapia (13,14), eletroacupuntura (15,16) e a ozonioterapia (17). Novas técnicas têm sido desenvolvidas para o tratamento da degeneração do disco intervertebral em cães, como o transplante de condrócitos discais (18).

A suspeita de doença do disco intervertebral é uma das mais importantes indicações para a obtenção de imagens da coluna vertebral em pequenos animais (6). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os métodos de diagnóstico por imagem em cães com hérnia discal para diagnosticar corretamente a doença e então proceder ao respectivo tratamento.

### *Etiologia e fisiopatologia*

Em geral, as hérnias discais estão associadas a degeneração dos discos intervertebrais (DDIV), causando a protrusão ou extrusão do material discal para o interior do canal vertebral, sendo de forma espontânea ou secundária a um trauma, levando a compressão da medula espinhal ou das raízes nervosas (19).

A estrutura anatômica dos discos intervertebrais (DIVs) podem explicar as ocorrências mais comuns de protrusão ou extrusão pelo fato do anel fibroso ser mais espesso nas porções ventral e laterais, da sua localização dorsalmente excêntrica do núcleo pulposo e da maior fragilidade do ligamento longitudinal dorsal em relação ao ligamento longitudinal ventral, assim promovendo a herniação dorsal. Além da compressão dorsal da medula espinhal, podem ocorrer compressões ventral e lateral com aprisionamento do nervo espinhal (20). Outros fatores podem influenciar a

hérnia de DIV, como a genética, o comprimento da coluna vertebral, o grau de aptidão muscular e o peso corporal (21).

### **Hansen tipo I ou extrusão**

Na extrusão do DIV ocorre a ruptura do anel fibroso dorsal (22) devido a degeneração ou metaplasia condroide e, então, o material do núcleo pulposo sai e vai para o interior do canal vertebral (23). A degeneração condroide é caracterizada pela desidratação e calcificação do núcleo pulposo (6), podendo ser visualizados precocemente nas radiografias (23).

Esse tipo de hérnia, envolve a concentração de glicosaminoglicano, perda de conteúdo líquido e de conteúdo proteoglicano, e aumenta o conteúdo de colágeno. Com isso, o disco torna-se mais cartilaginoso e o núcleo torna-se mais granular, normalmente mineralizados, e perde sua qualidade de absorção de choque hidroelástico (19).

Ocorrem normalmente de forma aguda (6) lesionando as estruturas anatômicas da região e comprimindo a medula, podendo ocorrer hemorragia extradural ou intradural e tumefação da medula espinhal causando início agudo de para- ou tetraparesia (24). A extrusão discal também pode ocorrer de forma lenta e progressiva, produzindo paresia que se torna mais severa após vários dias ou tem curso crônico e irregular. A lesão traumática grave pode levar a alterações vasculares secundárias como a mielomalácia, que pode ser ascendente ou descendente (23).

Nesse tipo de hérnia, quando ocorre de forma lenta, o material discal pode extravasar para ambos os lados do ligamento longitudinal dorsal e o animal pode apresentar déficit maior num membro em relação ao outro (23).

É comum nas raças condrodistróficas (Dachshund, Pequinês, Beagle, Poodle, Shih Tzu, Lhasa Apso, Basset Hound e Welsh Corgis) (5,6,19) e normalmente em animais jovens (24), com idade variando de dois a sete anos, com o pico de incidência aos quatro e cinco anos (19). Cerca de 62% a 92% dos cães não condrodistróficos pesando mais que 20 Kg possuem extrusão do DIV toracolombar (22).

### **Hansen tipo II ou protrusão**

A protrusão do DIV está tipicamente associada à degeneração fibrosa ou metaplasia fibroide (6,19,22,23). À medida que o animal vai envelhecendo, o núcleo é acometido pela desidratação, no lugar de ser substituído por cartilagem hialina, é substituído por fibrocartilagem (20), sem que o DIV mineralize, como acontece na degeneração condroide (22,23), não podendo ser vistos nas radiografias de rotina da coluna vertebral (23).

O anel fibroso pode sofrer ruptura parcial das fibras (22,23), se esticar ou hipertrofiar (6), não havendo a saída do material nuclear e sim uma saliência do DIV que comprime a medula espinhal (23). O processo de protrusão ocorre de forma crônica (6), promovendo paresia lentamente progressiva que evolui em semanas ou meses (23).

A maior ocorrência de protrusão é em pacientes idosos (6), com idade variando de oito a dez anos (19) e em raças de grande porte não condrodistróficas (6,19), mostrando maior incidência em cães da raça Pastor Alemão. Predileção sexual não tem sido reportada, embora alguns trabalhos relatem que machos e fêmeas castradas apresentaram alto risco de desenvolvimento de hérnia de DIV que fêmeas não castradas. A degeneração fibroide acomete apenas um pequeno número de DIV (22), sendo os locais mais comuns de T12-T13 (23).

### **Hansen tipo III**

A hérnia Hansen tipo III se caracteriza pela herniação discal traumática não degenerativa (6,19). Se um disco com o núcleo pulposo adequadamente hidratado é colocado sobre extremo estresse, o anel fibroso dorsal pode-se romper, e então o material discal saudável é ejetado para o canal vertebral causando contusão medular. Como esse material está hidratado, ele difunde-se na

---

Alves, LS. Diagnóstico por imagem de hérnia discal Hansen tipo I, II e III em cães. Vet. e Zootec. 2018 mar.; 25(1): 10-20.

gordura peridural deixando apenas às alterações secundárias atribuíveis a contusão medular aguda com pouca ou nenhuma compressão da medula espinhal (19).

## **DIAGNÓSTICO POR IMAGEM**

### **Radiografia simples**

Os sinais radiográficos de hérnia discal são observados pelo estreitamento do espaço intervertebral (6,22,23,25,26), do forame intervertebral e do espaço articular intervertebral dorsal (6,24), opacificação do forame intervertebral (6,22,25) e cuneiformização dos corpos vertebrais contíguos (22,25,26).

Em extrusão discal, que ocorre a calcificação dos DIVs previamente, são bem visíveis em radiografias simples (6,23) pelo material discal calcificado dentro do anel dorsal ou no canal medular (23). Já em protrusão discal, onde não há mineralização do material de DIV, pode ser identificado como uma estrutura de densidade semelhante à dos tecidos moles, verificando-se que este achado é mais facilmente detectado ao nível da coluna vertebral lombar, já que não há sobreposição das costelas aos forames intervertebrais (6).

Associado às hérnias Hansen tipos I e II podem ser identificados sinais radiográficos de osteófitos vertebrais (20), espondilose deformante e esclerose vertebral (6,20). Os osteófitos vertebrais são, geralmente, ventrais e laterais; se dorsais, eles podem causar estenose do canal vertebral (20).

### **Mielografia**

A mielografia é um estudo contrastado usado para avaliar a medula espinhal pela injeção de meios de contrastes não iônicos no espaço subaracnoide. É utilizada para identificar sítios de compressão da medula espinhal devido ao edema, material discal, anormalidade vertebral ou neoformações (27). Contudo, a mielografia deve ser realizada somente após um exame radiográfico simples de boa qualidade (28).

Para a realização da mielografia, o animal deve ser submetido a anestesia geral e então injetar o meio de contraste entre as vértebras C1-C2 com o paciente em decúbito lateral com hiperflexão da cabeça ou entre L5-L6 com o paciente em decúbito esternal ou lateral com a coluna lombar fletida e os membros posteriores estendidos cranialmente abrindo o espaço intervertebral (27).

Os meios de contrastes injetados na medula espinhal são iohexol ou iopamidol utilizando doses específicas para cada local de punção, sendo na região de cisterna as doses de 0,3 ml/kg para avaliar o segmento cervical e 0,45 ml/kg para o segmento toracolombar; assim como na região lombar que se utiliza 0,45 ml/kg para avaliar o segmento cervical e 0,3 ml/kg o segmento toracolombar (27).

Se o paciente apresenta paralisia aguda e com uma única lesão demonstrada no exame simples, torna-se desnecessária a mielografia, a menos que os achados neurológicos não sejam compatíveis com o diagnóstico radiográfico (29), pois a mielografia é um procedimento invasivo podendo piorar o estado neurológico de alguns animais (6,30). Podem ocorrer convulsões durante a recuperação, principalmente se o meio de contraste adentrar ao crânio.

A mielografia não permite um diagnóstico patológico definitivo das lesões espinhais, mas certamente permite a identificação do local das lesões ao longo da espinha e também a localização da lesão em relação à medula e meninges (31). Durante a interpretação da mielografia, deve se estar ciente que podem existir artefatos mielográficos, como injeção epidural ou subdural acidental que podem dificultar o diagnóstico. Se houver ausência de alterações na mielografia, o paciente deve ser submetido a outros exames de imagem, como a TC ou a RM.

Os sinais mielográficos da hérnia discal são compressão extradural da medula espinhal com deslocamento e modificação da largura da coluna de contraste, diminuição do espaço subaracnoide e sua opacificação nas projeções lateral ou ventrodorsal, estreitamento do espaço de DIV (6) e o

desvio dorsal do espaço subaracnoide ventral (Figura 1) ao nível da herniação discal nas projeções laterais (6,26). Quando a protrusão de DIV é ligeiramente lateral à linha média, a aparência observada da coluna do meio de contraste pode ser fendida ou bifurcada, apresentando linha dupla de contraste na projeção lateral. É visualizada também uma massa epidural com localização ventral ou ventrolateral que causa o deslocamento da medula espinhal em sentido dorsal (6).



Figura 1. Incidência lateral direita de mielografia cervicotorácica de um cão sem raça definida, 7 anos, macho, com histórico de trauma por mordedura em cervical e apresentando tetraplegia. Nota-se deslocamento dorsal da coluna de contraste medular ventral (seta) ocasionada por proliferação óssea intervertebral de C6-C7 (Imagens do setor de Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP, Botucatu).

Existem alguns problemas técnicos da mielografia que podem comprometer a qualidade do exame e, conseqüentemente, o diagnóstico, como a distribuição inadequada do meio de contraste, administração errônea do meio de contraste na epidural e posicionamento radiográfico inadequado. Assim como outros fatores anatomopatológicos que podem dificultar a avaliação, como um deslocamento atípico do material discal e tumefação da medula espinhal (28).

### **Epidurografia**

Em pacientes com o saco dural curto ou pequeno, o exame de mielografia torna-se inviável para a avaliação, sendo necessária a realização de outros procedimentos radiográficos contrastados, como a epidurografia ou discografia (32). Em sua maioria, essa técnica está direcionada para a avaliação da região lombossacra da coluna vertebral (33).

A epidurografia é realizada mediante a injeção do meio de contraste no espaço epidural ventral (6,31), por uma agulha inserida no canal vertebral da junção lombossacra (6,31,32) ou entre a primeira e a segunda vértebras caudais (31). A dose do contraste é similar ao da mielografia (32) ou então numa adição de 1 a 5 ml de meio de contraste (33), assim como as projeções radiográficas (32). O desvio dorsal do aspecto ventral do espaço epidural (Figura 2) e a interrupção completa da coluna de contraste cranial constituem achados à epidurografia mais condizentes com compressão medular (6).



Figura 2. Epidurografia da coluna lombossacra de um cão Boxer, 10 anos, macho, apresentando paraparesia ambulatória. Neste exame, nota-se ondulações da coluna de contraste ventral (seta) representada pelo meio contraste na região epidural. Houve extravasamento do meio de contraste na musculatura dorsal (asterisco) (Imagens do setor de Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP, Botucatu).

### Discografia

A discografia é realizada como um procedimento complementar da mielografia ou da epidurografia e provê de um excelente método de avaliação para os discos da região lombossacra (33). Para o exame, é posicionada uma agulha de 20 ou 22 gauge pelo canal vertebral, transpassando o anel fibroso até o núcleo pulposo. A dose do contraste utilizada é de 0,1 ml em um disco normal, pois há uma resistência na aplicação a partir desse volume, e de 0,2 a 0,3 ml em um disco degenerado. Em casos de ruptura do anel fibroso, o meio de contraste deve extravasar para o canal vertebral (32).

### Tomografia computadorizada

A TC é uma ferramenta de diagnóstico sensível que pode ser utilizada como um adjunto da mielografia ou como um procedimento de diagnóstico único para, assim, evitar os efeitos secundários da mielografia (22). Entretanto, alguns autores (25) relatam que, para se obter bons resultados, é necessário ter localizado previamente a área da lesão mediante um exame neurológico e as correspondentes radiografias da coluna vertebral.

A vantagem da TC sobre a radiografia é que esta técnica tem a capacidade de produzir imagens multiplanares (dorsal, sagital e transversal) e em três dimensões (3D) (34). Além do mais, a resolução de contraste superior da TC permite a detecção de hérnia com material discal não mineralizado (Figura 3) e de baixa densidade mineral (6).

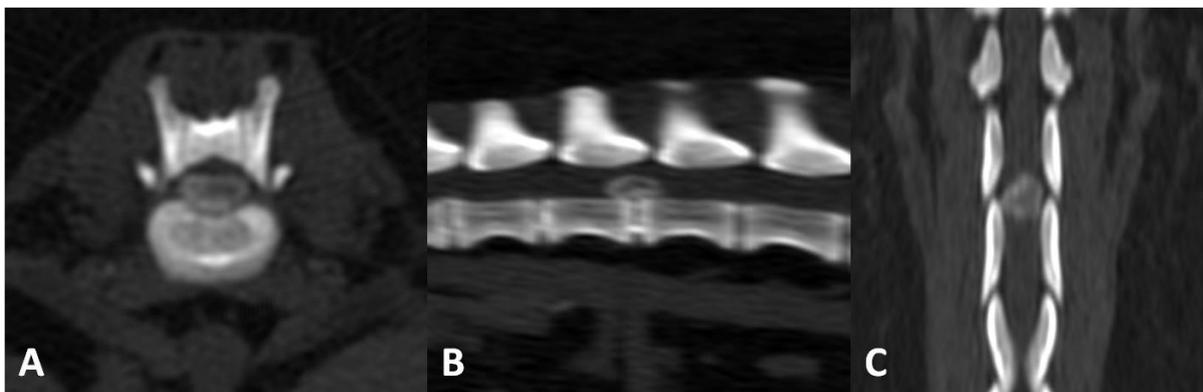


Figura 3. Tomografia computadorizada sem administração de contraste em janela óssea nos cortes (A) transversal, (B) sagital e (C) dorsal, de um cão Dachshund, 4 anos, fêmea, com paraparesia não ambulatória. Observa-se material hiperatenuante, bem definido no canal medular entre as vértebras T13-L1 compatível com extrusão do disco intervertebral mineralizado (Imagens do setor de Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP, Botucatu)

No exame tomográfico simples, podem ser observados o fenômeno de vácuo e as coleções de gás no interior do espaço intervertebral, devido à liberação de gases, principalmente nitrogênio, a partir de tecidos adjacentes e acúmulo dentro de fissuras do disco. O sinal de vácuo indica degeneração discal, mas não compressão da medula espinhal (24).

Para o exame de mielotomografia, injeta-se meio de contraste iodado no espaço subaracnoide em uma dose menor que para a mielografia radiográfica (19). Nesta técnica, quando há herniação discal, observa-se a compressão e o deslocamento da medula espinhal, a compressão do espaço epidural e material de densidade de tecidos moles no local da compressão (Figura 4).

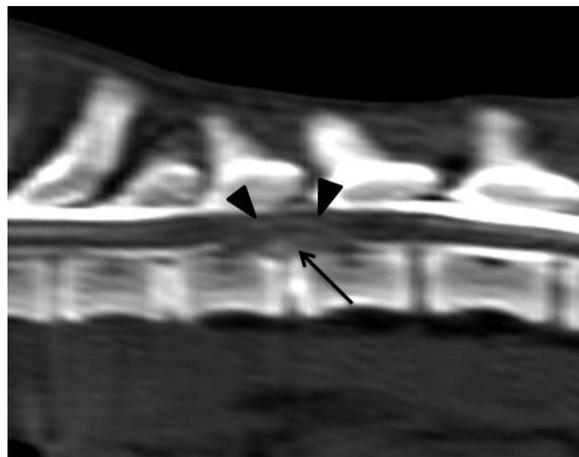


Figura 4. Corte sagital em janela óssea de um exame mielotomográfico realizado em um cão sem raça definida, 4 anos, macho, apresentando paraplegia de início agudo. É possível notar acentuado deslocamento da coluna de contraste medular ventral (pontas de setas) provocada por material de tecidos moles, compatível com extrusão discal disseminada entre T11-T12 (Imagens do setor de Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP, Botucatu).

Na avaliação tomográfica da DDIV pode-se observar hemorragia como um material hiperatenuante se estendendo cranial e caudalmente do local de compressão, edema como uma área hipoatenuante, preenchimento intramedular por contraste sugerindo mielomalácia e tumefação da medula espinhal (24).

### Ressonância magnética

A RM é considerada o melhor método de diagnóstico para a avaliação da degeneração de DIV (22) e para gerar imagens da medula espinhal, do espaço epidural, dos DIVs e dos ligamentos espinhais (25), ou qualquer tecido que possua grandes quantidades de moléculas de água. Este método imagenológico tem como vantagem adquirir imagens primárias em qualquer plano e não necessitar de injeções de meio de contraste no espaço subaracnoide, pois o próprio LCR funciona como tal (35). Como desvantagem, o exame de RM possui um custo relativamente caro e sua técnica é limitada na avaliação mais detalhada dos ossos (36).

A RM é capaz de mostrar todos os aspectos da lesão do DIV, como o estágio de desidratação do DIV, descobrir se um DIV está somente abaulado ou rompido, a localização de qualquer material discal livre, a magnitude da compressão e o deslocamento da medula espinhal, a presença de hemorragia e edema relacionados (36) e, principalmente, o tipo de degeneração discal, se extrusão ou protrusão (22).

O núcleo pulposo normal tem um sinal hiperintenso comparado ao anel fibroso. Quando esse núcleo perde a hidratação, o sinal torna-se menos intenso e deve aparecer iso- ou hipointenso em relação ao anel fibroso. Em extrusões discais o material degenerado aparece primariamente como uma lesão hipointensa em torno da medula espinal na imagem ponderada em T2 no corte sagital (Figura 5). Na hérnia Hansen tipo III, que ocorre a ruptura traumática de um núcleo pulposo sadio, resulta em um material hiperintenso dentro ou ao redor da medula espinal, pois o material nuclear encontra-se normalmente hidratado (37).

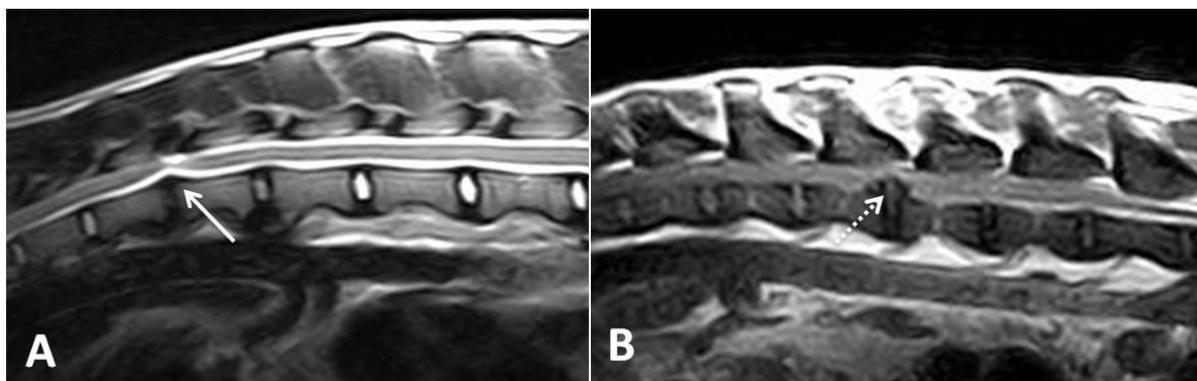


Figura 5. Ressonância magnética em plano sagital. (A) Imagem em T2 de um cão sem raça definida, 6 anos, macho, com paralisia não ambulatória, demonstrando deslocamento dorsal do trajeto medular provocada por pequeno material hipointenso entre T12-T13 compatível com protrusão discal. (B) Imagem em T1 de um cão Poodle, 6 anos, fêmea, apresentando paraparesia. Nota-se a presença de material de baixa intensidade de sinal entre L2-L3 (seta tracejada) deslocando a medula dorsalmente compatível com extrusão discal (Imagens do setor de Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP, Botucatu)

Normalmente, as extrusões agudas estão relacionadas à hemorragia intra- ou extramedular e edema intramedular na região da ruptura discal (36), sendo que a hemorragia resulta do dano ou ruptura do seio venoso vertebral ventral. A combinação de material discal herniado e de hemorragia resulta em uma intensidade de sinal heterogêneo nas imagens ponderadas em T2. É comum observar hipertrofia do ligamento longitudinal dorsal nas hérnias Hansen tipo II (37). Contudo, o ligamento longitudinal dorsal, que faz parte do assoalho do canal vertebral, pode ser mais proeminente em alguns animais podendo, então, ser confundido com protrusão discal (36).

O corte transversal fornece importante informação sobre a localização e a quantificação da compressão medular pelo material herniado. Herniação discal dorsal são as mais ocorridas, sendo as ventrais raras e contribuem ou resultam em espondilose deformante. Pode ocorrer a herniação lateral, com menor frequência, e não deve acometer a medula espinal, porém resulta na compressão e no impacto de nervos periféricos (37).

Em herniações crônicas, o material discal dentro ou ao redor da medula espinal deve realçar após a administração do contraste endovenoso, devido ao aumento da vascularização dentro do material e/ou associado à inflamação. Em alguns casos, o realce de contraste pode ocorrer em região periférica do material discal (37).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico por imagem é fundamental para se ter conhecimento da enfermidade, da localização da lesão e, como na tomografia computadorizada e ressonância magnética, o grau da lesão. A radiografia simples é a de primeira escolha para se tentar diagnosticar a discopatia, devido sua fácil disponibilidade, porém ela não é capaz de confirmar a doença ou a gravidade da lesão, e sim mostrar se há alguma alteração radiográfica que indica uma discopatia. Outra modalidade de fácil disponibilidade e indicadora do local da lesão é a mielografia, porém oferece riscos ao animal, assim como a discografia e epidurografia, que são menos realizadas. No Brasil, a ressonância magnética e

a tomografia computadorizada ainda são de difícil acesso, estando disponíveis apenas em algumas capitais e em poucas cidades do interior. Nos países desenvolvidos, essas duas modalidades são consideradas como primordiais, descartando-se a radiografia e mielografia na investigação de discopatias. Contudo, o diagnóstico obtido por essas técnicas permite uma correta abordagem terapêutica, sendo ela conservativa ou cirúrgica, e, conseqüentemente, o prognóstico. É válido lembrar que a anamnese, o exame clínico e neurológico e exames laboratoriais jamais devem ser dispensados, pois é por meios destes que o paciente é direcionado ao diagnóstico por imagem.

## REFERÊNCIAS

1. Toombs JP, Bauer MS. Afecção do disco intervertebral. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 2a ed. São Paulo: Manole; 1998. v.1, p.1286-305.
2. Arias MVB, Nishioka CM, Garcia CO, Reia AZ, Baraúna Júnior D, Marcasso RA. Avaliação dos resultados clínicos após cirurgia descompressiva em cães com doença de disco intervertebral. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2007;59:1445-50.
3. Hecht S, Thomas WB, Marioni-Henry K, Echandi RL, Matthews AR, Adams WH. Myelography vs. computed tomography in the evaluation of acute thoracolumbar intervertebral disk extrusion in chondrodystrophic dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009;50:353-9.
4. Bernkut N, Grinwis G, Pickee E, Auriemma E, Lagerstedt AS, Hagman R, et al. Reliability of macroscopic grading of intervertebral disk degeneration in dogs by use of the Thompson system and comparison with low-field magnetic resonance imaging findings. *Am J Vet Res*. 2011;72:899-904.
5. Santos RP, Mazzanti A, Beckmann DV, Berté L, Ripplinger A, Polidoro Neto D, et al. Recuperação funcional em cães com doença do disco intervertebral toracolombar sem percepção à dor profunda: 37 casos (2002-2010). *Pesqui Vet Bras*. 2011;31:345-9.
6. Widmer WR, Thrall DE. Doença do disco intervertebral em cães e gatos, mielografia e doença medular. In: Thrall DE. Diagnóstico de radiologia veterinária. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p.194-209.
7. Santini G, Mazzanti A, Beckmann DV, Santos RP, Pelizzari C, Polidoro D, et al. Doença do disco intervertebral cervical em cães: 28 casos (2003-2008). *Pesqui Vet Bras*. 2010;30:659-64.
8. Ferreira MMG, Avante MP, Rosa BRT, Martins IS, Zangirolami Filho D, Benedette MF. Discopatia toracolombar. *Rev Cient Eletronica Med Vet*. 2008;6:1-5.
9. Schroeder R, Pelsue DH, Park RD, Gasso D, Bruecker KA. Contrast-enhanced CT for localizing compressive thoracolumbar intervertebral disc extrusion. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2011;47:203-9.
10. Robertson I, Thrall DE. Imaging dogs with suspected disc herniation: pros and cons of myelography, computed tomography, and magnetic resonance. *Vet Radiol Ultrasound*. 2011;52:81-4.
11. Lubbe AM, Kirberger RM, Verstraete FJM. Pediculectomy for thoracolumbar spinal decompression in the dachshund. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1994;30:233-8.
12. Janssens LA. Acupuncture for the treatment of thoracolumbar and cervical disc disease in the dog. *Probl Vet Med*. 1992;4:107-16.

13. Ferreira AJA, Correia JHD. Thoracolumbar disc disease in 71 paraplegic dogs: influence of rate of onset and duration of clinical signs on treatment results. *J Small Anim Pract.* 2002;43:158-63.
14. Kathmann I, Cizinauskas S, Doherr MG, Steffen F, Jaggy A. Daily controlled physiotherapy increases survival time in dogs with suspected degenerative myelopathy. *J Vet Intern Med.* 2006;20:927-32.
15. Han H-J, Yoon H-Y, Kim J-Y, Jang H-Y, Lee B, Choi SH, et al. Clinical effect of additional electroacupuncture on thoracolumbar intervertebral disc herniation in 80 paraplegic dogs. *Am J Chin Med.* 2010;38:1015-25.
16. Joaquim JGF, Luna SPL, Brondani JT, Torelli SR, Rahal SC, Freitas FP. Comparison of decompressive surgery, electroacupuncture, and decompressive surgery followed by electroacupuncture for the treatment of dogs with intervertebral disk disease with long-standing severe neurologic deficits. *J Am Vet Med Assoc.* 2010;236:1225-9.
17. Han H-J, Kim J-Y, Jang H-Y, Lee B, Yoon J-H, Jang S-K, et al. Fluoroscopic-guided intradiscal oxygen-ozone injection therapy for thoracolumbar intervertebral disc herniations in dogs. *In Vivo.* 2007;21:609-14.
18. Ganey T, Libera J, Moos V, Alasevic O, Fritsch K-G, Meisel HJ, et al. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Spine.* 2003;28:2609-20.
19. Mai W. Magnetic resonance imaging and computed tomography features of canine and feline spinal cord disease. In: Thrall DE. *Textbook of veterinary diagnostic radiology.* 6a ed. St. Louis: Elsevier; 2013. p.194-204.
20. Weisbrode SE. Ossos e articulações. In: McGavin MD, Achary JF. *Bases da patologia em veterinária.* 4a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. p.1102-3.
21. Simpson TS. Intervertebral disc disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1992;22:889-97.
22. Costa RC. Spinal diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2010;40:859-69.
23. Chrisman CL. *Neurologia dos pequenos animais.* 1a ed. São Paulo: Roca; 1985.
24. Seiler G, Kinns J, Dennison S, Saunders J, Schwarz T. Vertebral column and spinal cord. In: Schwarz T, Saunders J. *Veterinary computed tomography.* Iowa: Wiley-Blackwell; 2011. p.223-4.
25. Fernández T, López M. Diagnóstico por imagen de la enfermedad discal intervertebral. *Rev AVEPA.* 2004;24:17-25.
26. Kevin KJ, McAllister H. *Radiologia e ultra-sonografia do cão e do gato.* 3a ed. Barueri: Manole; 2005.
27. Ayres S. Special imaging procedures. In: Ayres S. *Small animal radiographic techniques and positioning.* West Sussex: Wiley Blackwell; 2012. p.233-6.

28. Lamb CR. Common difficulties with myelographic diagnosis of acute intervertebral disc prolapse in the dog. *J Small Anim Pract.* 1994;35:549-58.
29. Farrow CS. *Veterinária: diagnóstico por imagem do cão e do gato.* 1a ed. São Paulo: Roca; 2005. p.251-305.
30. Braund KG. Moléstia do disco intervertebral. In: Bojrab JM. *Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais.* 2a ed. São Paulo: Manole; 1996. p.1104-16.
31. Brawner WR, Hathcock JT. Neurorradiologia. In: Slatter D. *Manual de cirurgia de pequenos animais.* 2a ed. São Paulo: Manole; 1998. v.1, p.459-60.
32. Lang J. Spine - lumbosacral region and cauda equine syndrome. In: Barr FJ, Kirberger RM. *BSAVA manual of canine and feline musculoskeletal imaging.* Dorset: Replika Press PVT; 2006. p.260-1.
33. Barthez PY, Morgan JP, Lipsitz D. Discography and epidurography for evaluation of the lumbosacral junction in dogs with cauda equine syndrome. *Vet Radiol Ultrasound.* 1994;35:152-7.
34. Kinns J, Malinowski R, McEvoy F, Scharz T, Zwingenberger A. Special software applications. In: Schwarz T, Saunders L. *Veterinary computed tomography.* West Sussex: John Wiley and Sons; 2011. p.70-1.
35. Gavin PR. Basic physics. In: Gavin PR, Bagley RS. *Practical small animal MRI.* Iowa: Wiley-Blackwell; 2009. p.4-7.
36. Elliott I, Skerritt G. Using MRI in clinical veterinary practice. In: Elliott I, Skerritt G. *Handbook of small animal MRI.* Iowa: Wiley-Blackwell; 2010. p.98-105.
37. Bagley RS, Gavin PR, Holmes SP. Veterinary clinical MRI: diagnosis of spinal disease. In: Gavin PR, Bagley RS. *Practical small animal MRI.* Iowa: Wiley-Blackwell; 2009. p.137-40.

**Recebido em: 11/12/2016**

**Aceito em: 25/02/2018**

## ESTUDO SOBRE AS DIFERENTES TÉCNICAS DE SEXAGEM DE ESPERMATOZOIDES

Caroline Scott<sup>1</sup>  
Fabiana Ferreira Souza<sup>2</sup>  
Gabriele Barros Mothé<sup>2</sup>  
Viviana Helena Vallejo Aristizabal<sup>2</sup>  
José Antonio Dell'Aqua Junior<sup>2</sup>

### RESUMO

O interesse na seleção de indivíduos de determinado sexo vem dos antigos gregos, mas o estudo sobre métodos eficazes desta seleção é relativamente novo. Saber qual será o sexo da futura prole traz ao mercado um grande potencial para o melhoramento genético, a seleção do sexo contribui na bovinocultura para a otimização de animais do sexo desejado, em humanos evitando doenças ligadas ao sexo, ou mesmo na seleção de sexo em animais selvagens de cativeiro. Com o advento das biotecnologias, como a inseminação artificial e transferência de embriões, a sexagem começa a ter relevância no cenário atual e o custo benefício passa a ser significativo. Várias técnicas foram desenvolvidas visando a melhor pré-seleção de sexo, tal como a imuno separação, gradiente de densidade, e a citometria de fluxo que, no atual cenário mundial, é a técnica com os melhores resultados e a única que permite a comercialização do sêmen sexado. Os processos de sexagem ainda demandam muitos estudos, devido aos danos causados aos espermatozoides durante o processo de separação, comprometendo os resultados de fertilidade. Essa revisão de literatura vem como uma ferramenta para o entendimento do processo de sexagem e as técnicas utilizadas.

**Palavras-chave:** bovinos, citometria de fluxo, gradiente de densidade, imuno-sexagem, sêmen sexado.

### STUDY OF DIFFERENT SPERMATOZOA SEXING TECHNIQUES

#### ABSTRACT

The interest in sex selection of a particular individuals comes from the ancient greeks, but the study on effective methods of this selection is relatively new. Know future progeny sex brings to market great potential for genetic improvement. Sex selection contributes to cattle for animal optimization of desired sex, to human, preventing diseases sex-linked, or even sex selection of wild animals in captivity. With the biotechnologies advent such as artificial insemination and embryo transfer, sexing begins to have relevance in current scenario and benefit costs will be significant. Several techniques have been developed aiming the best pre-selection of sex, such as immuno separation, density gradient, and flow cytometry that in current world scenario is the technique with best results and only one that allows comercialization of sexed semen. Sexing processes still require many studies due to damage to sperm cells during the separation process, compromising fertility results. This literature review comes as a tool for understanding the sexing process and techniques used.

**Key words:** bovine, density gradient, flow cytometry, imuno-sexing, sex sorted sperm

### ESTUDIO SOBRE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE SEXAJE DE ESPERMATOZOIDES

#### RESUMEN

---

<sup>1</sup> Discente do Programa de Doutorado no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ-UNESP-Botucatu.

<sup>2</sup> Departamento de Reprodução Animal. Universidade Estadual Paulista. Correspondência.

El interés en la selección de individuos de un determinado sexo data de la antigua Grecia; sin embargo, estudios sobre métodos eficaces para la selección espermática son relativamente nuevos. Saber cuál será el sexo de la futura progenie trae al mercado un gran potencial para el mejoramiento genético. Esta selección del sexo es realizada con diversos enfoques; en bovinos para la optimización de animales de sexo deseado, en humanos evitando enfermedades ligadas al sexo y en animales salvajes en cautiverio en la selección del sexo. Con el advenimiento de las tecnologías como la inseminación artificial y la transferencia de embriones, el sexaje comenzó a tener relevancia en el escenario actual y el costo beneficio pasó a ser significativo. Varias técnicas han sido desarrolladas con el objetivo de mejorarla la pre-selección del sexo, la inmunoseparación, gradientes de densidad y citometria de flujo son algunas de ellas, sin embargo, en la actualidad, la citometria de flujo es la técnica con mejores resultados y la única que permite comercialización de semen sexado. No obstante, el proceso de sexaje aun demanda muchos estudios, debido a los daños ocasionados a los espermatozoides durante el proceso de separación, comprometiendo las tasas de la fertilidad. Esta revisión de literatura viene como una herramienta para el entendimiento del proceso de sexaje y las técnicas utilizadas.

**Palabras clave:** bovinos, citometria de flujo, gradientes de densidad, inmuno-sexage, semen sexado

## INTRODUÇÃO

A venda de sêmen sexado vem crescendo no cenário da atual pecuária nacional, em 2011 já eram vendidas cerca de quase 12 milhões de doses de sêmen, e acredita-se que entre 600 a 800 mil doses são de espermatozoides sexados embora não há estatística para esse dado (1). A sexagem de espermatozoides visa à máxima produção com menor custo e a possibilidade de produzir doses inseminantes com espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y especificamente de acordo com a necessidade de cada programa de melhoramento genético (2). Na bovinocultura o uso do sêmen sexado tem, entre seus vários benefícios, a produção de maior número de machos para produção de touros reprodutores e estocagem de determinada unidade comercial e a produção de fêmeas para reposição ou aumento do rebanho (matrizes) (3).

Várias técnicas são descritas para a separação de espermatozoides X e Y, e todas estão em processo de adequação uma vez que ainda promovem danos irreparáveis aos espermatozoides e o seu DNA (2). De todas as técnicas já descritas, a citometria de fluxo é a única que permite a comercialização das doses sexadas devido aos 90% de acuidade já comprovada (4). A separação por gradiente de densidade é uma técnica promissora e assim como a citometria é baseada no maior peso do espermatozoide X dado pela maior quantidade de DNA (5). No que se refere à separação pelo método imunológico, é sabido que existem outras diferenças ainda que sutis entre os espermatozoides X e Y (6), porém essas diferenças podem ser essenciais no processo de separação espermática, como a presença do antígeno H-Y, encontrado nos espermatozoides portadores do cromossomo Y (7). Vários estudos sobre proteínas ligadas ao sexo vêm sendo desenvolvidos a fim de que se produza um método imunológico para sexagem de espermatozoides conforme o interesse do criador.

Os espermatozoides não podem perder seu poder fecundante e devem manter sua viabilidade após descongelação desta forma sêmen sexado deve ser compatível com a criopreservação mantendo o seu valor a um preço ajustado com a realidade do mercado. O aumento na procura pela inseminação artificial é que permite a sustentação de vendas de doses sexadas (2).

A tecnologia de sexagem de espermatozoides é relativamente nova, mas está em ascensão no mercado nacional e internacional. Dada a importância dessa biotecnologia para o desenvolvimento da pecuária nacional a presente revisão objetiva em um melhor conhecimento sobre a sexagem de espermatozoides bem como as técnicas utilizadas.

## Estratégias de separação dos espermatozoides X e Y

Scott C, Souza FF, Mothé GB, Aristizabal VH, Del'Aqua Junior JD. Estudo sobre as diferentes técnicas de sexagem de espermatozoides. Vet. e Zootec. 2018 mar.; 25(1): 21-29.

Durante muitos séculos mitos e estratégias foram desenvolvidos com o objetivo de selecionar o sexo desejado, segundo Rezende (8) algumas estratégias utilizadas foram: pH do sistema genital feminino em que o pH mais ácido favorece o nascimento de fêmeas; nutrição da mãe antes e durante a gestação com o consumo de determinado alimento ou nutriente específico predispõe ao nascimento de macho ou fêmea, como por exemplo, o consumo de gordura saturada favorece o nascimento de machos, ácidos graxos poli-insaturados, ômega 3 e ômega 6 e ácido ascórbico favorece o nascimento de fêmeas; concentração hormonal do macho e da fêmea no momento da cópula, a concentração de testosterona favorece o nascimento de machos. Momento da inseminação ou cópula em relação à ovulação: o nascimento de fêmeas pode ser favorecido quando a inseminação ou cópula ocorre próxima a ovulação. Essas entre outras estratégias foram utilizadas, porém não existem resultados palpáveis na literatura que comprovem esses métodos, tornando-os não eficazes no processo de pré-seleção do sexo.

Para a pré-seleção de sexo antes da concepção o único método eficaz é a separação de espermatozoides portadores do cromossomo X dos portadores do cromossomo Y (9). Para a bovinocultura essa seleção representa um grande potencial para o melhoramento genético e satisfação da demanda do mercado (10). Até a década de 80 não existia nenhum método efetivo da sexagem de espermatozoides (6).

Diversas especulações sobre as diferenças entre espermatozoides X e Y foram sugeridas, incluindo diferenças físicas como tamanho, peso, velocidade, densidade, motilidade, cargas elétricas superficiais, proteínas de superfície. Essas diferenças são tão sutis e praticamente impossíveis de mensurar, tornando os espermatozoides essencialmente idênticos nesse sentido (6).

Em 1910 aconteceu um grande marco com a descoberta dos cromossomos sexuais o que possibilitou a separação dos espermatozoides em X e Y (11). Inicialmente acreditava-se que o sexo era determinado apenas pelo cromossomo X, onde as fêmeas eram classificadas como XX e os machos X0, somente em 1914 descobriu-se que o sexo masculino estava associado ao cromossomo X e um outro que foi denominado Y (12). Estudos mostram que os espermatozoides com cromossomo X tem mais DNA que os espermatozoides com cromossomo Y (5), essa diferença pode chegar a 4% variando com as espécies (13).

Muito se deve pensar economicamente quanto ao uso do sêmen sexado, observando se o potencial reprodutivo do touro está sendo maximizado com o uso do sêmen sexado, e o custo da implantação da tecnologia, ou seja, custo benefício ao comprar uma dose sexada (3) já que a dose sexada é mais cara que a dose convencional (14), e a única tecnologia aceita para comercialização é a citometria.

As técnicas de separação por sexo vêm ganhando mercado devido ao maior conhecimento da fisiologia do sêmen e sua contribuição genética ao embrião (15). Ressalta-se que para o uso do sêmen sexado devem ser descartados os rebanhos que não alcançaram 60% de concepção para o sêmen convencional. Doses sexadas têm seu uso recomendado somente para primeiro e segundo uso da novilha, não é aconselhável utilizar sêmen de alto valor em terceiro uso (13), uma vez que a fertilidade com sêmen sexado é menor (14).

Outro problema do sêmen sexado é que as células espermáticas ficam mais sensíveis ao processo de criopreservação pelas injúrias causadas no processo de separação (16), como o estresse químico e físico sofrido no processo de sexagem usando o citômetro (17).

## Técnicas

Vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de descobrir a melhor forma de se obter crias com o sexo desejado. Para isso algumas tecnologias têm sido testadas nessa área incluindo a utilização de anticorpos específicos do gênero, centrifugação em gradiente de densidade, e citometria de fluxo (18). Estas técnicas ainda se encontram em processo de aperfeiçoamento para se adequarem à indústria do sêmen, uma vez que todas causam danos aos espermatozoides, ao seu

DNA, a motilidade, assim como a cinética espermática comprometendo o processo de fertilização (2,19).

### **Centrifugação em gradiente de densidade**

A centrifugação em gradiente de densidade é considerada uma metodologia simples (15). O processo se baseia na diferença de densidade entre os espermatozoides X e Y, uma vez que os espermatozoides X possuem mais DNA que os espermatozoides Y (5). Em um trabalho foram testados 13 diferentes gradientes de densidade, o sêmen foi depositado sobre os gradientes em um tubo que foi centrifugado em velocidade e tempo determinado segundo o protocolo. Após a centrifugação os espermatozoides foram separados em duas frações, o sobrenadante foi descartado e o sedimento das duas frações foi aspirado nos gradientes de oito e 12 camadas. Os espermatozoides recuperados foram 25% e 75% de Y e X, respectivamente (20).

Em um estudo a diferença entre o uso dos gradientes de albumina, PureSperm e albumina conjugada com PureSperm para separação dos espermatozoides X e Y não apresentaram resultados significativos (21). O uso de um gradiente de densidade de sacarose também mostrou resultados sem diferenças estatísticas para a separação do sexo, entretanto os autores afirmam que esse gradiente é uma ótima ferramenta e de baixo custo para esse fim, porém mais estudos são necessários (22). Tucker e Jansen (15) estudaram os métodos de centrifugação por gradiente de densidade e afirmaram que a centrifugação é o método mais eficiente, e que existem alternativas ao uso do Percoll ainda que com alto custo.

Sucessivas centrifugações causam danos às células espermáticas, desta forma, a diminuição no número de centrifugações diminui as injúrias causadas aos espermatozoides (23,24). Foi testado um novo gradiente composto de soluções isotônicas que permite que em uma única centrifugação haja separação de impurezas dos espermatozoides viáveis e esses ainda serem separados em X e Y. Uma pesquisa desenvolvida com separação de espermatozoides X e Y com gradiente de densidade Percoll revelou resultados positivos quanto ao uso da técnica uma vez que após a centrifugação houve a separação dos espermatozoides por sexo com acuidade de 75% e 25% de taxa de recuperação de espermatozoides, apesar de ser uma técnica com menor recuperação comparada a citometria de fluxo o gradiente de densidade é um processo mais rápido e com maior porcentagem de motilidade (20).

### **Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é um método capaz de estimar conteúdo de DNA do espermatozoide e separá-lo em X ou Y. É uma técnica eficaz em várias espécies de mamíferos para sêmen fresco e criopreservado (25).

Inicialmente foi usada para muitos propósitos especialmente para diagnóstico de câncer, uma vez que o DNA poderia ser um indicador sensível de eventos mutagênicos. O uso na sexagem de espermatozoides é mais recente (26) e se tornou o único método comprovado para separação por sexo. Foi usado pela primeira vez na década de 80 para esse fim, mas com pouco sucesso pois havia separação dos espermatozoides X e Y, porém promovia a morte celular e, por este motivo, um novo sistema foi desenvolvido, modificando o citômetro em alguns aspectos levando ao sucesso da técnica com poucos danos aos espermatozoides (18,27). Após a década de 80 ocorreu um grande avanço na citometria e várias gestações do sexo determinado em espécies diferentes foram obtidas, desde então vem sendo usada no cenário atual com bastante sucesso (13).

Partindo do princípio que as células X e Y possuem conteúdo de DNA total diferentes, variando na média de 3 a 4% entre as espécies, no touro varia de 3,7 – 4,44% (4) O citômetro de fluxo ao ser calibrado consegue separar as células com mais de 90% de pureza, pois detecta essas diferenças (4,13)

Garner (28) cita que em diferentes mamíferos além da diferença do conteúdo de DNA existe a diferença na capacidade de orientação dos gametas no momento da classificação pelo citômetro. Os

Scott C, Souza FF, Mothé GB, Aristizabal VH, Del'Aqua Junior JD. Estudo sobre as diferentes técnicas de sexagem de espermatozoides. Vet. e Zootec. 2018 mar.; 25(1): 21-29.

espermatozoides com cabeça mais achatada e oval tendem a ser mais hidrodinâmicos que aqueles com cabeça mais arredondada ou angular, e os espermatozoides de touros são os mais fáceis de serem sexados pelo citômetro, pois dentre as espécies estudadas são os que possuem a maior área de cabeça. De acordo com o descrito por Johnson e Welch (26), não há diferenças na velocidade de deslocamento entre os espermatozoides X e Y de bovinos respondendo a uma controvérsia que existia há mais de 25 anos a esse respeito quando estudos foram feitos com espermatozoides de humanos.

A separação se faz por meio do uso de uma sonda fluorescente com especificidade para DNA, e após essa marcação a separação ocorre de acordo com a intensidade da fluorescência (26). Para a separação por citometria de fluxo a sonda utilizada é o Hoechst 33342 penetra na célula espermática íntegra e se liga ao DNA, como o espermatozoide X possui uma maior porcentagem de DNA em relação ao Y é mais marcado, assim, quando são excitadas pelo laser, emitem uma maior intensidade de fluorescência que os espermatozoides Y, essa diferença é detectada pelos filtros fotomultiplicadores e analisada pelo computador (29).

Os espermatozoides são analisados via computador e os com o cromossomo X recebem uma carga positiva, os com cromossomo Y recebem uma carga negativa, os indistinguíveis ou danificados não recebem nenhuma carga. A gotícula que sai em alta velocidade pelo bico do citômetro passa por um campo elétrico e os espermatozoides são atraídos, os X com carga positiva são atraídos pelo campo negativo, e os Y com carga negativa são atraídos pelo campo positivo, os que não possuem carga prosseguem sem serem atraídos para campo algum, dessa forma são produzidos três fluxos que são recolhidos por tubos coletores (29).

Apesar de ser a melhor técnica desenvolvida até hoje, passam por segundo pelo citômetro de fluxo cerca de 3 a 5 mil espermatozoides, sendo necessárias 1,3 horas para separar sêmen suficiente para uma palheta de 20 milhões, além disso, apenas cerca de 30% das células são orientadas, ou seja, somente 15% de cada sexo. Devido a esse lento processo a comercialização só é possível em uma concentração menor por palheta (dois milhões), somado a isso tem o alto custo do citômetro e a necessidade de profissionais qualificados, tornando o custo do sêmen sexado elevado. Além desses fatores, esses espermatozoides tem viabilidade comprometida, dessa forma recomenda-se que esse sêmen seja utilizado em rebanhos bem manejado e novilhas férteis com alta taxa de concepção (13,30).

### **Utilização de anticorpos específicos do gênero**

Pela identificação de uma proteína sexo-específica na membrana plasmática dos espermatozoides X e Y e a partir do desenvolvimento de um ou mais anticorpos antiproteína X ou antiproteína Y foi possível criar um método imunológico de sexagem de espermatozoides, (31,32). Esse método possui várias vantagens como o baixo custo no processamento, técnica menos invasiva ao espermatozoide e não oferece limitações na produção espermática (33).

Várias publicações e patentes sugerem que é possível a sexagem de espermatozoides pela produção de anticorpos, que determinam proteínas de membrana sexo específicas. Ainda, que os estudos sejam iniciais os resultados já obtidos foram conclusivos. Foi detectada a expressão de 14 proteínas diferentes entre X e Y, essas proteínas afetam energia, metabolismo estresse, resistência, composição do citoesqueleto, entre outros fatores nos espermatozoides. (34)

O antígeno de membrana H-Y foi descrito em 1955 por Eichwald e Silmsner ao verificarem que havia rejeição quando pele de rato macho era transplantado para uma fêmea, entretanto quando o procedimento foi realizado ao contrário fêmea/macho a rejeição não era observada. Nos estudos de Bradley et al. (35) foi detectada a expressão do antígeno H-Y na membrana plasmática de espermatozoides de carneiros por várias abordagens diferentes. No teste de ELISA foi observado que o antígeno H-Y é muito sensível e com boa especificidade, a análise de Western blot revelou que a membrana plasmática flagelar contém uma proteína sexo-específica masculina com peso molecular de aproximadamente 25.000 kDa.

Em um trabalho com suínos utilizando anticorpos policlonais observou a elevada afinidade com os espermatozoides o que levou a uma cessação da motilidade, a maioria dos espermatozoides não móveis tinham o cromossomo Y, concluindo que o uso de antígenos policlonais contra H-Y pode ser um meio simples e barato de sexagem uma vez que a redução da motilidade dos espermatozoides reduz a habilidade de fertilização (36).

Pesquisadores desenvolveram anticorpos policlonais em ovinos, e relataram que ocorreu somente no macho uma reação contra uma proteína originária de tecido (32). Blecher, (37) registrou em patente (US 5,840,504; 24/11/1998) as proteínas sexo específicas denominadas SSP (Sex Specific Protein) e o desenvolvimento de um método na sexagem imunológica. O método se baseia na incubação de espermatozoides bovinos com anticorpos antiproteína X previamente identificados, isolados e purificados por cromatografia de coluna. Após a incubação houve 50% de aglutinação dos espermatozoides, as que não sofreram aglutinação produziram *in vitro* 92% embriões do sexo masculino confirmado pela sexagem por citogenética. Não foi relatado se a incubação de espermatozoides com anticorpos antiproteínas específicas do sexo masculino também promoveu o desvio da proporção sexual em favor do sexo feminino.

Existem trabalhos e patentes que discutem o uso de anticorpos sexo específicos, mas nenhum deles ainda mostrou um resultado consistente (38). No que se refere à utilização prática da seleção do sexo por métodos imunológicos permanece a limitação da necessidade de mais investigações, utilizando técnicas de identificação de proteínas mais sensíveis, a fim de produzir um anticorpo específico do espermatozoide X ou Y.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sexagem de espermatozoides vem ganhando grande relevância no atual mercado da bovinocultura, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas a fim de que maior quantidade de espermatozoides possam ser sexados em menor tempo.

Das técnicas conhecidas a única que permite a comercialização das doses sexadas é a citometria de fluxo que apesar de propiciar 90% de separação ainda existem 10 % de erro o que torna necessários mais estudos envolvendo a técnica. A centrifugação por gradiente de densidade apresenta resultados promissores e apesar da motilidade final ser boa, ainda não tem uma acurácia relevante para o mercado. O método de sexagem por anticorpos está apenas no início, e apesar dos vários estudos no mundo todo a esse respeito ainda existem questionamentos sobre a viabilidade da técnica.

O conhecimento que já existe a respeito do assunto mostra a grande importância da sexagem de espermatozoides, tanto para doses frescas como doses criopreservadas, levando a uma expansão do mercado e das biotécnicas utilizadas na reprodução animal.

## AGRADECIMENTO

Entidade financiadora FAPESP.

## REFERÊNCIAS

1. MilkPoint. ASBIA comemora forte crescimento em 2011 [Internet]. Piracicaba: MilkPoint; 2016 [cited 2011 Sept 15]. Available from: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/asbia-comemora-forte-crescimento-em-2011-77880n.aspx>.
2. Lima VFMH. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. *Rev Bras Zootec*. 2007;36:219-28.

3. Pace MM. Implications of Sexed Semen on the Beef Industry. In: Proceedings of 39th Annual Florida Beef Cattle Short Course; 1990; Gainesville, FL. Gainesville: University of Florida; 1990. p.238.
4. Sharpe JC, Evans KM. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology*. 2009;71:4-10.
5. Sumner AT, Robinson JA. A difference in dry mass between the heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1976;48:9-15.
6. Garner DL, Seidel Jr GE. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*. 2008;69:886-95.
7. Eichwald EJ, Silmsler CR. Untitled communication. *Transplant Bull*. 1955;2:148-9.
8. Rezende VM. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade contínuo de percoll e optiprep [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista; 2007.
9. Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate RDE, Graaf SP, Eriksson BM, et al. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci*. 2004;82:79-95.
10. Parati K, Bongioni G, Aleandri R, Galli A. Sex ratio determination in bovine semen: a new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology*. 2006;66:2202-9.
11. Seidel Jr GE, Garner DL. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 2002;124:733-43.
12. Medalha AG. Sêmen sexado [monografia]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2008.
13. De Jarnette M. Sêmen sexado: uma realidade. 2012 [cited 2012 Jun 24]. Available from: <http://www.semeia.com.br/site/artigo.php?ID=94&IDC=3&PHPSESSID=7779520d1346c3e53f0e3cb2030804a8>.
14. De Vries A, Overton M, Fetrow J, Leslie K, Eicker S, Rogers G. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *J Dairy Sci*. 2008;91:847-56.
15. Tucker K, Jansen CAM. Sperm separation techniques: comparison and evaluation of gradient products. In: Proceedings of 2nd International Workshop for Embryologists: Troubleshooting Activities in the ART lab; 2002.
16. Hollinshead FK, Gillan L, O'Brien JK, Evans G, Maxwell LWM. In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reprod Fertil Dev*. 2003;15:351-9.
17. Seidel Jr GE. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology*. 2003;59:585-98.
18. Fetrow J, Overton M, Eicker S. Sexed Semen: economics of a new technology. In: Western Dairy Management Conference; 2007; Reno. Reno: Western Dairy Management Conference; 2007. p.1-24.

19. Carvalho JO, Sartori R, Lemes AP, Mourão GB, Dode MAN. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. *Pesqui Agropecu Bras.* 2009;44:1346-51.
20. Lima VFMH, Moreira Filho CA, Lucio AC, Resende MV. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll. *Rev Bras Zootec.* 2011;40:1680-5.
21. Esmaeilpour T, Elyasi L, Bahmanpour S, Ghannadi A, Monabbati A, Dehghani F, et al. Effect of combined density gradient centrifugation on X- and Y- sperm separation and chromatin integrity. *Iran J Reprod Med.* 2012;10:435-40.
22. Kanesharatnam N, Eswaramohan T, Balasubramaniam K. A Preliminary study for sperm sexing by using sucrose density gradients in jersey bull at artificial insemination centre at thirunelvely (northern province of Sri Lanka). In: *Proceedings of International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics; 2012; Singapura. Singapura: ICBBB; 2012. p.37-40.*
23. Lima VFMH, Moreira Filho CA, Ramalho MFPDT. Processo de seleção do sexo de espermatozoides mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de sêmen sexado congelado. BR PI 0300604-2. 17 Jun 2003.
24. Lima VFMH. Espermatozoide sexado bovino: quando utilizá-lo? *Acta Sci Vet.* 2006;34:213-24.
25. Pinkel D, Garner ADL, Gledhill BL, Lake S, Stephenson D, Johnson LA. Flow cytometric determination of the proportions of x- and y-chromosome-bearing sperm in samples of purportedly separated bull sperm. *J Anim Sci.* 1985;60:1303-7.
26. Johnson LA, Welch GR. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of x and y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology.* 1999;52:1323-41.
27. Johnson LA, Pinkel, D. Modification of a laser-based flow cytometer for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry.* 1986;7:268-73.
28. Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology.* 2006;65:943-57.
29. Seidel Jr GE. Overview of sexing sperm. *Theriogenology.* 2007;68:443-6.
30. Bondan JA. Sêmen sexado, finalmente é uma realidade? [Internet]. 2012 [cited 2012 Apr 10]. Available from: <http://www.semeia.com.br/site/artigo.php?ID=60&IDC=1&PHPSESSID=8b33be216ebb66096488ec39a6ba5014>.
31. Hendriksen PJM. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? *Theriogenology.* 1999;52:1295-308.
32. Van Tilburg MF, Machado OLT, Silva JFS, Matta CGF, Fagundes B, Matta MFR. Identificação de antígeno macho-específico de ovino. *Rev Port Cienc Vet.* 2006;101:231-3.
33. Kupradit C, Ketudat Cairns M. The extraction and purification of boar sperm surface protein. *J Sci Technol.* 2009;16:245-351.

34. Chen X, Zhu H, Wu C, Han W, Hao H, Zhao X, et al. Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa. *J Proteomics*. 2012;77:59-67.
35. Bradley MP, Forrester IT, Heslop BF. Identification of a male-specific (H-Y) antigen on the flagellar plasma membrane of ram epididymal spermatozoa. *Hum Genet*. 1987;75:362-7.
36. Mohammadi AA, Tetro JA, Fillion LG. Epitope selection to male specific antigens for sex selection in swine. *J Reprod Immunol*. 2011;89:46-54.
37. Blecher SR, Howie SL, Detmar J, Blahut LM. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology*. 1999;52:1309-21.
38. Blecher SR. Method for separating sex specific molecules and non-sex specific molecules. United States patent US 5,840,504. 1998 Nov 24.

**Recebido em: 31/08/2016**

**Aceito em: 06/02/2018**

## CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE: ALTERNATIVA PARA SEXAGEM ESPERMÁTICA EM CÃES?

Gabriele Barros Mothé<sup>1</sup>  
Caroline Scott<sup>2</sup>  
Fabiana Ferreira de Souza<sup>3</sup>

### RESUMO

A evolução das técnicas de sexagem espermática nos últimos anos permitiu avanços significativos, mas ainda nenhum método foi empregado com sucesso na espécie canina. Apesar da citometria de fluxo ser um método eficiente para sexagem espermática, nos cães pode ser considerada de difícil aplicação, em vista do alto custo da aplicação da técnica e da baixa recuperação espermática após a separação. Em contrapartida, a centrifugação em gradiente de densidade também pode ser utilizada para separação espermática em cães. Essa técnica também se baseia na diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y. A separação espermática pode ser confirmada por diferentes métodos, como citometria de fluxo, hibridização *in situ* fluorescente (FISH), coloração com quinacrina mostarda e PCR. Objetivou-se, com esta revisão abordar a centrifugação em gradiente de densidade como uma alternativa a sexagem espermática em cães.

**Palavras-chave:** Cão, centrifugação, cromossomos X e Y, sêmen sexado, separação espermática.

### DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION: ALTERNATIVE FOR SEXING SPERM IN DOGS?

### ABSTRACT

The technical progress concerning sperm sexing in recent years has enabled significant advances, but still none method was used successfully in dogs. Despite the flow cytometry to be an effective method for sperm sexing, in dogs it can be considered difficult to implement in view of high cost of application of the technique and low sperm recovery after separation. In contrast, density gradient centrifugation can also be used for separating sperm in dogs. This technique is also based on the DNA content difference between sperm with chromosomes X and Y. Sperm separation can be confirmed by various methods such as flow cytometry, fluorescence in situ hybridization (FISH) staining with quinacrine mustard and PCR. The objective of this review to address the density gradient centrifugation as an alternative to sperm sexing in dogs.

**Keywords:** Dog, centrifugation, chromosomes X and Y, sexed semen, sperm separation.

<sup>1</sup> Discente de Pós-Graduação no Programa de Residência em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

<sup>2</sup> Discente do Programa de Doutorado no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ-UNESP-Botucatu.

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP-Botucatu.

## CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD: ALTERNATIVA PARA SEXAR ESPERMATOZOIDEOS CANINOS

### RESUMEN

La evolución de técnicas para la separación del sexo de espermatozoides en los últimos años ha permitido avances significativos, pero todavía no hay método que ha sido utilizado con éxito en perros. Apesar de la citometría de flujo ser un método eficaz para el sexado de espermatozoides, en perros puede ser considerado difícil de implementar en vista del alto costo de la aplicación de técnica y la recuperación baja de espermatozoides después de la separación. En contraste, la centrifugación en gradiente de densidad también puede ser utilizada para la separación de espermatozoides en los perros. Esta técnica también se basa en la diferencia de contenido en DNA entre los espermatozoides portadores de los cromosomas X e Y. Separación de espermatozoides puede ser confirmada por diversos métodos tales como citometría de flujo, hibridación in situ fluorescente (FISH), coloración con quinacrina mostaza y PCR. El objetivo de esta revisión es abordar el centrifugación en gradiente de densidad como alternativa a la separación del sexo de espermatozoides en los perros.

**Palabras clave:** Perro, centrifugación, cromosomas X e Y, semen sexado, separación de espermatozoides.

### INTRODUÇÃO

O interesse pelas biotecnologias reprodutivas na medicina veterinária tem crescido substancialmente. Dentre estas, a sexagem espermática tem grande destaque na produção animal. Apesar disso, há poucos estudos na espécie canina, embora haja interesse de criadores por uma progênie de sexo pré-determinado, que dependendo da demanda do mercado por fêmeas ou machos, favoreça a venda e resulte em maior ganho econômico.

Em outras espécies, especialmente em bovinos, várias técnicas já foram testadas para promover a sexagem, baseadas em diferenças entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y. Entretanto, a separação espermática baseada nessa diferença do conteúdo de DNA é a única validada (1) e as duas técnicas que se fundamentam nisto são a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade (2,3).

O sêmen sexado contempla células separadas para conter uma amostra que produzirá uma prole masculina ou feminina para atender às exigências dos criadores de acordo com a necessidade de produção ou do mercado (4). Uma vez que seleciona animais com aptidões específicas, que pode ser favorecida por uma progênie de sexo pré-determinado, a sexagem espermática beneficia o manejo e a eficiência reprodutiva (5) e maximiza o progresso genético entre gerações (6).

Além do ponto de vista zootécnico, a sexagem espermática também tem importância na reprodução humana assistida e em animais ameaçados de extinção (6,7), utilizando animais domésticos como modelo experimental (8). Recentemente, o sêmen sexado foi empregado em golfinhos para aumentar o número de fêmeas em cativeiro e permitir a reprodução dessa espécie (9).

O esperado é que a proporção natural de machos e fêmeas em uma progênie ou rebanho seja de, aproximadamente, 1:1 (10). O emprego do sêmen sexado permite produzir uma proporção ideal de machos e fêmeas, obter descendentes de animais superiores, elevando em 15% o ganho genético comparado ao sêmen convencional (2,11).

A utilização de citometria de fluxo para sexagem espermática tem sido amplamente difundida, devido a sua alta repetibilidade e acuidade, acima de 90% (11,12). No entanto, sua execução demanda equipamentos sofisticados, é muito dispendiosa e tem demonstrado diminuir a fertilidade dos espermatozoides, em vista dos danos causados pela técnica (3,7).

Apesar de ainda não possuir repetibilidade e reprodutibilidade que a torne uma técnica confiável e segura, uma alternativa é a centrifugação em gradiente de densidade devido à

simplicidade de execução e por não exigir grandes investimentos em equipamentos (6,13).

Todavia, mais estudos são necessários, especialmente em cães, que são múltiparos e o maior número de descendentes de determinado sexo pode facilitar o mercado, independentemente se os resultados sejam inferiores aos da citometria de fluxo.

Portanto, esta revisão tem como objetivo abordar a centrifugação em gradiente de densidade como uma opção às diferentes técnicas de sexagem espermática em diferentes espécies, mas que ainda não têm sido empregadas com sucesso na espécie canina.

### Diferenças entre os espermatozoides com o cromossomo X e Y

A separação dos espermatozoides visando a sexagem deve ser baseada em pelo menos uma diferença entre as células, como a sensibilidade ao pH, a carga elétrica da superfície da membrana, a velocidade de migração e antígenos de superfície. Porém, apesar das várias técnicas descritas para a separação espermática, somente aquelas que se baseiam na diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y são comprovadas cientificamente *in vitro* e *in vivo* (2,3).

Os espermatozoides são células haploides e contêm cromossomos autossômicos e cromossomos sexuais X ou Y que determinam o sexo. Em bovinos a sexagem espermática é baseada na maior quantidade (em média 3,80%, com variação racial entre 4,24% a 3,73%) de DNA do cromossomo X. Esta diferença varia entre as espécies, sendo que nos cães está em torno de 3,90% (3). Entretanto, diferenças raciais nos cães ainda não foram estudadas. Apesar de ser considerada uma diferença pequena, é possível mensurar o conteúdo de DNA de cada um dos espermatozoides e diferenciá-los em X e Y (7). Para tal, duas técnicas podem ser usadas, a citometria de fluxo e a centrifugação em gradiente de densidade (6,7).

### Centrifugação em gradiente de densidade

O gradiente de densidade envolve um processo de centrifugação baseada na diferença de conteúdo de DNA entre os dois cromossomos (14).

Em bovinos, acredita-se que essa diferença seja de  $7 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$  ou 0,06% (15,16) e por ser mínima, a sexagem só é possível com a utilização de gradientes com alta resolução de densidade (15).

Os gradientes de densidade podem ser de dois tipos, contínuos ou descontínuos. Nos contínuos, a densidade do gradiente aumenta da parte superior até a parte inferior, não sendo observadas diferenças entre as camadas; e nos descontínuos, as camadas são observadas e a mais densa fica na parte inferior do tubo, diminuindo gradativamente até a parte superior (17).

A centrifugação em gradiente pode ser realizada com diferentes concentrações de 2 a 12 camadas (18,19,20), utilizando-se vários tipos de meios, como albumina sérica, Ficoll, Ficoll-metrizoato de sódio, Percoll<sup>®</sup> isoladamente ou associado a outros gradientes, como OptiPrep, IxaPrep e Nycoprep<sup>®</sup> (21-25).

O Ficoll é uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade associado ao metrizoato de sódio (21). O OptiPrep é um componente iodinado não iônico, estéril e não tóxico, desenvolvido para estudos radiográficos (26). Em vista da sua maior densidade, o OptiPrep é mais vantajoso na separação de organelas subcelulares quando comparado ao Percoll<sup>®</sup> (26).

O gradiente de albumina sérica bovina já foi utilizado em humanos para obter amostra enriquecida com espermatozoides portadores do cromossomo Y, resultando em um aumento de 63% (27).

Contrariamente, gradientes descontínuos de albumina sérica humana (ASH), contendo 2 (10,0 e 20,0% de ASH) ou 3 camadas (7,5%, 12,5% e 20,0% de ASH) já foram utilizados para separação de espermatozoides em homens e resultaram em mais células portadoras do cromossomo X (aproximadamente 52%) (13).

O Percoll<sup>®</sup> é o mais estudado em animais por separar maior quantidade de espermatozoides

com cromossomo X. É composto por sílica coloidal recoberta por polivinilpirrolidona (PVP) e é amplamente utilizado para formação de gradiente, para separação de células, vírus e outras partículas (28). Apesar disso, o Percoll<sup>®</sup> pode contaminar e afetar a qualidade da coloração com quinacrina, a qual é utilizada para determinar a quantidade de espermatozoides contendo os cromossomos X e Y. Uma alternativa é a utilização de Ficoll como meio de lavagem para retirada dos resíduos do Percoll<sup>®</sup> (22).

Em 1987, Lizuka et al. (29) descreveram a acuidade de 94%, na separação de espermatozoides humanos, utilizando a centrifugação em um gradiente de 12 camadas de Percoll<sup>®</sup> e o método de confirmação do enriquecimento foi a quinacrina. Posteriormente, voluntárias inseminadas engravidaram de bebês do sexo feminino, sem anormalidades. Em 1994, Wang et al. (13) reavaliaram o método descrito por Lizuka et al. (29), utilizando o método de confirmação da separação por hibridização *in situ* (FISH). Estes autores verificaram que a porcentagem de células espermáticas contendo cromossomos X, não ultrapassou os 57,2%, demonstrando que a quinacrina não é um método confiável para avaliar o processo de sexagem.

Blotner et al. (30) testaram a sexagem espermática de bovinos pela centrifugação em gradiente contendo 10 camadas de Percoll<sup>®</sup>, com concentrações variando entre 22% a 48%. Estes autores demonstraram enriquecimento de 75% de espermatozoides contendo cromossomos X na última fração do gradiente, confirmado por FISH e nenhuma alteração na morfologia dessas células, mantendo a sua viabilidade.

A centrifugação em gradiente de Percoll<sup>®</sup> foi comparada ao método *Swin-up* (migração espermática) modificado e demonstrou que o primeiro deve ser o de escolha para enriquecimento de X e o segundo para o enriquecimento de Y (31). Além disso, as células colhidas no fundo do tubo (Percoll<sup>®</sup> 85%) também contém mais X do que aquelas colhidas na superfície que contém mais Y. Quando foi utilizado um gradiente de Percoll<sup>®</sup> em oito camadas, a motilidade dos espermatozoides contendo o cromossomo X foi aumentada em três vezes (32), o que também pode contribuir para o maior número de fêmeas nascidas.

Samura et al. (33) também compararam o Percoll<sup>®</sup> e *Swin-up*, além do *Glass wool* (que é a separação em lã de vidro), e não observaram diferença significativa em relação a motilidade dos espermatozoides X e Y nos 3 métodos, apenas um aumento sutil da motilidade de X e diminuição de Y quando utilizado o gradiente de Percoll<sup>®</sup>. No entanto, nenhum desses métodos foi eficaz para a sexagem espermática.

Apesar dos resultados contraditórios a respeito do gradiente de densidade de Percoll<sup>®</sup>, a capacidade de rolamento dos espermatozoides contendo o cromossomo Y é reduzida, com redução da fertilidade, resultando em aumento do número de fêmeas geradas pela amostra (34).

A associação do gradiente de Percoll<sup>®</sup> contendo 7 densidades e NycoPrep<sup>®</sup> com diferentes concentrações foi capaz de separar amostras contendo 94% de espermatozoides humanos com cromossomos X, confirmadas por FISH. Os autores concluíram que os resultados poderiam ser comparados à separação por citometria de fluxo (23).

Em humanos, apesar dos resultados satisfatórios, tanto na sexagem, quanto na separação de espermatozoides viáveis para procedimentos como a IA e a PIV, o uso de Percoll<sup>®</sup> foi proibido devido aos relatos de endometrite em mulheres que foram inseminadas com sêmen previamente tratado em gradientes compostos por meios coloidais, contendo sílica (35), mas em animais não há relatos semelhantes.

A associação de Percoll<sup>®</sup> e OptiPrep<sup>®</sup> mostrou resultados satisfatórios quanto ao desvio da proporção sexual e repetibilidade da técnica, além de não comprometer a fertilidade dos espermatozoides, mantendo-os viáveis à inseminação artificial (36). Além disso, o IxaPrep (polissacarose e iodixanol) é outra alternativa e surgiu em 1996 para substituir o Percoll<sup>®</sup> e evitar seus efeitos tóxicos sobre os espermatozoides (24), mas ainda hoje também não é utilizado comercialmente.

Em bovinos, o gradiente de Percoll<sup>®</sup> em 12 camadas, apresentou acuidade média de 70% e pureza de 81%, aliada a manutenção da capacidade fertilizante das células sexadas, isto é, sem alterações significativas em relação ao sêmen não-sexado. A IA com o sêmen sexado por este

método resultou em uma taxa de gestação de 75%, acuidade de 65 a 70%, e taxa de nascimento de fêmeas de 70,7%, utilizando sêmen fresco. Mas o enriquecimento dos espermatozoides contendo cromossomo X ou Y foi confirmado pela coloração com quinacrina mostarda (19), o que conforme Check et al. (18) não é um método seguro de validação da sexagem.

Houve taxa de 80% de espermatozoides bovinos contendo o cromossomo X no sedimento utilizando gradiente de Percoll<sup>®</sup> com 8 camadas, os resultados foram relacionados a maior motilidade dos espermatozoides contendo o cromossomo X antes da centrifugação, o que favoreceu a sua sedimentação (37). Fato este que não foi confirmado por Lima (36), uma vez que as amostras que apresentaram maior motilidade antes da centrifugação não foram as mesmas que tiveram maior concentração de espermatozoides contendo o cromossomo X.

Resultados positivos também foram observados na utilização de gradientes de densidade com OptiPrep, que pode ser uma alternativa ao Percoll<sup>®</sup>, uma vez que as amostras de sêmen centrifugadas neste gradiente e utilizadas na inseminação artificial de vacas não demonstraram alterações na fertilidade, resultando em taxa de prenhez de 80% (36). No entanto, estudos posteriores afirmaram que o Percoll<sup>®</sup> como substância formadora de gradiente de densidade tem vantagens quando comparado ao OptiPrep em relação a repetibilidade da técnica, sendo considerado mais confiável (25,38).

Acredita-se que a criopreservação possa alterar a separação das células utilizando este método, já que amostras de sêmen não-sexado descongelados, quando submetidas à centrifugação em gradiente de densidade de Percoll<sup>®</sup>, apresentaram menor acuidade de separação dos espermatozoides X (em torno de 60 a 65%), quando comparadas as amostras de sêmen fresco (25,38).

Até o momento, os gradientes contendo entre 8 e 12 camadas de Percoll separaram mais espermatozoides com cromossomos X, com acuidade de 75%, provavelmente devido a maior densidade e número de camadas, respectivamente. A coloração com quinacrina foi o método utilizado para confirmar a taxa de enriquecimento de X e há uma patente depositada no Brasil descrevendo a metodologia (6,19).

Em cães, o método de centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll<sup>®</sup>, na maioria dos estudos, foi descrito para separação de contaminantes celulares do ejaculado, como hemácias e células inflamatórias. Amostras preparadas sobre gradiente de Percoll<sup>®</sup>, nas concentrações de 45 e 90%, e centrifugadas a 400xg por 20 minutos, mantiveram a motilidade espermática e apresentaram considerável taxa de recuperação dos espermatozoides, mas não foi eficaz em separar as células dos contaminantes (39).

Silva (40), utilizando a centrifugação em gradiente de Percoll<sup>®</sup> nas concentrações 90, 85 e 80%, a 560xg, por 30 minutos, reportou diminuição na qualidade espermática, especialmente a motilidade ( $85,3\% \pm 8,3$  versus  $40,6\% \pm 22,6$ ,  $p < 0,001$ ), vigor ( $4,5 \pm 0,6$  versus  $2,2 \pm 1,1$ ,  $p < 0,001$ ) e concentração espermática ( $133,3 \pm 62,6 \times 10^6$  versus  $15,3 \pm 10,1 \times 10^6$  espermatozoides,  $p < 0,001$ ), mas sem alterar a integridade da membrana ( $80,8 \pm 8,9$  versus  $80,9 \pm 9,5\%$ ,  $p = 0,95$ ) e a porcentagem de células morfológicamente normais ( $66,2 \pm 12,9$  versus  $69,5 \pm 14,5\%$ ,  $p = 0,19$ ). No entanto, a taxa de enriquecimento dos espermatozoides contendo o cromossomo X não foi suficientemente alta para sua aplicação comercial, identificando média de 41,2% de X e 58,8% de Y pré-centrifugação e um aumento ( $p = 0,019$ ) na proporção de X/Y após a centrifugação (49,3% de X e 50,7% de Y) (40).

Apesar da centrifugação em gradiente de densidade apresentar resultados divergentes e diferentes protocolos, sua utilização é segura, simples e de baixo custo, e para que seja aplicada comercialmente necessita de adaptações e repetibilidade que confirme a sua eficácia. Ademais, embora haja descrições de aproximadamente 70% de nascimentos de fêmeas bovinas após o emprego da técnica, essa taxa ainda é considerada baixa, visto que há a possibilidade de 30% de nascimento de machos, em uma espécie unípara. No entanto, cães são múltiparos, e mesmo com o nascimento desta porcentagem de machos, a maioria da ninhada será de fêmeas, favorecendo o mercado, resultando em ganho econômico, já que na maioria das raças caninas, as fêmeas são mais valorizadas.

## Métodos de confirmação da sexagem espermática

Para a avaliação da porcentagem de espermatozoides X e Y em uma amostra e confirmação do enriquecimento de uma dessas células por uma determinada técnica de sexagem espermática, alguns métodos são utilizados como a própria citometria de fluxo, dessa vez para avaliar a ocorrência da separação, além da FISH, da coloração com quinacrina mostarda e da PCR.

### *Citometria de fluxo*

A validação por citometria de fluxo da separação espermática segue o mesmo princípio utilizado para a sexagem. Os cromossomos sexuais têm diferentes conteúdos de DNA e a fluorescência emitida por eles é proporcional a essa diferença. Os espermatozoides passam pelo citômetro de fluxo por uma fila única, em alta velocidade e pressão e recebem a incidência do feixe de laser. Aqueles que contem o cromossomo X emitem um sinal de fluorescência maior do que os que possuem o cromossomo Y, devido ao seu maior conteúdo de DNA (41), e desta maneira é possível determinar a pureza da amostra em relação ao enriquecimento.

### *FISH – Hibridização in situ por fluorescência*

A FISH é um método que identifica os cromossomos em qualquer tipo celular, de acordo com a sonda utilizada (37). Este método também utiliza um corante fluorescente, que é capaz de separar os espermatozoides contendo os cromossomos X e Y de acordo com a intensidade de fluorescência que emitem (2) ou a cor quando uma sonda dupla é usada. Este método identifica sequências gênicas pelo princípio da complementaridade de nucleotídeos do DNA e RNA a partir de sondas de DNA (37). A marcação específica no cromossomo é visualizada como pontos fluorescentes de cores diferentes e para a análise são utilizados sistemas computadorizados (42).

Essa técnica requer sondas moleculares de sequências completas de genes conhecidos ou fragmentos de DNA, que se ligam ao gene específico na amostra que está sendo analisada (42).

A FISH, por meio de suas diferentes sondas e princípio da complementariedade de nucleotídeos do DNA, tem sido utilizada principalmente em humanos e ruminantes. A exemplo disso, já foi utilizada para reavaliar o método de coloração com quinacrina na confirmação da sexagem espermática de humanos por centrifugação em gradiente de densidade, e demonstrou que essa coloração, descrita por Lizuka et al. (29), cuja acuidade havia sido reportada como 94%, não é confiável, uma vez que as células espermáticas contendo cromossomos X ao serem reavaliadas pelo método FISH tiveram porcentagem inferior a 57,2% (13).

Andersen e Byscov (23) e Blottner et al. (30) também utilizaram a FISH para confirmar o enriquecimento de espermatozoides contendo cromossomos X após sexagem pelo método de centrifugação em gradiente de densidade, e pelo método de gradientes de albumina, demonstrando que a técnica FISH é interessante como método de validação da sexagem espermática e pode ser considerada confiável (43).

A FISH pode apresentar vantagens em relação à reação em cadeia da polimerase (PCR) e a coloração com quinacrina, pois como utiliza sondas específicas de DNA dos cromossomos, os resultados são mais confiáveis; os espermatozoides são analisados individualmente e não em grupos; e vários espermatozoides podem ser marcados de forma rápida e precisa (42).

Porém, essa técnica ainda é muito trabalhosa e dispendiosa (43). Quando apenas uma sonda é utilizada, alguns espermatozoides exibem sinal de hibridização, mas há aqueles que não apresentam sinal algum, e então se pressupõe que estes são portadores do outro cromossomo. No entanto, essa suposição é inaceitável, uma vez que os espermatozoides podem não ser corados por várias razões, como a falha na hibridização ou presença de cromossomos aneuploides. Para resultados mais confiáveis, devem ser usadas colorações duplas, ou até triplas, encarecendo e aumentando o grau de dificuldade do procedimento (42).

### *Quinacrina mostarda*

A quinacrina é um método que cora o corpúsculo F do cromossomo Y, o qual se encontra na região distal do seu braço curto. Em 1988, a partir dessa coloração, foi demonstrada a presença do corpúsculo F (identificado como corpúsculo fluorescente) em diversas espécies, como bovinos, suínos, leporinos, murinos, cães, ratos e também no homem (44).

No entanto, a quinacrina pode produzir resultados falsos positivos e falsos negativos em células em interfase, como já demonstrado em humanos (18).

Vale ressaltar então que os resultados de trabalhos que utilizaram a coloração com quinacrina para confirmar a sexagem por centrifugação em gradiente de Percoll<sup>®</sup> devem ser interpretados com cautela, uma vez que a quinacrina pode falsamente aumentar o enriquecimento de X, e diminuir o de Y, apresentando resultados incorretos, já que não foi confirmado pela PCR, FISH (18) ou citometria de fluxo. O Percoll<sup>®</sup> é considerado um contaminante, interferindo no processo de coloração com a quinacrina. Nestes casos, o Ficoll pode ser utilizado como um meio para lavagem e retirada dos resíduos de Percoll<sup>®</sup>, mas estes achados não foram confirmados (22). Meios contendo albumina também resultam em coloração inespecífica dos cromossomos autossômicos, não corando apenas o cromossomo Y, conforme desejado (45).

Diante disso, os resultados da separação espermática por gradiente descontínuo de Percoll<sup>®</sup> e outros que utilizaram a coloração com quinacrina como indicador da separação devem ser reavaliados (18).

### *Reação em cadeia de polimerase (PCR)*

A validação da sexagem espermática requer procedimentos seguros e confiáveis. A PCR permite a replicação do DNA *in vitro* e a amplificação de sequências específicas com alta sensibilidade e especificidade (46). A PCR convencional pode quantificar a relação de cromossomo X e Y em uma amostra de sêmen. No entanto, em diferentes lotes de sêmen não-sexado de um mesmo reprodutor foi reportada grande variação, o que a caracterizou como uma técnica instável e insegura (16). Mas, o desenvolvimento de nova modalidade, a PCR em tempo real ou quantitativa, restaurou sua confiabilidade, uma vez que, a utilização de sondas fluorescentes, possibilita estudos qualitativos e quantitativos, reportados com alto grau de acurácia, repetibilidade e reprodutibilidade. Em estudo realizado em bovinos não houve diferença significativa quando comparada a citometria de fluxo (47).

Além disso, têm as vantagens de permitir a utilização de uma pequena alíquota, o que no caso do sêmen, especialmente de cão, que conta com pequeno volume, é de interesse; além de poder ser realizada em grande escala (46).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A sexagem espermática por centrifugação em gradiente de densidade, se empregada com sucesso, produz descendentes de sexo pré-determinado a baixo custo e é comercialmente mais acessível do que as demais devido a facilidade de execução.

A citometria de fluxo, apesar de ser a técnica de separação espermática que apresenta resultados mais confiáveis e precisos, é muito dispendiosa, exige equipamentos sofisticados e é de difícil execução.

Apesar de ainda não possuir repetibilidade e reprodutibilidade para ser aplicada comercialmente, as vantagens da centrifugação em gradiente de densidade são a simplicidade e a economia da técnica, incentivando mais estudos nessa área, por ser uma alternativa viável, especialmente na espécie canina.

## **REFERÊNCIAS**

1. Palma GA. Biotecnologia de la reproduccion. 1a ed. Buenos Aires: El Paraíso; 2001. p.318-85.
2. Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci.* 2000;60:93-107.
3. Garner DL. Hoechst 33342: the dye that enabled differentiation of living X-and Y chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology.* 2009;71:11-21.
4. Fernandes JRC, Rodrigues P. Sexagem de sêmen. *Agrotec Rev Tec Cient Agric.* 2012;4:28-30.
5. Parrilla I, Vasquez J, Gil MA, Caballero I, Alminana C, Roca J, et al. Influence of storage time on functional capacity of flow cytometrically sex-sorted boar spermatozoa. *Theriogenology.* 2005;64:86-98.
6. Lima VFMH, Moreira Filho CA, Lucio AC, Resende MV. Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll™. *Rev Bras Zootec.* 2011;40:1680-5.
7. Seidel Jr GE. Overview of sexing sperm. *Theriogenology.* 2007;68:443-6.
8. Pukazhenthil B, Comizzoli P, Travis AJ, Wildt DE. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18:77-90.
9. Robeck TR, Montano GA, Steiman KJ, Smolensky P, Sweeney J, Osborn S, et al. Development and evaluation of deep intra-uterine artificial insemination using cryopreserved sexed spermatozoa in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Anim Reprod Sci.* 2013;139:168-81.
10. Clutton-Brock TH, Iason GR. Sex ratio variation in mammals. *Q Rev Biol.* 1986;61:339-74.
11. Mocé E, Graham JK, Schenk JL. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology.* 2006;66:929-36.
12. Welch GR, Johnson LA. Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X and Y sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology.* 1999;52:1343-52.
13. Wang HX, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD. Continuous Percoll™ gradients enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double-label fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 1994;9:1265-70.
14. Sumner AT, Robinson JA. A difference in dry mass between the heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1976;48:9-15.
15. Windsor DP, Evans G, White IG. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. *Mol Reprod Dev.* 1993;5:155-71.
16. Chandler JE, Canal AM, Paul JB, Moser EB. Collection frequency affects percent Y-chromosome bearing sperm, sperm head area and quality of bovine ejaculates. *Theriogenology.* 2002;57:1327-46.
17. Density Gradient Media. Applications and products Axis-Shield. 4a ed. Norway: Axis-Shield; 2003.

18. Check ML, Bollendorf A, Check JH, Hourani IW, Long R, Mc Monagle K. Separation of sperm through a 12-layer Percoll™ column decreases the percentage of sperm staining with quinacrine. *Arch Androl.* 2000;44:47-50.
19. Lima VFMH, Moreira Filho CA, Ramalho MFPDT. Processo de seleção do sexo de espermatozoides mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de sêmen sexado congelado. Brasil Fapesp/Unesp/Usppr PI 0300604-2. 17 Jun 2003.
20. Matás C, Vieira L, Vasquez GFA, López AK, Úbeda ALR, Gadea J. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll™ gradients on boar sperm function. *Anim Reprod Sci.* 2011;127:62-72.
21. Shastri PR, Hegde UC, Rao SS. Use of Ficoll-sodium metrizoate density gradient to separate human X- and Y-bearing spermatozoa. *Nature.* 1977;269:58-60.
22. Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T, Lizuka R. Separation of human X- and Y-bearing sperm using Percoll™ density gradient centrifugation. *Fertil Steril.* 1983;40:661-5.
23. Andersen CY, Byskov AG. Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997;76:131-4.
24. Mc Cann CT, Chantler E. Properties of sperm separated using Percoll™ and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction. *Int J Androl.* 2000;23:205-9.
25. Resende MV, Bezerra MB, Perecin F, Almeida AO, Lucio AC, Lima VFMH. Separation of x-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous Percoll™ and optiprep density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production. *Cienc Anim Bras.* 2009;10:581-7.
26. Ford T, Graham J, Rickwood D. Iodixanol: a nonionic isoosmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem.* 1994;220:360-6.
27. Ericsson JR, Langevin CN, Nishino M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature.* 1973;246:421-4.
28. Vicente R, Nadeau D. Adjustment of the osmolality of Percoll™ for the isopycnic separation of cells and cell organelles. *Anal Biochem.* 1984;141:322-8.
29. Lizuka R, Kaneko S, Aoki R, Kobayashi T. Sexing of human sperm by discontinuous Percoll™ density gradient and its clinical application. *Hum Reprod.* 1987;7:573-5.
30. Blottner S, Schwerin M, Bottcher M, Pitra C. Selective enrichment of bovine X- and Y-spermatozoa by Percoll™ density gradient. *Arch Tierz.* 1993;36:153-62.
31. Check H, Kwirenk D, Katsoff D, Press M, Breen E, Baker A. Male: female sex ratio in births resulting from IVF according to swim-up versus Percoll™ preparation of inseminated sperm. *Arch Androl.* 1994;33:63-5.
32. Watkins AM, Chan PJ, Patton WC, Jacobson JD, King A. Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous: computerized analyses. *Arch Androl.* 1996;37:1-5.

33. Samura O, Maharu N, He H, Okamoto E, Ohama K. Assessment of sex chromosome ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods. *Hum Reprod.* 1997;12:2437-42.
34. Lin SP, Lee RKK, Tsai YJ, Hwu YM, Lin MH. Separating X-bearing human spermatozoa through a discontinuous Percoll™ density gradient proved to be inefficient by double-label fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15:565-9.
35. Makkar G, Ng HY, Yeung SB, Ho PC. Comparison of two colloidal silica-based sperm separation media with a non-silica-based medium. *Fertil Steril.* 1999;72:796-802.
36. Lima VFMH. Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade [livre docência]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2005.
37. Kobayashi J, Oguro H, Uchida H, Kohsaka T, Sasada H, Sata E. Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous Percoll® gradients with rapid fluorescence in situ hybridization. *J Reprod Dev.* 2004;50:463-9.
38. Lucio AC. Influência do método de separação dos espermatozoides viáveis (“swim up”) na eficiência de seleção do sexo de bovinos por gradiente descontínuo de densidade e o impacto no melhoramento genético animal [dissertação]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2007.
39. Phillips TC, Dhaliwal GK, Verstegen-Onclin KM, Vertegen JP. Efficacy of four density gradient separation media to remove erythrocytes and nonviable sperm from canine semen. *Theriogenology.* 2012;77:39-45.
40. Silva CBAR. Sexagem espermática por gradiente de densidade de Percoll® em cães [dissertação]. Franca: Universidade de Franca; 2013.
41. Pergorato LMC, Hossepian de Lima VL. Selección del sexo em mamíferos. In: Palma GA. *Biotecnología de la reproducción.* 1a ed. Balcarce: Inta; 2001. p.317-51.
42. Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 2006;65:958-78.
43. Rens W, Yang F, Welch G, Revell S, O'Brien PC, Solanky YN, et al. An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. *Reproduction.* 2001;121:541-6.
44. Ogawa S, Yamakawa H, Yamanoi J, Nishida S, Kano Y, Takeshima T, et al. Are fluorescent bodies of Y-spermatozoa detectable in common with mammalian species? *Theriogenology.* 1988;239:1083-9.
45. Van Kooji RJ, Van Oost BA. Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining: a comparison. *Fertil Steril.* 1992;58:384-6.

46. Sverzut VG. Determinação da porcentagem de espermatozoides portadores de cromossomo X e Y no sêmen sexado mediante PCR em tempo real [dissertação]. Pirassununga: Universidade de São Paulo; 2011.
47. Parati K, Bongioni G, Aleandri R, Galli A. Sex ratio determination in bovine semen: a new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology*. 2006;66:2202-9.

**Recebido em: 05/10/2016**

**Aceito em: 06/02/2018**

## SISTEMAS DE MANEJO PARA MAXIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS DE CORTE NOS TRÓPICOS

Fernanda Cavallari de Castro<sup>1</sup>  
Hugo Fernandes<sup>1</sup>  
Cláudia Lima Verde Leal<sup>1</sup>

### RESUMO

Na bovinocultura de corte, a reprodução pode ser considerada o principal pilar de sustentação da cadeia, visto que produz a matéria-prima elementar dessa indústria: o bezerro, determinando diretamente a eficiência da produção animal e garantindo o sucesso dos sistemas de produção. Desta forma, a alta eficiência reprodutiva do rebanho, atrelada a elevados índices de produção, devem ser metas consolidadas dentre os criadores. O Brasil é um país com grande potencial para produção de carne bovina, no entanto, ainda apresenta baixa eficiência produtiva e reprodutiva, com índices reprodutivos muito baixos e insatisfatórios, além de um manejo muitas vezes precário, com pouco ou nenhum controle acerca das diferentes fases que envolvem o ano reprodutivo, como seleção dos reprodutores, estação de monta, estação de parição e processo de desmama. Neste contexto, o planejamento reprodutivo em uma propriedade e a inclusão de estratégias de manejo que maximizem a eficiência reprodutiva, torna-se crucial e de suma importância para a melhoria do desempenho produtivo e, conseqüentemente, da lucratividade na criação de rebanhos comerciais. A adoção de um adequado manejo reprodutivo, assim como sanitário e nutricional, também está intimamente atrelada à máxima exploração do potencial genético dos animais. Diante da grande importância da reprodução na cadeia produtiva da carne bovina, esta revisão visou reunir e apresentar as principais e mais eficientes estratégias de manejo adotadas para maximização do desempenho reprodutivo e produtivo em rebanhos de corte.

**Palavras-Chave:** Bovino, manejo reprodutivo, manejo nutricional, manejo sanitário, eficiência de produção animal.

### MANAGEMENT SYSTEMS TO MAXIMIZE THE REPRODUCTIVE EFFICIENCY IN BEEF CATTLE IN THE TROPICS

### ABSTRACT

In beef cattle, the reproduction can be considered the main pillar of the chain support, since it produces the basic raw material of the industry: the calf, directly determining the efficiency of animal production and ensuring the success of the production systems. Thus, high reproductive efficiency of the herd, linked at high production rates must be consolidated targets among creators. Brazil is a country with great potential for beef production, however, still has a low productive and reproductive efficiency, with very low and unsatisfactory reproductive rates, plus a handling often precarious, with little or no control on the different phases involving the reproductive year, as selection of breeding, breeding season, calving season and weaning process. In this context, the reproductive planning on a property and the inclusion of management strategies that maximize reproductive efficiency, it is crucial and very important for improving growth performance and hence profitability in the creation of commercial herds. The adoption of an adequate reproductive management, as well as health and nutrition, is also closely linked to the maximum exploitation of the genetic potential of the animals. Due the great importance of reproduction in the production

---

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP).

chain of beef, this review aimed to gather and present the main and most effective management strategies adopted to maximize the reproductive and productive performance in beef cattle herds.

**Keywords:** Bovine, reproductive management, nutritional management, health management, animal production efficiency.

## SISTEMAS DE GESTIÓN PARA MAXIMIZAR LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN GANADO DE CARNE EN LAS ZONAS TROPICALES

### RESUMEN

En la producción de ganado de carne, la reproducción puede ser considerado como el pilar principal del soporte de la cadena, ya que produce la materia prima básica de la industria: el becerro, determinando directamente la eficiencia de la producción animal y garantizar el éxito de los sistemas de producción. Por lo tanto, una alta eficiencia reproductiva del rebaño, vinculado a altas tasas de producción debe consolidarse objetivos entre los creadores. Brasil es un país con un gran potencial para la producción de carne, sin embargo, todavía tiene una eficiencia productiva y reproductiva baja, con tasas de reproducción muy baja y poco satisfactorios, además de un manejo a menudo precaria, con poco o ningún control sobre las diferentes fases que implican el año reproductiva, como la selección de crianza, estación de cría, época de parto y el proceso de destete. En este contexto, la planificación reproductiva en una propiedad y la inclusión de estrategias de gestión que maximicen la eficiencia reproductiva, es crucial y muy importante para mejorar el rendimiento del crecimiento y por lo tanto la rentabilidad en la creación de los rebaños comerciales. La adopción de un manejo reproductivo adecuado, así como la salud y la nutrición, está también estrechamente vinculados a la explotación máxima del potencial genético de los animales. Debido a la gran importancia de la reproducción en la cadena de producción de carne de vacuno, esta revisión tuvo como objetivo reunir y presentar los principales y más efectivas estrategias de gestión adoptadas para maximizar el rendimiento reproductivo y productivo en los rebaños de ganado vacuno.

**Palabras clave:** Bovino, manejo reproductivo, manejo nutricional, gestión de la salud, la eficiencia de la producción animal.

### INTRODUÇÃO

Na bovinocultura de corte, quatro pilares são responsáveis pela sustentabilidade econômica dos sistemas de produção: o melhoramento genético, a sanidade, a nutrição e a reprodução, sendo este último o grande responsável por determinar a eficiência da produção animal, visto que produz a matéria-prima elementar dessa indústria: o bezerro.

A eficiência reprodutiva pode ser definida como o número de crias produzidas durante o período de vida da fêmea no rebanho, sugerindo que a idade ao primeiro parto e o intervalo entre partos, sejam os principais fatores que afetam o desempenho reprodutivo da fêmea. A baixa taxa de natalidade, o reduzido percentual de ventres produtivos no rebanho e a elevada idade ao abate ainda são outros fatores responsáveis pela baixa eficiência. Desta forma, um adequado manejo animal e uma alta eficiência reprodutiva do rebanho, atrelada a elevados índices de produção, devem ser metas consolidadas dentre os criadores de rebanhos comerciais, visando alta lucratividade da atividade (1,2).

O Brasil é um país com grande potencial para a produção de carne bovina, no entanto, ainda apresenta baixa eficiência produtiva e reprodutiva, com índices bastante insatisfatórios no processo reprodutivo de bovinos de corte, tais como, taxas de prenhez, parição, natalidade, desmama e produtividade de quilos de bezerros desmamados/vaca relativamente baixo (3). A taxa de gestação média na bovinocultura brasileira elevou-se significativamente nos últimos anos, no entanto, ainda

há pouco ou nenhum controle sobre as diferentes fases que envolvem o ano reprodutivo, as quais consistem em: preparação da estação de monta, estação de parição e processo de desmama. Os baixos índices produtivos ainda são frequentemente relacionados ao manejo inadequado destinado às matrizes dentro de um rebanho, as quais muitas vezes são colocadas em segundo plano, esquecendo-se de sua grande responsabilidade sobre a eficiência reprodutiva do rebanho, assim, uma especial atenção deve ser dedicada à fertilidade desta categoria (4).

O planejamento reprodutivo em uma propriedade torna-se, portanto, de fundamental importância para o aumento da eficiência reprodutiva de bovinos, possuindo impacto direto e incisivo sobre a saúde financeira da empresa rural. Este planejamento deve estar interligado aos planejamentos nutricional, sanitário e genético, visando sempre a maximização da eficiência produtiva e reprodutiva do rebanho, ou seja, da produção de quilos de bezerra desmamado/hectare/ano (5).

Dentro deste cenário, inúmeras estratégias de manejo vêm sendo amplamente utilizadas de forma racional em rebanhos de cria, visando além de um adequado manejo reprodutivo, a prevenção de doenças, o atendimento das exigências nutricionais nas diversas fases da vida reprodutiva e à máxima exploração do potencial genético dos animais. Dentre as práticas de manejo empregadas para melhorar a fertilidade e aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho, destacam-se as seguintes: escolha de matrizes e touros para a reprodução, estabelecimento de uma estação de monta e de parição, escolha de um sistema de acasalamento, adoção de protocolos de sincronização de cio, diagnóstico de gestação precoce e descarte de fêmeas inférteis, monitoramento do Escore de Condição Corporal (ECC) das fêmeas e atendimento de suas exigências nutricionais, preparo de novilhas para reposição, controle sanitário do rebanho, determinação da idade ao desmame, entre outras (6,7).

Diante do exposto e da grande importância que a reprodução exerce sobre a cadeia produtiva da carne bovina, esta revisão objetivou reunir e apresentar os principais e mais eficientes sistemas de manejo utilizados para maximização da fertilidade e, sobretudo, do desempenho reprodutivo e produtivo em rebanhos de corte.

## ESCOLHA DAS MATRIZES PARA REPRODUÇÃO

A seleção de fêmeas bovinas utilizadas na reprodução de rebanhos de cria deve ser extremamente criteriosa, visto que serão as matrizes as grandes responsáveis pela eficiência reprodutiva do sistema. Diante disso, deve-se disponibilizar uma atenção especial ao processo de seleção de matrizes, assim como à seleção de novilhas destinadas à reposição. A seleção e desenvolvimento dessas fêmeas consiste em uma fase relativamente crítica em sistemas de produção da pecuária de corte, visto que a idade média ao primeiro parto no Brasil ainda está acima de três anos de idade, em consequência de uma alimentação e manejo inadequados (4,8). Fisiologicamente, novilhas de corte com 14 a 15 meses de idade já estão aptas ao primeiro acasalamento, sendo possível reduzir consideravelmente a idade média brasileira ao primeiro serviço, o que culminaria com uma diminuição significativa na quantidade de animais improdutivos no rebanho (8).

O processo de seleção de matrizes ou novilhas para reposição deve sempre estar atrelado à nutrição e manejo adequados para cada fase e estado do animal. Os procedimentos gerais para seleção das fêmeas devem-se iniciar na desmama e prosseguir até que as fêmeas selecionadas tenham o primeiro parto. Na desmama deve-se descartar apenas aqueles animais que apresentem problemas de conformação ou de desenvolvimento, ou seja, fêmeas fenotipicamente incapacitadas para a reprodução. A taxa de seleção imposta ao rebanho de bezerras desmamadas irá variar de acordo com a taxa de fertilidade do rebanho base. Rebanhos com fertilidade alta devem reter no mínimo 70% das novilhas, ao passo que, rebanhos com baixa fertilidade devem incorporar 90% das bezerras desmamadas. Essas fêmeas serão incorporadas ao rebanho de reprodução somente ao atingirem peso e idade compatíveis ao exercício das funções reprodutivas. Uma maior pressão de seleção será imposta a essas fêmeas no momento da desmama de suas primeiras crias (9).

A escolha das fêmeas bovinas para reprodução e reposição é realizada principalmente em função da genética, do peso e da condição ginecológica da novilha na entrada da estação de monta. Essas novilhas devem iniciar este período com mais de 65% do seu peso adulto e ter atingido a puberdade (ter ciclado) 42 a 21 dias antes do início da estação de monta (7).

Após adequada seleção das fêmeas bovinas destinadas à reprodução no sistema de cria, é de primordial importância que, 30 a 60 dias antes do início da estação de monta, as mesmas passem por uma avaliação ginecológica criteriosa, a qual consiste em uma série de avaliações morfofuncionais do aparelho reprodutor feminino, assim como de seus gametas (oócitos). Esta avaliação proporciona diagnosticar animais em anestro e, pelo manejo (nutricional e reprodutivo) adequado, permite oferecer as condições adequadas para que esses animais possam ciclar o mais rápido possível na estação (7).

## ESCOLHA DOS TOUROS PARA REPRODUÇÃO

A seleção de touros sadios e férteis para serem utilizados na reprodução é fundamental dentro de um sistema de produção de bovinos, visto que estes influenciarão diretamente na fertilidade das fêmeas bovinas e, conseqüentemente, na produção de quilos de bezerros desmamados/ha/ano. O impacto da fertilidade do touro no desempenho reprodutivo do rebanho e na fertilidade das fêmeas é de extrema importância, visto que os mesmos podem servir a um número elevado de fêmeas, tanto no sistema de monta natural (pelo menos 25 vacas) como de inseminação artificial (10,11). Portanto, touros de baixa fertilidade, quando permanecem por um longo período no rebanho, por não serem diagnosticados em tempo hábil, causam grandes prejuízos na produtividade do sistema de cria, acarretando em baixa eficiência reprodutiva das fêmeas de corte, mesmo que estas possuam elevada fertilidade e características reprodutivas desejáveis (6,12). O número de touros zebuínos inférteis ou subférteis em serviço ainda é bastante elevado no Brasil, sendo que 20 a 40% apresentam algum distúrbio de fertilidade (13).

Para eliminar as perdas causadas por subfertilidade e infertilidade, os touros destinados à reprodução do rebanho deverão ser previamente selecionados pela sua capacidade reprodutiva, a qual pode ser seguramente avaliada por meio de um exame andrológico completo, realizado antes da estação de monta. Desde que os touros a serem avaliados não sofram restrição alimentar durante o período de seca, o exame poderá ser feito em torno dos 60 dias antes do início da estação de monta. Essa avaliação deve ser bastante abrangente e criteriosa e, segundo Valle et al. (6) e Barbosa et al. (11), deve incluir:

➤ Exame físico: Observação de todas as condições que possam interferir na habilidade de monta, tais como, defeitos de aprumos, condição corporal, incidência de doenças, problemas respiratórios e de dentição;

➤ Exame do trato reprodutivo: Diagnóstico de anormalidades dos órgãos genitais internos (glândulas vesiculares, ampolas do ducto deferente e próstata) e externos (pênis, prepúcio, escroto, consistência do testículo, epidídimo, perímetro escrotal e cordão espermático). O perímetro escrotal é um excelente indicador da produção espermática e da precocidade sexual das filhas e irmãs;

➤ Avaliação das características físicas do sêmen: Volume, aspecto, cor, pH, motilidade, vigor, turbilhonamento, concentração e percentagem de vivos e mortos;

➤ Avaliação das características morfológicas do sêmen: Defeitos maiores, menores e total de defeitos;

➤ Avaliação da libido: Desejo em procurar a fêmea e completar a monta;

➤ Capacidade de monta ou relação touro/vaca: as recomendações gerais são de 25 a até 60 ou 80 vacas para cada touro. Esta relação irá depender de fatores como a idade, capacidade de monta, estado sanitário e nutricional dos touros, tamanho e topografia das pastagens, lembrando-se sempre de não colocar no mesmo pasto touros adultos e jovens, pois os adultos, devido à dominância social, poderão impedir o desempenho reprodutivo dos mais jovens.

A avaliação da fertilidade dos touros, realizada pelo exame andrológico completo, oferece uma estimativa segura do potencial reprodutivo do touro, proporcionando o uso de touros com

maior capacidade de fertilização, reduzindo o número de touros em relação ao número de vacas e, conseqüentemente, proporcionando um maior índice de fertilidade entre as fêmeas bovinas, ou seja, é capaz de elevar a taxa de prenhez e a subsequente produção de bezerros (7,14).

Apesar da grande importância do exame andrológico na seleção de touros para reprodução, a maioria dos criadores ainda não adota essa prática antes de iniciar a estação reprodutiva e não estabelece uma relação touro/vaca adequada, reduzindo consideravelmente a eficiência reprodutiva do rebanho (15).

## **IMPLANTAÇÃO DA ESTAÇÃO DE MONTA**

O sistema de monta mais primitivo e utilizado no Brasil é aquele em que o touro permanece no rebanho durante todo o ano e, como conseqüência, os nascimentos se distribuem por vários meses, dificultando o manejo das matrizes e das respectivas crias (6,16). Com a ocorrência de nascimentos em épocas inadequadas, o desenvolvimento dos bezerros é prejudicado e a fertilidade das matrizes pode ser reduzida substancialmente devido ao aumento do intervalo parto-primeiro serviço, induzido pela restrição alimentar. A monta durante todo o ano ainda dificulta o controle zootécnico e sanitário do rebanho, devido à falta de uniformidade (idade e peso) dos animais, prejudicando a seleção dos bovinos de maior potencial reprodutivo, em detrimento da fertilidade do rebanho (17).

Por isso, o estabelecimento de uma estação de monta de curta duração e na época adequada é uma das decisões mais importantes e cruciais do manejo reprodutivo e de maior impacto na fertilidade do rebanho, pois, além de disciplinar as demais atividades de manejo, sua implantação ainda permite que o período de maior exigência nutricional (lactação) coincida com o de maior disponibilidade de forrageiras de melhor qualidade, de modo a reduzir ou mesmo a eliminar a necessidade de alguma forma de suplementação alimentar, e ainda conseguir melhores índices reprodutivos (18,19). Como resultado desta prática, as fêmeas terão tempo e condições suficientes para se recuperarem fisiologicamente até a monta subsequente. A concentração dos nascimentos na época mais adequada do ano ainda resulta em lotes uniformes de bezerros e permite a adoção de diferentes práticas de manejo, que visam à redução da mortalidade e ao aumento do peso à desmama (17,18).

Reduzindo-se a estação de monta, também é possível identificar as fêmeas de melhor desempenho reprodutivo, pois as vacas mais prolíficas tendem a parir no início do período de nascimento e desmamam bezerros mais pesados, já aquelas que, sob as mesmas condições, não concebem ou tendem a parir no final do período, devem ser descartadas, pois fatalmente não irão conceber na próxima estação e, conseqüentemente, estarão prejudicando a produtividade do rebanho. Assim, para a otimização da produtividade da cria, o produtor deve ter como meta a obtenção de elevados índices de concepção (acima de 70%) nos primeiros 21 dias da estação de monta e índices superiores a 90% durante os dois primeiros meses de monta (6,20,21).

### ***Época da Estação de Monta***

Existe uma época de estação de monta ideal para cada clima e/ou região, pois esta é determinada em função da distribuição das chuvas e de sua quantidade, a qual influenciará diretamente a qualidade e quantidade de forragem disponível no pasto. A estação de monta deve ser estabelecida a fim de possibilitar a disponibilização adequada de nutrientes requeridos para o processo de amamentação e retorno à ciclicidade normal, além de permitir que os nascimentos ocorram na época das secas, quando a incidência de doenças, como a pneumonia, e de parasitos, como carrapatos, bernes, moscas e vermes é bastante reduzida (6,17).

A estação de monta normalmente é estabelecida 40 a 60 dias após o início da estação das chuvas, que pode variar de novembro a janeiro, dependendo da região, fazendo com que o período de nascimentos ocorra de agosto a outubro (período seco) e o terço inicial de lactação, que apresenta as maiores exigências nutricionais, coincida com o período de maior oferta de alimentos

de melhor qualidade (estação das chuvas) (7). Desta forma, nas propriedades que preconizam o desmame aos oito meses de idade, os bezerros são separados das mães nos meses de março, abril e maio, época de grande oferta de pastagens. Esta prática favorece o desempenho do bezerro no início da recria, bem como o da vaca, que estará sem bezerro ao pé e poderá suportar melhor as restrições do período seco e melhorar a condição corporal ao parto (20).

### *Período de Estação de Monta*

O estabelecimento de um período de monta é uma prática de fácil adoção e sem custo para o produtor, no entanto, deve-se evitar a mudança brusca do sistema tradicional (monta o ano inteiro) para o de curta duração, devido ao elevado número de fêmeas que teriam de ser descartadas. De maneira geral, devido à sazonalidade da produção de forrageiras, ocorre uma concentração natural dos nascimentos durante o período seco do ano, ideal para os bezerros. Portanto, com base nestes nascimentos, para propriedades que nunca adotaram um período de estação de monta, recomenda-se, no primeiro ano, instituir um período de outubro a março (180 dias) e, nos anos subsequentes, deve-se ajustar gradativamente este período eliminando os meses de menor concentração de nascimentos, até a obtenção de um período ideal (60 a 90 dias) (6). Para novilhas, a estação de monta pode durar de 60 a 70 dias quando o manejo nutricional, sanitário e genético estiver adequado (7). Deve-se ter como meta elevados índices de concepção no primeiro mês de monta, para que os nascimentos se concentrem no início da época de parição e as vacas tenham tempo suficiente para recuperar seu estado fisiológico e emprenhar novamente e, além disso, os bezerros nascidos nesse período são os que apresentam o maior peso à desmama (6,18).

Dentro deste contexto, vale salientar que, para reduzir o intervalo entre o parto e o cio subsequente, tanto vacas como novilhas devem apresentar condições corporais de moderada a boa no início da estação de monta. Logo, o adequado manejo nutricional nos dois últimos meses de gestação é de vital importância para a recuperação normal da ciclicidade e atividade reprodutiva nas fêmeas (7).

## **ESCOLHA DE UM SISTEMA DE ACASALAMENTO**

Os principais sistemas de acasalamento consistem na monta natural em campo, monta natural controlada ou dirigida e a inseminação artificial. A monta natural em campo é o método ainda mais empregado na pecuária de corte extensiva e consiste em deixar os touros junto ao rebanho de fêmeas durante toda a estação de monta. Já, o sistema de monta controlada ou assistida consiste em trazer a fêmea bovina junto ao touro, ao ter seu cio detectado, onde permanece até a sua cobrição (6,16).

Com relação à inseminação artificial, observa-se que ainda consiste numa biotécnica pouco empregada. Os principais fatores limitantes à sua expansão estão relacionados ao sistema extensivo de exploração da pecuária, além da dificuldade na identificação correta do cio, dos problemas associados com o aparte, condução, contenção e inseminação diária dos animais e dos custos envolvidos na implantação do processo. No entanto, se bem manejado, o sistema de inseminação artificial oferece inúmeros benefícios, tanto econômicos quanto sanitários e zootécnicos, tais como: padronização do rebanho, controle de doenças sexualmente transmissíveis, ordenação do trabalho na fazenda, redução do custo com reposição de touros (devido ao menor desgaste dos mesmos), redução dos custos com manejo, melhoramento genético, obtenção de animais com maior potencial de produção e reprodução e detecção precoce de falhas reprodutivas relacionadas ao macho (22).

Quando associada à protocolos hormonais de indução e sincronização de cio, a inseminação artificial é capaz de promover uma melhora considerável nas taxas de fertilidade no início da estação de monta e, sobretudo, na eficiência reprodutiva do rebanho (6,23). Normalmente, a taxa de prenhez varia de 40-60% na primeira inseminação, sendo que esses resultados podem aumentar na segunda inseminação ou repasse com touros (6). A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) elimina o trabalho com detecção de cio após o protocolo, facilita o manejo da inseminação,

concentra o trabalho em dias pré-determinados, aumenta o número de animais inseminados e, conseqüentemente, as taxas de prenhez, possibilitando o planejamento dos partos e da estação de monta subsequente (24,25). No entanto, no sistema de IATF, deve-se atentar ao custo-benefício do programa. Valores inferiores a 1,6 de serviço por concepção (nº de inseminação/concepção) são desejáveis, refletindo assim uma excelente fertilidade dos animais e um eficiente processo de inseminação artificial (26).

Portanto, quando há a detecção correta dos cios ou a implementação de programas específicos de sincronização de cio, além de adequada condução do procedimento de inseminação artificial, utilizando-se mão-de-obra especializada, sêmen de boa qualidade e ainda o repasse das vacas com o touro, este sistema consiste, sem dúvidas, no de maior eficiência, capaz de explorar ao máximo a fertilidade das fêmeas bovinas e melhorar o desempenho reprodutivo e produtivo do rebanho.

## **DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E DESCARTES DAS FÊMEAS**

O diagnóstico de gestação é de grande importância para a melhoria da eficiência reprodutiva, pois possibilita a identificação precoce das fêmeas que não ficaram prenhes durante a estação de monta. Este diagnóstico deve ser realizado o mais precocemente possível após o término da estação de monta (26 dias por ultrassonografia; 45 a 60 dias por palpação retal), pois, desta forma, identificam-se com antecedência as fêmeas que deverão ser descartadas e ganha-se mais tempo para programar a reposição de fêmeas (5).

Identificadas as fêmeas vazias, elas devem ser descartadas do rebanho antes do início do inverno, pois ainda não perderam peso e o descarte dessas aumenta a disponibilidade de forrageiras para as fêmeas prenhes durante o terço final de gestação, quando as exigências nutricionais se elevam, devido ao acentuado desenvolvimento do feto. No entanto, um plano de descarte baseado unicamente no diagnóstico de gestação deve ser analisado com muito cuidado, visto que um número elevado de fêmeas vazias pode ser resultado de uma restrição alimentar após períodos de seca prolongados, baixa fertilidade e capacidade reprodutiva dos touros doadores de sêmen, incidência de doenças reprodutivas (que não foram diagnosticadas) e ainda baixa qualificação dos inseminadores. Ciente desses fatos, o produtor deve estabelecer um plano de descarte adequado, justo e de acordo com as suas necessidades (5,6).

Assim, a identificação e o descarte das matrizes improdutivas e baixa fertilidade são alternativas de manejo que possibilitam ao produtor otimizar, de forma racional e econômica, o desempenho reprodutivo do rebanho, promovendo desta forma a seleção de animais mais férteis, precoces e adaptados ao manejo local (7).

## **MONITORAMENTO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL (ECC) E ATENDIMENTO ÀS EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS**

O adequado atendimento das exigências nutricionais nas diversas fases da vida reprodutiva é de fundamental importância para a otimização do desempenho reprodutivo do rebanho e, acima de tudo, para a maximização da fertilidade das fêmeas reprodutoras. O balanço energético negativo (diferença entre a energia consumida e a necessária para manutenção e produção), causado pelo manejo nutricional inadequado, geralmente é a maior causa de infertilidade entre os animais. Dentre as diferentes fases da vida reprodutiva, as últimas semanas de gestação e o início da lactação representam os períodos mais críticos, onde as vacas ficam muito propensas a passarem por um período de balanço energético negativo (27,28), devido à baixa ingestão de alimentos e nutrientes, que acarretam em perda de peso corporal, mobilização de gordura do tecido adiposo (27,29), atraso na primeira ovulação pós-parto, diminuição da atividade luteal, anestro e, conseqüentemente, em baixo desempenho produtivo e reprodutivo pós-parto, além de aumentar a incidência de transtornos metabólicos (30,31). A estratégia mais bem sucedida para minimizar o balanço energético negativo é o monitoramento e a manipulação do escore de condição corporal (ECC) ao parto (32).

A avaliação da condição corporal das fêmeas, apesar de subjetiva, é uma ferramenta bastante útil no manejo reprodutivo, capaz de preconizar o estado nutricional do rebanho em determinado momento. O emprego desta prática, em ocasiões estratégicas, permite que correções no manejo nutricional possam ser efetuadas a tempo, de modo que os animais apresentem as condições mínimas no momento desejado (6). Vacas com boas condições corporais ao parto retornam ao cio mais cedo e apresentam maiores índices de concepção, além de produzirem maior quantidade de leite durante a lactação (32). Portanto, o monitoramento da condição corporal realizado no terço final de gestação, pode indicar a necessidade de ajustes nos níveis nutricionais, de modo que, ao parto, a condição corporal adequada da fêmea seja atingida.

Um sistema de escore visual para avaliar a condição corporal das fêmeas é utilizado para verificar a necessidade ou não de correção na disponibilidade de nutrientes. Em bovinos de corte, o sistema mais utilizado é aquele no qual a pontuação varia na escala de 1 a 9, onde o Escore de Condição Corporal (ECC) de 1 a 3 correspondem a vacas muito magras; 4 a magras, 5 a moderadas, 6 a boas, 7 a gordas e, por fim, 8 a 9 correspondem a vacas muito gordas, sistema este desenvolvido com base em estudos de Whitman (33), Lowman et al. (34) e Spitzer (35), e ainda de acordo com outros autores (6,36).

A condição corporal é obtida por observação e palpação da gordura subcutânea das costelas, processos espinhosos e transversos das vértebras lombares e/ou dorsais, tuberosidade isquiática e sacral e inserção caudal (35-37).

Para que uma alta percentagem de vacas e novilhas fiquem prenhes no início do período de monta, é necessário que elas apresentem um escore de 5 a 6 ao parto (condições moderada a boa). Nessas condições, a manifestação do cio será antecipada e poderá atingir altos índices de concepção ao início da monta (38,39). É muito importante que também seja efetuada uma avaliação do estado corporal das vacas, e principalmente das novilhas, ao início do terço final de gestação. Como este período coincide com o início da seca (maio a junho), as fêmeas com escores abaixo de 5 devem ser separadas das demais e suplementadas, de modo que possam, ao parto, apresentar condição corporal de moderada a boa. Após o parto, os animais requerem 50% a mais de nutrientes, em termos de energia e proteína. Como essa fase coincide com a de pastagens de boa qualidade, a simples utilização das forrageiras disponíveis nesse período, se bem manejadas, vem atender às exigências nutricionais dessa categoria. Novilhas de primeira cria, por estarem ainda em crescimento, apresentam exigências superiores às das vacas adultas, por isso, uma atenção especial deve ser dada a essa categoria animal, principalmente após o primeiro parto (6,36).

Quanto maior for a perda de peso no início do período pós-parto, e quanto menores forem as reservas corporais, maior o tempo necessário para a reativação cíclica do ovário. Geralmente, o equilíbrio energético negativo e um baixo escore de condição corporal causam atraso na reativação do ovário, com longos períodos de anestro, cios silenciosos, ciclos estrais curtos, baixa secreção de progesterona e baixas taxas de fertilidade, com aumento de repetição de cios pós-serviço (40-43).

Diante do exposto, para maximizar a fertilidade das fêmeas reprodutoras, é de suma importância que o monitoramento do ECC seja realizado no terço final da gestação e no momento da parição para que, desta forma, estas matrizes possam obter melhores taxas de fertilidade e, conseqüentemente, menor intervalo entre partos (43).

## **PREPARO DE NOVILHAS PARA REPOSIÇÃO**

De uma maneira geral, a maioria dos produtores retém boa parte das novilhas do próprio rebanho para repor as vacas descartadas. Entretanto, a seleção e o preparo dessas novilhas para reposição são alguns dos itens mais importantes no manejo reprodutivo, pois interferem diretamente na eficiência reprodutiva e índice de fertilidade do rebanho de fêmeas. Essas devem ser cuidadosamente selecionadas e manejadas para que atinjam a maturidade sexual mais cedo e que, tanto a concepção como as partições, ocorram ao início do período de monta e nascimentos, respectivamente. Para que esses objetivos sejam alcançados é necessário: a) propiciar condições nutricionais e sanitárias adequadas para a redução da idade à puberdade; b) colocar em monta uma

quantidade de novilhas superior à necessária para reposição das vacas descartadas (cerca de 25% a mais); c) iniciar e terminar a estação de monta, pelo menos quatro semanas antes da estação de monta das vacas; d) selecionar para reposição aquelas que conceberam ao início do período de monta; e) efetuar o diagnóstico de gestação de 45 a 60 dias após o final da monta, para descartar as vazias; f) proporcionar condições nutricionais adequadas para que as novilhas apresentem condições corporais de moderada a boa ao parto, visto que esta relaciona-se diretamente ao peso do bezerro ao nascimento e os índices de fertilidade e concepção após o parto; g) após o parto, as novilhas devem ser mantidas em pastos separados das vacas até a desmama, para que tenham suas necessidades nutricionais atendidas e possam conceber na próxima estação de monta (6,44).

## CONTROLE SANITÁRIO DO REBANHO

A sanidade também é capaz de comprometer significativamente a fertilidade de um rebanho. Neste contexto, deve-se dar uma atenção especial às doenças infectocontagiosas da esfera reprodutiva, tais como brucelose, leptospirose, tricomonose, campilobacteriose, rinotraqueíte infecciosa (IBR), diarreia viral bovina (BVD), entre outras que acarretam em aborto, além de problemas de retenção de placenta e infecções uterinas, resultando na redução dos índices de fertilidade (9,45). A IBR, a BVD, a leptospirose e a brucelose, tanto de forma isolada quanto em associação, ocorrem em um percentual expressivo dos rebanhos bovinos brasileiros (46,47). A etiologia das doenças reprodutivas é multifatorial, podendo ser de causa infecciosa e não infecciosa. As doenças infecciosas podem ser de origem bacteriana, virótica e parasitária, podendo impedir a fecundação, causar abortos ou produzir bezerros com peso inferior à média (48). Para prevenir e eliminar estas doenças, causadoras de grandes prejuízos à reprodução, é de fundamental importância a adoção de um adequado programa de controle sanitário do rebanho (6).

Visto que a incidência de doenças ligadas à reprodução reduz consideravelmente o potencial reprodutivo do rebanho de cria (49), o controle sanitário dessas deve ser realizado de maneira eficiente e sistemática, consistindo, basicamente, em um programa de vacinação adequado, conforme demonstrado na Tabela 1. No caso de animais já portadores destas doenças, geralmente recomenda-se o descarte dos mesmos, devido ao elevado custo de tratamento e risco de contaminação dos demais, salvo animais de alto valor genético e comercial.

Em relação às matrizes, ainda é importante atentar-se à integridade física e funcional do úbere e de seus respectivos tetos. O esfíncter e o canal do teto são importantes barreiras primárias contra a invasão de patógenos no úbere. Assim, é essencial que tais estruturas estejam em condições físicas e de higiene perfeitas para prevenir infecções intramamárias como as mastites (50).

Tabela 1. Calendário de vacinação contra as principais doenças infecciosas na bovinocultura de corte.

Vacinação	Meses Recomendados	Observações
Febre Aftosa <sup>a</sup>	Maio e Novembro	Todo o rebanho.
Brucelose <sup>a</sup>	Maio e Novembro	Fêmeas do 3º ao 8º mês de idade.
Clostridiose <sup>b</sup>	Maio e Junho (reforço)	Animais com 0 a 12 meses.
Carbúnculo Sintomático <sup>b</sup>	Março e Setembro	Animais com 6 a 12 meses e repetição semestral.
Gangrena Gasosa <sup>b</sup>	Março e Setembro	Animais com 6 a 12 meses e repetição semestral.
Botulismo <sup>b</sup>	Janeiro	A partir do 4º mês de idade com repetição anual.
Raiva <sup>b</sup>	Janeiro	A partir do 4º mês de idade com repetição anual (em regiões com incidência).
Leptospirose <sup>b</sup>	Agosto	Duas doses com intervalo de 3-5 semanas e revacinação anual.
Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) <sup>b</sup>	Setembro	Vacinar as vacas 2 meses antes da monta.
Diarreia Viral Bovina (BVD) <sup>b</sup>	Setembro	Vacinar as vacas 2 meses antes da monta.
Diarreia Neonatal Bovina <sup>b</sup>	Agosto e Setembro	Vacas no 8º mês de gestação com revacinação após 3 semanas.

Paratifo <sup>b</sup>	Julho, Agosto e Setembro	Vacas ao redor do 8º mês de gestação.
Paratifo dos Bezerros <sup>b</sup>	Julho, Agosto, Setembro e Outubro	Bezerros com 15 a 21 dias de idade.
Pasteuleroze <sup>b</sup>	Agosto	Vacinar todo o rebanho; bezerros 10 dias antes da desmama.
Ceratoconjuntivite Infeciosa Bovina <sup>b</sup>	Agosto	Vacinar fêmeas no 7º mês gestação e todo o rebanho 2 vezes por ano.

*a* - Vacinação obrigatória; *b* - Vacinação em regiões onde o problema foi diagnosticado;  
 Fonte: Adaptado de Riet-Correa et al. (53).

O controle adequado de endo e ectoparasitas, também torna-se crucial para maximizar a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho. No que se diz respeito ao controle de endoparasitas, em animais com até 2 anos recomenda-se 8 tratamentos, sendo quatro aplicações do nascimento até 1 ano de idade e quatro aplicações de 1 a 2 anos, já que são os animais mais acometidos (51). Já, em relação aos ectoparasitas, uma das doenças mais importantes, e que afeta em larga escala os rebanhos, é a infestação por carrapatos, enfermidade que causa enormes prejuízos e grande desconforto para os animais, prejudicando o seu desenvolvimento e produção. Além dos problemas que os ectoparasitas normalmente causam, transmitem doenças que afetam de forma drástica o animal. Estas doenças são a babesiose e a anaplasmose que fazem parte do complexo “tristeza parasitária bovina” (52). Quanto ao controle desses ectoparasitas, este deve ser realizado com banhos carrapaticidas na época de maior calor, período em que os ectoparasitas estão mais presentes. Estes banhos devem ser realizados a cada 21 dias, com um total de três a seis banhos (52). Para o controle de endo e ectoparasitas, deve-se seguir um programa sanitário adequado para a erradicação dos mesmos, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Calendário de manejo para controle dos principais endo e ectoparasitas na bovinocultura de corte.

Parasita	Meses Recomendados	Manejo
Verminoses	Julho e Setembro	Vermifugação em animais da desmama aos 30 meses de idade.
Bernes e Bicheiras	Setembro	Inseticida - Somente em altas infestações ou controle estratégico.
Carrapatos	Setembro	Carrapaticida - começar no início das chuvas (repetir 3-6 vezes, de 21 em 21 dias).
Mosca-do-chifre	Setembro e Outubro	Inseticida- Início das chuvas.

Fonte: Adaptado de Riet-Correa et al. (53).

## DETERMINAÇÃO DA IDADE À DESMAMA

O manejo de desmame é um fator determinante na duração do anestro pós-parto, visto que o retorno ao cio de vacas que não apresentam deficiência nutricional está fortemente ligado à frequência, intensidade e duração da amamentação (54). A prática de diminuir o tempo de amamentação tem demonstrado ser altamente efetiva na redução do intervalo ao primeiro cio (54).

Estudos têm demonstrado que vacas com bezerro ao pé, amamentando de forma *ad libitum*, apresentam intervalos mais prolongados para a manifestação de estro e ovulação pós-parto, quando comparadas a vacas sem bezerro ao pé (41,55). O prolongado período anovulatório decorrente do aleitamento diário ocorre em função de uma série de fatores sensoriais e comportamentais que envolvem a interação entre a mãe e o bezerro (56). Estudos de Short et al. (57), Yavas e Walton (58) e Montiel e Ahuja (59), mostraram que o encurtamento da duração e da frequência de mamadas proporciona uma redução no período de anestro pós-parto. Por isso, várias técnicas de desmame vêm sendo desenvolvidas e amplamente utilizadas a fim de melhorar o desempenho reprodutivo de

vacas no puerpério, como a desmama precoce, desmama interrompida, amamentação controlada e a suplementação adequada dos bezerros (41,60,61).

### *Desmama precoce ou antecipada*

Essa prática consiste na antecipação da idade a desmama, onde a separação do bezerro de sua mãe ocorre quando o mesmo atinge de 60 a 90 dias de idade, época em que o leite tem menor participação no suprimento das exigências nutricionais do bezerro (62,63). Essa desmama é realizada principalmente devido a situações de escassez de forragens durante o período de lactação e monta. A finalidade principal desta prática é reduzir o estresse da amamentação e os requerimentos nutricionais da vaca, permitindo que essas fêmeas recuperem sua condição corporal, manifestem estro mais precocemente e, dessa forma, possam conceber ainda dentro do período de monta subsequente ao parto (41). A restrição alimentar durante esse período, associada à amamentação, aumenta de forma significativa o intervalo entre o parto e o primeiro cio subsequente, reduzindo assim a taxa de prenhez. Durante a lactação, as exigências nutricionais são mais elevadas que no terço final de gestação e, principalmente em situações de restrição alimentar, a atividade reprodutiva das fêmeas é inibida para favorecer a sobrevivência do bezerro. Por isso, a antecipação do desmame visa exclusivamente à vaca, sendo uma excelente opção para novilhas de primeira cria, cujas exigências nutricionais são bastante elevadas para atender à gestação, lactação e crescimento concomitantemente (20).

Almeida e colaboradores (64) evidenciaram que vacas submetidas ao desmame precoce são mais pesadas, possuem melhor condição corporal ao final do acasalamento e apresentam maiores ganhos de peso, proporcionando maiores taxas de prenhez. Vacas que desmamaram precocemente seus bezerros (70 dias de idade) ganharam 67 kg de peso a mais em relação às vacas que desmamaram seus bezerros aos 180 dias, sendo ambos os grupos mantidos na mesma área de pastagem e, em relação ao desempenho reprodutivo dessas fêmeas, as taxas de prenhez foram substancialmente mais elevadas para as vacas submetidas ao desmame precoce do que para as submetidas ao desmame tradicional (91% contra 26%) (65). Esses resultados concordam com os obtidos por Vaz et al. (66), em que vacas cujos bezerros foram desmamados aos 76 dias de idade, apresentaram um incremento considerável na taxa de prenhez (de 55,5 para 86,34%), em comparação às que tiveram seus bezerros desmamados aos 148 dias de idade.

Cerdótes et al. (67), estudando o efeito da desmama precoce em primíparas, observaram que, para essas fêmeas, o desmame aos 42 dias proporcionou um incremento de 40,0% na taxa de parição, quando comparada a de vacas suplementadas desmamadas aos 63 dias pós-parto, evidenciando que a suplementação e a redução na idade ao desmame têm grande importância para o aumento da taxa de parição das vacas primíparas, mesmo quando se trata de idades ao desmame bem precoces. Estes dados concordam com os obtidos por Restle et al. (68), que verificaram maior incremento na taxa de prenhez em vacas primíparas, a qual passou de 12,5 para 63,6%, quando a idade de desmame foi reduzida de sete para três meses, em relação aos demais grupos de vacas. Moletta e Perotto (65) também verificaram que o efeito do desmame precoce foi bastante acentuado na categoria de primíparas, sendo a taxa de prenhez de 82,35 e 3,7% para os desmames realizados aos 70 ou 210 dias, respectivamente, evidenciando que quanto maior a diferença de idade entre os desmames, mais acentuados são os benefícios em favor do desmame antecipado. Almeida et al. (64), por sua vez, quando reduziram o desmame de bezerros de 170 para 90 dias de idade, verificaram um incremento de 30 pontos percentuais na taxa de prenhez de vacas múltiparas (de 11,1 para 40,0%) mantidas em pastagem de campo nativo.

Além de promover um aumento considerável nos índices de concepção, a prática de desmama precoce ainda proporciona aumento na taxa de lotação, pois vacas solteiras necessitam de 40% a 60% menos de nutrientes do que vacas em lactação (6,40,69).

Segundo Pascoal et al. (70), o desmame precoce é uma prática utilizada com êxito pelos produtores rurais para aumentar os índices reprodutivos do rebanho de cria a um custo compatível com o sistema de exploração pecuária. Entretanto, na aplicação desta prática, o custo com

suplementação alimentar dos bezerros deve ser considerado, já que estes animais terão que utilizar mais cedo, como única fonte de nutrientes, alimentos sólidos. Para isso, devem ser disponibilizados para os bezerros alimentos de alta qualidade. Apesar da reduzida influência do leite sobre o ganho de peso de bezerro após o terceiro mês de lactação, a desmama pode afetar o desenvolvimento ponderal e fertilidade à maturidade sexual das fêmeas (20). Assim, para evitar um baixo desempenho do animal na fase adulta, recomenda-se a adoção de alguns cuidados na aplicação dessa prática, tais como: não desmamar bezerros com menos de 70kg e 60 dias de idade; não desmamar bezerros com peso superior a 90 kg; desmamar em época adequada, com boa disponibilidade de pastos; iniciar o desmame na mangueira, onde os animais devem ficar por 10 dias, com água de qualidade, concentrado e feno (neste período os animais aprendem a comer o alimento sólido); os pastos devem ser diferenciados para animais desmamados precocemente; fornecer suplementação com ração concentrada até 7-8 meses de idade (pelo menos 2 vezes ao dia) (1,20,63).

Pesquisas comparando o desempenho de bezerros submetidos ao desmame precoce (60 a 90 dias) com bezerros desmamados no sistema tradicional (170 a 210 dias) já foram desenvolvidas por diversos autores, e mostram que os animais desmamados precocemente, desde que submetidos a um manejo nutricional adequado, apresentaram, durante a fase de terminação, peso, ganho de peso, espessura de gordura e desempenho reprodutivo, similares aos animais submetidos ao desmame tradicional (1,71-75).

### ***Desmama temporária ou interrompida***

É uma técnica de fácil adoção e custo zero, podendo ser realizada de diversas maneiras. Esse manejo consiste na interrupção temporária da amamentação, por um período que pode variar de 48 a 72 horas, onde o bezerro permanece separado da mãe em um piquete ou mangueira com alimentação e água disponíveis em abundância. Neste período, as fêmeas permanecem pastando ao lado de fora da mangueira, mantendo contato visual com suas crias, a fim de amenizar o estresse dos bezerros (40). Esse procedimento é iniciado a partir dos 40 dias pós-parto e repetido a cada 15 dias (63). A finalidade dessa separação é estimular o retorno à atividade reprodutiva normal das fêmeas e, conseqüentemente, melhorar a fertilidade do rebanho de corte (1).

Vinte e quatro horas após a separação do bezerro, ocorre um aumento gradual na liberação do hormônio LH, que é um dos requisitos essenciais para o restabelecimento dos ciclos estrais (40). No entanto, o efeito dessa separação temporária depende do estado nutricional em que a fêmea se encontra. Aquelas que estão em condição corporal ruim (ECC abaixo de 4) não respondem satisfatoriamente ao tratamento. Já, em fêmeas que apresentam bom estado corporal (ECC 5), a desmama temporária pode induzir à manifestação precoce do cio no pós-parto, sendo capaz de melhorar a taxa de concepção em até 30% (1, 40).

A desmama temporária ou interrompida não causa nenhum prejuízo ao peso dos bezerros à desmama definitiva (210 dias), quando comparada com o método tradicional de desmama (1).

### ***Amamentação controlada***

Esta prática consiste no mesmo princípio empregado em gado de leite e, quando utilizada em bovinos de corte, objetiva controlar o acesso do bezerro à amamentação, com finalidade de antecipar o retorno ao estro, visto que a intensidade e frequência da amamentação podem retardar consideravelmente o aparecimento do primeiro cio após o parto (1). Para a realização da amamentação controlada, a partir dos 30 dias de idade os bezerros são apartados das vacas e amamentados apenas uma ou duas vezes por dia, permanecendo de meia a uma hora com sua mãe (20,21,55).

A amamentação uma vez ao dia, por um período de 30 dias, iniciando-se 30 dias pós-parto, aumentou a taxa de concepção (90% contra 72% para o grupo controle) aos 90 dias de estação de monta, sem interferir no intervalo parto-concepção (76). Já, a amamentação controlada 2 vezes ao

dia, instituída a partir do trigésimo dia pós-parto até à desmama dos bezerros (7 meses), foi capaz de melhorar circunstancialmente as taxas de concepção (44%) em vacas primíparas em relação ao grupo de amamentação à vontade (9%) (77). Pencai et al. (78), por sua vez, avaliaram uma amamentação controlada em que os bezerros somente tinham acesso a suas mães por um período de 30 minutos por dia, durante a estação de monta, observando efeito significativo desta amamentação sobre a taxa de prenhez, que aumentou de 54,5 para 87,3%, quando comparada à do manejo de amamentação convencional (vacas com bezerros permanentemente ao pé, até 210 dias de idade).

Apesar dos bons resultados proporcionados por essa prática, em termos de manifestação do cio e fertilidade das vacas, este método apresenta uso bastante limitado devido ao manejo intensivo, principalmente em grandes rebanhos de corte (6,20,79).

Em relação aos bezerros submetidos à amamentação controlada, Strack et al. (80) observaram menor peso aos sete meses para esses bezerros em relação aos mantidos ao pé das vacas (195,6 contra 208,8 kg, respectivamente), sendo os dois grupos suplementados. Já, Moletta e Perotto (65) não evidenciaram índices negativos no desempenho de bezerros submetidos à amamentação controlada em relação aos mantidos em aleitamento.

## OUTROS MANEJOS

### *Efeito macho*

A introdução de um reprodutor em um lote de fêmeas em anestro estacional, que encontram-se isoladas de qualquer contato com machos há pelo menos 3 ou 4 semanas, e que estejam na estação pré-monta, induzirá de maneira eficiente o estro dentro de 24 a 72 horas pós introdução, favorecido pela interação sexual e resposta em cadeia (81). Isso se deve pela liberação de LH cerca de 10 horas após a introdução do macho, e que atinge seu nível máximo 56 horas após o contato inicial, assim permanecendo por 10 horas. Embora menos marcante que nos ovinos, esse pico de LH pode ser insuficiente para provocar ovulações, levando a ciclos curtos devido à formação de corpos lúteos de curta duração que regridem rapidamente. No entanto, a progesterona produzida por esses corpos lúteos, atua como “priming”, sendo responsável por desencadear novos ciclos ovulatórios, de duração e fertilidade normais (25,82). Vale ressaltar que existe uma alta variação entre raças e indivíduos, sendo este manejo uma prática pouco eficiente em rebanhos bovinos de grande tamanho.

### *Efeito Fêmea*

É sabido que a existência de feromônios no muco vaginal de espécies domésticas é capaz de acelerar o início da atividade reprodutiva e, em vacas no período de pós-parto, este fenômeno é bastante notável (83). Portanto, fêmeas em estro estimulam a indução da ovulação nas companheiras em anestro, com plena manifestação de cio por todas as fêmeas submetidas à estimulação (25). Por isso, dentro de um sistema de cria de bovinos de corte, torna-se essencial proporcionar o convívio direto dessas fêmeas, separadas apenas por categorias.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A melhoria da eficiência reprodutiva dos rebanhos de cria, em especial a otimização da fertilidade em fêmeas de corte, depende mais do conhecimento e do bom gerenciamento dos diversos fatores envolvidos no sistema de produção do que de elevados investimentos. Por isso, é de fundamental importância a adoção de um adequado planejamento reprodutivo para cada propriedade. Após o estabelecimento deste, pode-se incorporar à propriedade algumas estratégias de manejo de grande impacto na maximização do desempenho reprodutivo do rebanho. A determinação de um período restrito de acasalamento (período de monta) é uma das práticas mais importantes a serem implantadas, pois, além de proporcionar a concentração dos nascimentos na

época mais adequada (menor incidência de doenças), ela ainda disciplina as demais atividades de manejo da propriedade, facilitando a identificação dos animais de elevadas performances reprodutiva e produtiva e, além disso, ainda é capaz de reduzir o intervalo entre partos. Além de uma estação de monta adequada, a escolha e implantação de outras práticas de manejo em uma propriedade torna-se de vital importância para maximizar a fertilidade do rebanho de corte, tais como:

- Escolha minuciosa de matrizes e touros reprodutores, os quais devem possuir elevada performance reprodutiva;
- Escolha de um sistema de acasalamento adequado, de preferência em junção com um protocolo de sincronização de cio;
- Descarte das fêmeas inférteis ou improdutivas pelo diagnóstico precoce de gestação para que, dessa forma, haja maior disponibilidade de forragem para aquelas de alta performance, proporcionando a estas melhor condição corporal ao parto e melhores índices de concepção no pós-parto. Este manejo é capaz de aumentar progressivamente a fertilidade de todo o rebanho;
- Monitoramento do ECC das fêmeas nas diferentes fases de sua vida reprodutiva e adequado suprimento de suas exigências nutricionais;
- Formação de lotes de vacas de acordo com a data de parição e ECC para que, desta forma, estas possam receber um manejo nutricional diferenciado e adequado para suas condições;
- Realizar um controle sanitário rigoroso do rebanho, principalmente em relação às doenças reprodutivas;
- Implantar a desmama precoce, interrompida ou controlada, a fim de reduzir o período de anestro pós-parto e ainda elevar os índices de prenhes;
- Outras práticas complementares de manejo, utilizadas para melhorar o índice de fertilidade das fêmeas, consistem na exposição das mesmas ao macho (rufiões) ou mesmo a outras fêmeas em cio antes do início da estação de monta, que possuem grande influência na indução da ovulação das vacas em anestro.

A incorporação destas estratégias de manejo, se adequadamente inseridas no sistema de produção de cria, proporcionarão uma maximização da fertilidade nas fêmeas de corte, assim como a otimização do desempenho reprodutivo do rebanho como um todo, acarretando em considerável aumento da qualidade e da produtividade de quilos de bezerro/ha/ano (matéria-prima deste mercado), fazendo aumentar nossa competitividade no mercado mundial de carne.

## REFERÊNCIAS

1. Oliveira JS, Zanini AM, Santos EM. Fisiologia, manejo e alimentação de bezerros de corte. *Arq Cienc Vet Zool Unipar*. 2007;10(1):39-48.
2. Oliveira LZ, Oliveira CS, Monteiro FM, Lima VFMH, Lima FM, Costa MZ. Efeito da idade sobre as principais características andrológicas de touros Brangus-Ibagé criados extensivamente no estado do Mato Grosso do Sul - Brasil. *Acta Sci Vet*. 2011;39(1):946.
3. Vieira A, Lobato JFP, Correa ES. Produtividade e eficiência de vacas nelore em pastagem de *brachiaria decumbens* stapf nos cerrados do Brasil central. *Rev Bras Zootec*. 2005;34(4):1357-65.
4. Semmelmann CEN, Lobato JFP, Rocha MG. Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas nelore acasaladas aos 17/18 meses de idade. *Rev Bras Zootec*. 2001;30(3):835-43.

5. Torres Junior JRS, Melo WO, Elias AKS, Rodrigues LS, Penteadó L, Baruselli PS. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. *Rev Bras Reprod Anim.* 2009;33(1):53-8.
6. Valle ER, Andreotti R, Thiago LRLS. Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte. Campo Grande: Embrapa-CNPGC; 1998.
7. Barbosa FA, Souza RC. Administração de fazendas de bovinos - leite e corte. Viçosa: Aprenda Fácil Ltda; 2007.
8. Gottschall CS, Ferreira ET, Canellas L, Bittencourt HR. The reproductive performance of beef cows of different ages with calves weaned at three or seven months. *Anim Reprod.* 2007;4(1/2):42-5.
9. Campos WE, Saueressig MG, Saturnino HM, Souza BM, Amaral TB, Ferreira F. Manejo reprodutivo em gado de corte. Planaltina: Embrapa Cerrados; 2005.
10. Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH. Scrotal testicular thermoregulation in bulls. In: Chenoweth PJ. Topics in bull fertility [Internet]. Ithaca: International Veterinary Information Service; 2000 [cited 2014 Nov 2]. Available from: <http://www.ivis.org>.
11. Barbosa RT, Machado R, Bergamaschi MACM. A importância do exame andrológico em bovinos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2005. (Circular Técnica, n. 41).
12. Moraes JCF, Horn MM, Rosado A. Avaliação andrológica em touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. *Cienc Rural.* 1998;28(4):647-52.
13. Sereno JRB. Utilização racional de touros em monta natural. Corumbá: Embrapa Pantanal; 2004.
14. Oliveira CMG, Oliveira Filho BD, Fernandes PR, Viu MAO, Gambarini ML, Japur RS. Avaliação da qualidade seminal de reprodutores *Bos taurus taurus* criados extensivamente na região do Vale do Rio Araguaia. *Rev Bras Reprod Anim.* 2001;25(2):192-4.
15. Chaves RM, Souza JAT, Nascimento IMR, Lopes JB, Pontes CB, Bezerra FQG, et al. Avaliação da capacidade reprodutiva de touros da raça Nelore através da classificação andrológica por pontos (CAP) e do teste da libido. *Med Vet.* 2007;1(1):26-32.
16. Quadros DG. Sistemas de produção de bovinos de corte [Internet]. Salvador: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Produção Animal; 2005 [cited 2014 Nov 2]. Available from: [www.neppa.uneb.br](http://www.neppa.uneb.br).
17. Marques EG, Santos KJG, Faria WN. Implantação de estação de monta em rebanhos de corte. *Rev Eletronica Fac Montes Belos.* 2005;1(1):13-21.
18. Santos KJG. Estação de monta: técnica para melhorar e eficiência reprodutiva. São Luis Montes Belos, GO: Jornal das Cidades; 2003.
19. Rocha GP, Ratti JRJ, Jorge AM. Apostila didática sobre bovinocultura de corte - estação de monta. Botucatu, SP; 2005.

20. Valle ER, Andreotti R, Thiago LRLS. Técnicas de manejo reprodutivo em bovinos de corte. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte; 2000.
21. Oliveira RL, Barbosa MAAF, Ladeira MM, Silva MMP, Ziviani AC, Bagaldo AR. Nutrição e manejo de bovinos de corte na fase de cria. *Rev Bras Saude Prod Anim.* 2006;7(1):57-86.
22. Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci.* 2004;82/83:479-86.
23. Maciel MN, Neves JP, Gonçalves PBD, Oliveira JF, Bortolotto EB, Stranier P. Programa hormonal associado ao desmame temporário, na indução de ovulação em vacas de corte. *Cienc Rural.* 2001;31(3):437-78.
24. Bartolome JA, Archbald LF, Morresey P, Hernandez J, Tran T, Kelbert D, et al. Comparison of synchronization of ovulation and induction of estrus as therapeutic strategies for bovine ovarian cysts in the dairy cow. *Theriogenology.* 2000;53(3):815-25.
25. Queiroz AAF. Manejo reprodutivo de ruminantes [dissertação]. Mossoró: Universidade Federal Rural do Semi-árido; 2010.
26. Rawson CL. Reproductive management of small dairy farms. In: Morrow DA. *Current therapy in theriogenology.* Philadelphia, PA: WB Saunder; 1986. p.390-4.
27. Herdt TH. Ruminant adaptations to negative energy balance: influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2000;16(2):215-30.
28. Grummer RR. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J.* 2008;176(1):10-20.
29. Weber C, Hametner C, Tuchscherer A, Losand B, Kanitz E, Otten W, et al. Variation in fat mobilization during early lactation differently affects feed intake, body condition, and lipid and glucose metabolism in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci.* 2013;96(1):165-80.
30. Lago EP, Pires AV, Susin I, Faria VP, Lago LA. Efeito da condição corporal ao parto sobre alguns parâmetros do metabolismo energético, produção de leite e incidência de doenças no pós-parto de vacas leiteiras. *Rev Bras Zootec.* 2001;30(5):1544-9.
31. Emerick LL, Dias JC, Gonçalves PEM, Martins JAM, Souza FA, Vale Filho VR, et al. Retorno da atividade ovariana luteal cíclica de vacas de corte no pós-parto: uma revisão. *Rev Bras Reprod Anim.* 2009;33(4):203-12.
32. Garnsworthy PC. Body condition score in dairy cows: targets for production and fertility. In: Garnsworthy PC, Wiseman J. *Recent advances in animal nutrition.* Nottingham: Nottingham University Press; 2006. p.61-86.
33. Whitman RW. Weight change, body condition and beef-cow reproduction [Thesis Ph. D.]. Fort Collins, CO: Colorado State University; 1975.
34. Lowman BGN, Scott NA, Somerville SH. *Condition scoring of cattle.* Edinburgh: The Edinburgh School of Agriculture; 1976.

35. Spitzer JC. Influences of nutrition on reproduction in beef cattle. In: Morrow DA. Current therapy in theriogenology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1986. p.231-4.
36. Machado R, Corrêa RF, Barbosa RT, Bergamaschi MACM. Escora da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2008. (Circular técnica).
37. Nicholson MJ, Butterworth MH. A guide to condition scoring of Zebu cattle. Addis Ababa: International Livestock Centre for Africa; 1986.
38. Wright IA, Rhind SM, Whyte TK, Smith AJ. Effect of body condition at calving and feeding level after calving on LH profiles and duration of the post-partum anoestrous period in beef cows. *Anim Prod.* 1992;55(1):41-6.
39. Kunkle WE, Sand RS, Era DO. Effect of body condition on productivity in beef cattle. In: Fields MJ, Sands RS. Factors affecting calf crop. Boca Raton: CRC Press; 1994. p.167-78.
40. Rodrigues ML. Anestro puerperal em vacas de corte [monografia]. Rio de Janeiro: Universidade Castelo Branco; 2006.
41. Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 2008;70(2):208-15.
42. Santos JEP, Rutigliano HM, Sá Filho MFS. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2009;110(3-4):207-21.
43. Carvalho PD, Souza AH, Amundson MC, Hackbart KS, Fuenzalida MJ, Herlihy MM, et al. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2014;97(6):3666-83.
44. Jung LCS, Louvandini H, Martha Júnior GB. Desempenho de fêmeas Nelore de reposição com suplementação alimentar na seca em pastagens renovadas. *Cienc Anim Bras.* 2009;10(2):485-95.
45. Del Fava C, Arcaro JRP, Pozzi CR, Arcaro Júnior I, Fagundes H, Pituco EM, et al. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. *Arq Inst Biol.* 2003;70(1):25-33.
46. Flores EF, Weiblen R, Vogel FSF, Roehe PM, Alfieri AA, Pituco EM. A infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. *Pesqui Vet Bras.* 2005;25(3):125-34.
47. Junqueira JRC, Freitas JC, Alfieri AF, Alfieri AA. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo* 1. *Semina Cienc Agrar.* 2006;27(3):471-80.
48. Del Fava C, Pituco EM, Genovez ME. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: experiência do instituto biológico. *Biologico.* 2007;69(2):73-9.

49. Mendes MB, Bittar JFF, Pereira WAB, Arduino GGC, Bittar ER, Panetto JCC, et al. Determinação da prevalência das principais doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba-MG. *Cienc Anim Bras*. 2009(Supl S1):772-7.
50. Manzi MP, Nóbrega DB, Faccioli PY, Troncarelli MZ, Menozzi BD, Langoni H. Relationship between teat - end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis. *Res Vet Sci*. 2012;93(1):430-4.
51. Embrapa. Controle dos principais ectoparasitos e endoparasitos em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. Bagé: Embrapa Pecuária Sul; 2000.
52. Carvalho LA, Novaes LP, Gomes AT, Miranda JEC, Ribeiro ACC. Sistema de produção de leite (Zona da Mata Atlântica) [Internet]. Juiz de fora, MG: Embrapa Gado de Leite; 2003 [cited 2014 Nov 2]. Available from: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteZonadaMataAtlantica/autores.html>.
53. Riet-correa F, Schild AL, Mendez MC, Lemos RAA. Doenças de ruminantes e equinos. Pelotas: Universitária; 1998.
54. Grecellé RA, Barcellos JOJ, Neto JB, Costa EC, Prates ER. Taxa de prenhez de vacas nelore x hereford em ambiente subtropical sob restrição alimentar. *Rev Bras Zootec*. 2006;35(4):1423-30.
55. Cubas AC, Mancio AB, Lesskiu C, Tahira JK. Efeito da amamentação controlada sobre a eficiência reprodutiva de vacas de corte no sul do Paraná. *Rev Bras Zootec*. 1985;14:247-55.
56. Williams GL, Griffith MK. Sensory and behavioural control of gonadotrophin secretion during suckling-mediated anovulation in cows. *J Reprod Fertil*. 1995;49:463-75.
57. Short RE, Bellows RA, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Custer EE. Physiological mechanisms controlling anestrus and fertility in postpartum beef cattle. *J Anim Sci*. 2000;68(3):799-816.
58. Yavas Y, Walton JS. Postpartum aciclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*. 2000;54(1):25-55.
59. Montiel F, Ahuja C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. *Anim Reprod Sci*. 2005;85(1-2):1-26.
60. Segui MS, Weiss RR, Cunha AP, Zoller R. Indução ao estro em bovinos de corte. *Arch Vet Sci*. 2002;7(2):173-8.
61. Moura ICF, Kuss F, Moletta JL, Menezes LFG, Heirique DS, Lipinski LC, et al. Desempenho de vacas de corte Purunã submetidas a diferentes manejos de amamentação. *Pesqui Agropecu Bras*. 2014;49(1):49-56.
62. Bell DJ, Spitzer JC, Bums GL. Comparative effects of early weaning or once- daily suckling on occurrence of postpartum estrus in primiparous beef cows. *Theriogenology*. 1998;50(5):707-15.
63. Gottschall CS. Desmame de terneiros de corte: Como? Quando? Por quê? Guaíba, RS: Editora Agropecuária; 2002.

64. Almeida LSP, Lobato JFP, Schenkel FS. Data de desmame e desempenho reprodutivo de vacas de corte. *Rev Bras Zootec.* 2002;31(3):1223-9.
65. Moletta JL, Perotto D. Efeito do desmame aos 70 e 210 dias sobre o desempenho ponderal e reprodutivo de vacas de corte. In: *Anais do 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira De Zootecnia*; 1997; Juiz de Fora. Juiz de Fora: SBZ; 1997. p.397-9.
66. Vaz RZ, Lobato JFP, Restle J. Productivity and efficiency of cow herds submitted to two weaning ages. *Rev Bras Zootec.* 2010;39(8):1849-56.
67. Cerdótes L, Restle J, Brondani IL, Osmari EK, Soccac DC, Santos MF. Desempenho produtivo de vacas de quatro grupos genéticos submetidas a diferentes manejos alimentares desmamadas aos 42 ou 63 dias pós-parto. *Rev Bras Zootec.* 2004;33(3):585-96.
68. Restle J, Vaz RZ, Alves Filho SC. Desempenho de vacas charolês e nelore desterneiradas aos três ou sete meses. *Rev Bras Zootec.* 2001;30(2):499-507.
69. Connor HC, Houghton PL, Lemenager RP, Malven PV, Parfet JR, Moss GE. Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. *Domest Anim Endocrinol.* 1990;7(3):403-11.
70. Pascoal LL, Eifert EC, Restle J. Níveis de proteína bruta para terneiros desmamados aos 66 dias de idade. *Rev Bras Zootec.* 2000;29(5):1537-44.
71. Restle J, Neumann M, Brondani IL. Produção do superprecoce a partir de bezerros desmamados aos 72 ou 210 dias de idade. *Rev Bras Zootec.* 2002;31(4):1803-13.
72. Almeida SP, Lobato JFP, Schenkel FS. Idade de desmame e suplementação no desenvolvimento e em características de carcaças de novilhos de corte. *Rev Bras Zootec.* 2003;32(6):1713-21.
73. Almeida LSP, Lobato JFP. Efeito da idade de desmame e suplementação no desenvolvimento de novilhas de corte. *Rev Bras Zootec.* 2004;33(6):2086-94.
74. Eifert EC, Restle J, Pascoal LL, Brondani IL, Neumann M, Silva JHS, et al. Bezerros de corte desmamados precocemente alimentados com silagem de triticales associada a diferentes níveis de concentrado. *Rev Bras Zootec.* 2004;33(6):1806-13.
75. Vaz RZ, Lobato JFP. Efeito da idade de desmame no desempenho reprodutivo de novilhas de corte expostas à reprodução aos 13/15 meses de idade. *Rev Bras Zootec.* 2010;39(1):142-50.
76. Rodríguez ROL, Segura CVM. Effect of once-daily suckling on postpartum reproduction in zebu-cross cows in the tropics. *Anim Reprod Sci.* 1995;40:1-5.
77. Bastidas P. Effect of restricted suckling on ovarian activity and uterine involution in Brahman cows. *Theriogenology.* 1984;21(4):525-32.
78. Pencai FW, Kozicki LE, Da Costa CEMP, Da Silva NL, Moletta JL, Motta JBO. Indução ao estro pós puerperal em bovinos mestiços de corte mediante o emprego de diferentes protocolos de amamentação. *Vet Zootec.* 2011;18(1):53-62.

79. Browning Jr R, Robert BS, Lewis AW, Neuendorff DA, Randel RD. Effects of postpartum nutrition and once daily suckling on reproductive efficiency and preweaning calf performance in fall-calving Brahman (*Bos indicus*) cows. *J Anim Sci.* 1993;72(4):984-9.
80. Strack AG, Moletta JL, Perotto D, Kapp O, Bren L. Efeito da amamentação controlada sobre o desempenho dos terneiros. In: *Anais da 40a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*; 2003; Santa Maria. Santa Maria: SBZ; 2003. p.53-7.
81. Chemineau P. L'effect bouc: mode d'action et efficacité pour stimuler la reproduction des chèvres en anoestrus. *INRA Prod Anim.* 1989;2(2):97-104.
82. Martin GB, Milton JT, Davidson RH, Banchero Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:231-46.
83. Izard MK. Pheromones and reproduction in domestic animals. In: Vandenberg JG. *Pheromones and reproduction in mammals*. New York: Academic Press; 1983. p.253-85.

**Recebido em: 28/09/2016**

**Aceito em: 06/02/2018**

## ALTERAÇÕES DA MEDULA ÓSSEA E A IMPORTANCIA DO MIELOGRAMA NO DIAGNÓSTICO DA EHRlichIOSE MONOCÍTICA CANINA – REVISÃO

Marília Salgado Caxito<sup>1</sup>  
Fernanda Panseri Rodrigues<sup>2</sup>  
Isis Indaiara Gonçalves Granjeiro Taques<sup>3</sup>  
Daniel Moura de Aguiar<sup>4</sup>  
Regina Kiomi Takahira<sup>5</sup>  
Antônio Carlos Paes<sup>6</sup>

### RESUMO

A Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC) é uma doença multissistêmica e de alta incidência. Contudo, a patogenia da enfermidade ainda não está totalmente esclarecida. Infiltrações plasmocitárias e linfoplasmocitárias são observadas em grande parte dos órgãos de animais acometidos, inclusive na medula óssea. Esses infiltrados sugerem que a maioria das lesões patológicas identificadas na fase crônica pode ser consequência do processo inflamatório originado no início da infecção. Este trabalho tem por objetivo destacar a importância da avaliação medular de cães com EMC. A maior compreensão das alterações medulares na fase aguda poderia esclarecer a origem das alterações observadas na fase crônica. Mais estudos são necessários para verificar se a patogenia da EMC está relacionada apenas a processos imunomediados ou se também há agressões diretas de *Ehrlichia canis* às células precursoras. Elucidar os mecanismos fisiopatogênicos de *E. canis* poderia melhorar a terapêutica instituída como também o prognóstico de animais gravemente acometidos.

**Palavras-chave:** *Ehrlichia canis*, mielograma, hematopoiese, células precursoras, processo imunomediado.

## BONE MARROW CHANGES AND THE IMPORTANCE OF THE MYELOGRAM IN DIAGNOSING CANINE MONOCYTES EHRlichIOSIS – A REVIEW

### ABSTRACT

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is a multisystemic disease with high incidence among dogs. However, its pathogenesis has not been fully elucidated. Plasma cells and lymphoplasmacytic infiltrates are observed in most organs of infected animals, including bone marrow. These infiltrates suggest that most of the pathological lesions identified in the chronic phase may be a consequence of the inflammatory process initiated at the beginning of the infection. This work aims to highlight the importance of the bone marrow evaluation of dogs with CME. A better understanding of the medullary changes in the acute phase could help clarifying the origin of clinical signs observed in the chronic phase. More studies are needed to verify whether the pathogenesis of CME is related to either the immune-mediated processes or the direct aggressions of *Ehrlichia canis* in precursor cells. Understanding the pathophysiological mechanisms of *E. canis* will improvement both current therapeutic strategies as well as the prognosis of severely affected animals.

**Keywords:** *Ehrlichia canis*, myelogram, hematopoiesis, precursor cells, immune-mediated process.

<sup>1</sup> Mestranda em Medicina Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu, SP. Correspondência.

<sup>2</sup> Médica Veterinária Residente do Laboratório Clínico Veterinário, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu, SP.

<sup>3</sup> Doutoranda em Ciências Veterinárias, FAMEVZ, Universidade Federal do Mato Grosso – Cuiabá, MT.

<sup>4</sup> Docente, Departamento de Clínica Médica Veterinária, FAMEVZ, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT.

<sup>5</sup> Docente, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu, SP.

<sup>6</sup> Docente, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP – Botucatu, SP

## ALTERACIONES EN LA MÉDULA ÓSEA Y LA IMPORTANCIA DEL MILOGRAMA EN EL DIAGNOSTICO DE EHRLICHIOSIS MONOCITICA CANINA – REVISIÓN

### RESUMÉN

La Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) es una enfermedad multisistémica de alta incidencia. Sin embargo, su patogénesis de la enfermedad aún no ha sido elucidada. Las infiltraciones plasmocitarias y linfoplasmocitarias se observan en la mayoría de los órganos de animales afectados, incluyendo la médula ósea. Estas infiltraciones sugieren que la mayoría de las lesiones patológicas identificadas en la fase crónica son una posible consecuencia del proceso inflamatorio iniciado a comienzos de la infección. Este estudio propone destacar la importancia de evaluar la médula en perros afectados por EMC. Una mejor comprensión de los cambios medulares en la fase aguda podría aclarar el origen de los signos clínicos observados en la fase crónica. Esta revisión concluye la necesidad de un mayor número de estudios para verificar si la patogénesis de EMC se relaciona únicamente con procesos autoinmunes o con ataques directos de *Ehrlichia canis* a las células precursoras. Una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de *E. canis* podría permitir un mejoramiento tanto del enfoque terapéutico como del pronóstico de los animales gravemente afectados.

**Palabras-clave:** *Ehrlichia canis*, mielograma, hematopoiense, células precursoras, proceso autoinmune.

### INTRODUÇÃO

A Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC) é causada por bactérias gram-negativas, pleomórficas pertencentes ao gênero *Ehrlichia*, das quais a *Ehrlichia canis* (*E. canis*) é a espécie que se destaca no Brasil (1). Estudos epidemiológicos em diversas regiões do país demonstraram que cerca de 20% dos cães apresentam a doença (2). Embora a infecção em áreas rurais esteja presente, cães que residem em ambiente urbanizado são os mais acometidos já que populações do carrapato vetor, *Rhipicephalus sanguineus*, são mais abundantes nessas regiões (3).

A doença nos cães pode ser aguda, subclínica ou crônica. Contudo, a fase crônica revela alta mortalidade mesmo com antibioticoterapia instituída. As razões para o desenvolvimento desta fase não é elucidado, contudo, nota-se forte influência do sistema imunológico. Hipergamaglobulinemia, acúmulo de células linfóides e plasmocitose generalizada são alterações comumente observadas nos cães infectados. Estes achados comuns em cães portadores de EMC indica resposta humoral exacerbada associada à patogênese da enfermidade (4).

Alterações em sangue periférico podem ser observadas em qualquer fase da afecção e não são suficientes para determinar a fase da doença. A avaliação medular pode auxiliar não apenas na determinação correta da fase da infecção como identificar melhor as desordens hematológicas e, em alguns casos, adiantar-se a essas alterações (5).

### REVISÃO DE LITERATURA

#### *Etiopatogenia e manifestações clínicas e hematológicas*

Por ser um parasita intracelular obrigatório, o agente etiológico invade células do sistema fagocítico mononuclear e, após multiplicar-se em macrófagos por fissão binária, se dissemina pelo organismo do hospedeiro. O vetor necessita de pouco tempo para transmitir a infecção. Estudos recentes comprovaram que apenas 3 horas de fixação são suficientes para os animais parasitados se tornarem infectados (6).

Os principais sinais clínicos da EMC são inespecíficos, tais como apatia, anorexia, linfadenomegalia, evidente hepatoesplenomegalia, perda de peso, descargas nasais e oculares e febre. Alterações no sangue periférico podem ser observadas entre 5 e 18 dias pós-infecção (PI). Em média, 10 dias PI já são suficientes para o estabelecimento da trombocitopenia, que é a principal característica da EMC (4). Um dos fatores que contribui para essa diminuição plaquetária é a destruição mediada por células do sistema imune do hospedeiro. Em infecções agudas naturais e experimentais os anticorpos ligados a plaquetas e anticorpos antiplaquetários têm demonstrado papel importante na patogenia da doença (7). A anemia também é frequentemente observada na EMC e está relacionada à supressão da atividade eritropoiética. Citocinas inflamatórias (IL-1, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) são liberadas pelas células infectadas causando anemia da inflamação (8).

A intensidade das alterações varia de acordo com a fase da infecção (7). Contudo, cães que evoluem para forma crônica também podem apresentar, além dos sinais supracitados, diáteses hemorrágicas. No hemograma desses animais, se observa grave pancitopenia (marcada trombocitopenia, anemia arregenerativa e leucopenia intensa). A alta mortalidade nesta fase é resultante da síndrome hemorrágica e/ou infecções secundárias (4). O diagnóstico precoce com a identificação correta da fase da infecção e rápida instituição do tratamento são fundamentais para evitar alta letalidade nos cães.

A diminuição da contagem plaquetária ocorre em todas as fases da doença, utilizado como indicador clínico de suspeita de EMC. O diagnóstico definitivo é firmado pela visualização de agrupamentos intracitoplasmáticos (mórulas) nos monócitos circulantes em esfregaços sanguíneos, presença de altos títulos de anticorpos para *E. canis*, detecção do DNA da bactéria pela PCR ou, ainda, pelo isolamento do agente em cultivos celulares (7).

Apesar de normalmente não serem exames solicitados nos casos de EMC, aspirados ou biópsias medulares podem auxiliar no acompanhamento e principalmente no prognóstico de cães acometidos pela EMC. O mielograma consiste na identificação de mórulas de *E. canis*, exclusão de outras causas de pancitopenia ou desordens hematológicas e avalia precursores hematopoiéticos. Além disso, a punção medular é necessária na determinação da fase da doença e com isso pode-se eleger o melhor tratamento para os animais doentes. Evidências sugerem que mecanismos no início da infecção podem ser responsáveis por muitas lesões patológicas observadas na fase crônica. Estudos para identificar alterações medulares da EMC, principalmente na fase aguda, podem esclarecer alterações irreversíveis da fase crônica e elucidar a patogenia da EMC.

### **Alterações medulares na EMC aguda**

A avaliação de medula óssea é indicada nos casos de bicitopenias ou pancitopenias persistentes, anemias arregenerativas, desordens mieloproliferativas, febre de origem desconhecida ou a combinação de dois ou mais dos fatores citados (5). Considerado como importante método de diagnóstico nas doenças infecciosas, o mielograma auxilia também no prognóstico da EMC uma vez que além de diferenciar outras causas de pancitopenia possibilita, também, diagnosticar desordens hematológicas primárias, verificar possíveis áreas de hematopoiese ativas e avaliar os precursores eritróides, mielóides e megacariocíticos.

As alterações medulares de cães com EMC nas diferentes fases são bem distintas. Acredita-se que essas alterações podem ser causadas pela supressão hematopoiética secundária à infecção por *Ehrlichia* sp. A intensidade da supressão e/ou destruição da medula óssea está associada à produção deficiente de um ou mais elementos sanguíneos, dependendo da fase da doença. O comprometimento medular indica agressão não só ao estroma vascular, mas também às células precursoras. Como mórulas de *E. canis* podem ser encontradas em sangue periférico e em aspirados medulares a partir de 15 dias PI (9), uma hipótese seria de que as células-tronco sejam infectadas por *E. canis* resultando na falha do metabolismo dessas células e, conseqüentemente, na proliferação celular (4,9,10).

Estudos citológicos de medula óssea em cães experimentalmente infectados apresentando EMC na fase aguda revelaram aumento inicial na proporção mielóide:eritróide (M:E) e na  
Caxito MS, Rodrigues FP, Taques IIGG, Aguiar DM. et al. Alterações da medula óssea e a importância do mielograma no diagnóstico da ehrlichiose monocítica canina – Revisão. Vet. e Zootec. 2018 mar.; 25(1): 61-66.

concentração média de megacariócitos a partir de 1 dia até 2 meses PI. O aumento da relação M:E provavelmente está associado à hipoplasia eritróide, devido às citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) que alteram a cinética do ferro e a disponibilidade desse íon para síntese de hemoglobina (11). Nota-se ainda que na fase aguda da enfermidade, a destruição celular é principalmente de origem periférica. Para corrigir as citopenias periféricas a medula óssea aumenta sua atividade de replicação celular e, portanto, a hiperplasia medular é facilmente compreendida (4). Até o momento, não está comprovado que anticorpos antiplaquetários também exerçam ação sobre os megacariócitos, uma vez que o curto período de vida das plaquetas na circulação sinaliza a disfunção medular. Contudo, o aumento do volume plaquetário médio (VPM) resulta da presença de macroplaquetas no sangue periférico e é interpretado como resposta megacariocítica adequada (9).

Novos estudos têm investigado a ação das citocinas na patogênese da supressão medular. Pertencentes a uma família especializada de citocinas, as quimiocinas são proteínas pequenas que atuam como potentes mediadores da inflamação e quimiotaxia de subpopulações específicas de leucócitos. As quimiocinas são essenciais para promover a resposta do hospedeiro diante da infecção e estão subdivididas em subfamílias: CXC (atuam sobre neutrófilos), CC (agem sobre eosinófilos, células *natural killer*, linfócitos e monócitos), C e CX3C, das quais as duas últimas classes são menos descritas (9). A secreção dessas quimiocinas está relacionada à presença de inclusões intracitoplasmáticas de *Ehrlichia*. Estudos *in vitro* com células medulares infectadas com *Anaplasma phagocytophilum* (agente infeccioso intimamente relacionado com *E. canis*) mostraram aumentos significativos na produção de quimiocinas da subfamília CC: Proteína Inflamatória de Macrófagos (MIP-1 $\alpha$  ou CCL3 e MIP-1 $\beta$  ou CCL4), Proteína Quimiotática Monocítica (MCP-1 ou CCL2) e RANTES (CCL5) e da subfamília CXC: IL-8 (CXCL8) (12). Enquanto baixas concentrações de MIP-1 $\alpha$  e IL-8 agem sinergicamente regulando a hematopoiese, altas concentrações de MIP-1 $\alpha$ , IL-8 e MCP-1 suprimem a proliferação de células precursoras. Incapaz de compensar as anemias arregenerativas discretas na doença aguda, a medula óssea demonstra mau funcionamento da eritropoiese em cães portadores de EMC (9,12).

### Alterações medulares na EMC crônica

Alguns cães convalescentes da doença crônica podem apresentar normocelularidade no mielograma sugerindo supressão medular moderada. Entretanto, a fase crônica caracteriza-se por hipocelularidade medular acentuada dos três tipos celulares (eritróide, mielóide e megacariocítica), não raro evoluindo para falência medular (Figura 1). Animais acometidos pela doença crônica grave e que evoluem para óbito mesmo depois de instituído o tratamento comumente apresentam aplasia medular persistente observada após a hipergamaglobulinemia. A terapia imunossupressora instituída quando a concentração de anticorpos atinge altos títulos associada ao tratamento específico da EMC tem demonstrado resultados satisfatórios sugerindo base imunomediada da doença (9).

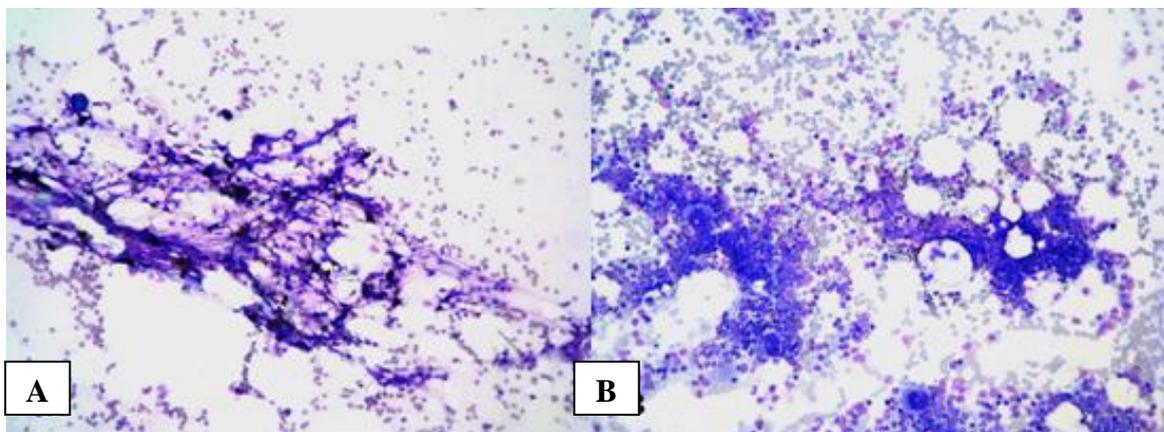


Figura 1- A: Aplasia medular de origem infecciosa (PCR positiva para *E. canis*) de um canino, SRD, fêmea de 3 anos. B: Medula hematopoieticamente ativa de um canino Poodle,

fêmea de 5 anos. Fonte: Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ – UNESP Botucatu-SP. Coloração panótico (aumento de 100x)

A patogenia da hipoplasia medular na erliquiose crônica ainda é desconhecida, mas presume-se que a resposta imunológica do organismo suprime a hematopoiese (13). A hipoplasia/aplasia de medula em infecções por *E. canis* em cães pode ainda estar relacionada aos casos de mielonecrose, tanto por danos diretos às células hematopoiéticas quanto por danos na microcirculação das artérias nutritivas (5). Além disso, o processo inflamatório, danos vasculares e necrose, ou secundários à anemia imunomediada, são fatores que podem levar a quadros de mielofitose como consequência da proliferação de fibroblastos. O tecido fibroso que invade a medula óssea compete com as células hematopoiéticas pelo espaço e nutrientes afetando todos os tipos celulares. Citocinas inflamatórias produzidas em doenças imunomediadas primárias ou secundárias a enfermidades infecciosas podem desencadear síndrome hemofagocítica caracterizada por esquizócitos e monócitos ativados no sangue periférico e pelo aumento de macrófagos fagocitando células precursoras sanguíneas na medula óssea e em outros órgãos linfóides como fígado, linfonodos e/ou baço (5).

### **Considerações finais**

As alterações citomorfológicas da medula óssea de cães com EMC são pouco estudadas. Contudo, o mielograma revela sua importância como exame complementar principalmente no prognóstico da EMC uma vez que, além de diferenciar outras causas de bicitopenias/pancitopenias, é possível a partir deste exame se obter informações sobre desordens hematológicas, verificar possíveis áreas de hematopoiese ativas e avaliar os precursores eritróides, mielóides, linfóides e megacariocíticos.

### **REFERÊNCIAS**

- 1 Vieira RFC, Biondo AW, Guimarães AMS, Santos AP, Dutra LH, Diniz PPVP, et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011;20(1):1-12.
- 2 Labarthe N, Pereira MC, Barbarini O, Mckee W, Coimbra CA, Hoskins J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil. *Vet Ther.* 2003;4(1):67-75.
- 3 Aguiar CLG, Pinto DM, Pappen FG, Filho NAC, Santos TRB, Farias NAR. Parâmetros da fase de vida livre de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): adaptado ao clima subtropical. *Arq Inst Biol.* 2013;80(4):375-80.
- 4 Waner T, Harrus S. Canine monocytic ehrlichiosis – from pathology to clinical manifestations. *Isr J Vet Med.* 2013;68(1):12-8.
- 5 Moraes LF, Takahira RK. Aplasia medular em cães. *Rev Cienc Agroveter.* 2010;9(1):99-108.
- 6 Sainz A, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, et al. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors.* 2015;8:75.
- 7 Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol.* 1998;36(1):73-6.
- 8 Harrus S, Waner T, Neer TM. *Ehrlichia canis* infection. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat.* 4th ed. St. Louis: Elsevier; 2015. p.227-56.

- 9 Waner T. Hematopathological changes in dogs infected with Ehrlichia canis. *Isr J Vet Med.* 2008;63(1):1-8.
- 10 Moreira SM, Machado R, Passos LF. Detection of Ehrlichia canis in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. *Cienc Rural.* 2005;35(4):958-60.
- 11 Harvey JW. *Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas.* St. Louis: Elsevier; 2012.
- 12 Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with Anaplasma phagocytophilum. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(3):469-89.
- 13 Harrus S, Waner T, Weiss DJ, Keysary A, Bark H. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;51(1-2):13-20.

**Recebido em: 22/02/2017**

**Aceito em: 07/02/2018**

## AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR DO NEONATO OVINO – REVISÃO DE LITERATURA

Carla Maria Vela Ulian<sup>1</sup>  
Raissa Karolliny Salgueiro Cruz<sup>1</sup>  
Maria Lucia Gomes Lourenço<sup>1</sup>  
Simone Biagio Chiacchio<sup>2</sup>

### RESUMO

Para que um problema seja relatado como patologia em um sistema orgânico é necessário que ele seja analisado e comparado ao padrão de normalidade. Poucos estudos relatam esse padrão no sistema cardiovascular de ovinos recém-nascidos deixando uma lacuna no que diz respeito às diferenças entre neonatos e os adultos. Durante o primeiro mês de vida ocorrem as principais adaptações cardiocirculatórias que permitirão ao indivíduo chegar à vida adulta. A presente revisão de literatura tem por objetivo discorrer sobre alguns dos principais métodos de avaliação cardiovascular do neonato ovino, considerando o eletrocardiograma, o ecodopplercardiograma, o exame radiográfico torácico e a pressão arterial sistêmica, como os principais procedimentos, por serem métodos diagnósticos importantes, utilizados principalmente para a detecção não somente das alterações cardíacas como, também, para análise da função normal do coração.

**Palavras-chave:** Neonatologia ovina, ecodopplercardiograma, eletrocardiograma, pressão arterial sistêmica, radiologia

### EVALUATION OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM OF OVINE NEONATE – LITERATURE REVIEW

#### ABSTRACT

To report a problem like as pathologic in an organic system is necessary for it to be reviewed and compared to standard. Few studies have reported this pattern in the cardiac system of newborn sheep leaving a gap with regard to differences between these and the adults of the same species. During the first month of life occur the main cardiocirculation adaptations that allow individuals to reach adulthood. This literature review aims to discuss some of the main methods of evaluation of the cardiovascular system of ovine neonate, considering the electrocardiogram, echodopplercardiogram, chest radiographic examination and systemic arterial pressure as the main procedures to be important diagnostic methods, mainly used to detect not only the heart changes as also for analysis of the normal function of the heart.

**Keywords:** Ovine neonatology, echodopplercardiogram, electrocardiogram, radiology, sytemic blood pressure

<sup>1</sup> Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-Unesp, Botucatu-SP

<sup>2</sup> Docente DO Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-Unesp, Botucatu-SP

## EVALUACIÓN CARDIOVASCULAR DEL RECIÉN NACIDO OVINO – REVISIÓN DE LA LITERATURA

### RESUMEN

Así que un problema se divulga como patología en un sistema orgánico es necesaria que sea revisado y Comparado con el normal. Pocos estudios han informado de este patrón en el sistema cardiovascular del recién nacidos ovejas dejando un espacio con respecto a las diferencias entre recién nacidos y adultos. Durante el primer mes de vida se producen las cardiocirculatorias principales adaptaciones que permiten a los individuos llegar a la edad adulta. De esta revisión de literatura pretende discutir algunos de los principales métodos de evaluación cardiovasculares de ovinos recién nacidos, teniendo en cuenta el electrocardiograma, ecodopplercardiogram, examen radiográfico de tórax y la presión arterial sistémica, como los principales procedimientos, porque son métodos de diagnóstico importantes, utilizados principalmente para detectar no sólo los cambios del corazón como también para el análisis de la función normal del corazón.

**Palabras-claves:** Neonatología ovina, ecocardiograma doppler, electrocardiograma, presión arterial sistémica, radiología

### INTRODUÇÃO

A partir da década de 1990, a ovinocultura passou a ter papel de destaque no Brasil. Muitos produtores rurais apresentaram interesse em explorar essa produção devido dimensões territoriais, o aumento no poder aquisitivo, condições ambientais favoráveis e abertura do comércio internacional. Por ser uma espécie de médio porte, adapta-se facilmente a qualquer tipo de sistema de produção (1).

A ovinocultura brasileira apresentou ligeiro crescimento entre 2012 e 2013. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2), o efetivo de ovinos em 2013 foi de 17.290.519 milhões de cabeças, com variação positiva de 3,0% (16.789.492 de cabeças). Uma série de técnicas auxiliaram a eficiência produtiva e reprodutiva do rebanho, como a adoção de boas medidas de manejo sanitário e nutricional durante o período de reprodução para que ocorresse um crescimento desejável (1,3).

Um das grandes preocupações na criação de ovinos, caprinos, bovinos, equinos e suínos no Brasil e no mundo é a elevada taxa de mortalidade nos primeiros dias de vida, diminuindo os ganhos produtivos. Durante o período neonatal (primeiros 30 dias de idade) são necessários cuidados para que a taxa de mortalidade, associada a infecções e falha na transferência de imunidade passiva, não se torne alta (4).

A espécie ovina tem sido amplamente utilizada em diversos protocolos experimentais não somente na Medicina Veterinária como também em Medicina (5,6). Modelos ovinos de cardiopatia isquêmica e insuficiência cardíaca são cada vez mais utilizados em pesquisas humanas, no entanto, a extrapolação dos resultados para o cenário clínico exige o conhecimento da função cardíaca normal em neonatos ovinos (7,8).

Os exames para avaliação cardíaca como eletrocardiograma e eletrocardiograma ambulatorial/sistema Holter, ecodopplercardiograma, radiografia torácica e pressão arterial sistêmica consistem de técnicas não invasivas, bem padronizadas e extremamente úteis na obtenção de informações sobre a função cardíaca, particularmente na espécie humana e em pequenos animais. Atualmente são considerados fundamentais para o diagnóstico da maior parte das afecções cardíacas, principalmente as congênitas em humanos e animais neonatos (9).

Dentre as diferentes faixas etárias existem variações nos valores eletrocardiográficos, ecodopplercardiográficos, radiográficos e da pressão arterial sistêmica, tornando necessária a padronização dos mesmos ao se tratar de cordeiros recém-nascidos sadios (10). A realização de exames seriados para avaliação cardíaca em neonatos ovinos possibilitará a determinação do

momento da inversão da predominância do ventrículo direito sobre o esquerdo, permitindo assim o diagnóstico precoce de anormalidades congênitas (11).

Estudos aprofundados relacionados à fisiologia do neonato ovino e sua evolução clínica no período pós-parto imediato devem auxiliar no aperfeiçoamento da neonatologia veterinária, fornecendo dados que poderão ser úteis nos diversos protocolos que utilizam esta espécie como modelo experimental além de ampliar os estudos. O presente artigo tem por objetivo discorrer sobre alguns dos principais métodos de avaliação cardiovascular do neonato ovino, considerando-se o eletrocardiograma, o ecodopplercardiograma, o exame radiográfico torácico e a pressão arterial sistêmica, além de ressaltar os resultados dos estudos que utilizaram esses métodos de avaliação.

### Sistema cardiovascular

Durante a gestação, o coração do feto sofre inúmeras modificações para formar os vasos sanguíneos principais (aorta e artérias pulmonares) e, assim, transformar-se no órgão central que bombeia sangue por meio de contrações rítmicas para todo o organismo. É um órgão cônico posicionado dentro do tórax e voltado para o lado esquerdo do mediastino, estendendo-se entre o terceiro e sexto espaço intercostal, na maioria das espécies. O lado direito do coração, átrio e ventrículo, possui paredes finas e pequena força de contração para servir a circulação pulmonar (de baixa resistência). A carga de trabalho da câmara ventricular esquerda culmina com espessamento significativo (hipertrofia) da parede ventricular, aparente na maioria dos mamíferos na primeira semana de vida (12,13).

Na fase intrauterina, o sangue é oxigenado na placenta e retorna ao coração pela veia cava caudal, atingindo o átrio direito (AD) que divide o volume sanguíneo entre o ventrículo direito (VD) e o átrio esquerdo (AE) pelo forame oval. Pequena quantidade de sangue retorna dos pulmões colabados e se mistura ao sangue oxigenado do ventrículo esquerdo (VE) seguindo para a aorta ascendente que irrigará o coração e o cérebro. O sangue do AD, proveniente da veia cava cranial, é menos oxigenado e segue pelo VD até as artérias pulmonares. Apenas uma parte desse sangue atinge os pulmões devido alta resistência vascular neste circuito. No percurso das artérias encontra-se o ducto arterioso que desvia o fluxo para a aorta descendente em virtude da menor resistência vascular (14).

As comunicações intracardíacas são importantes para garantir o desenvolvimento das câmaras. O forame atua no lado direito, enquanto que o ducto atua no lado esquerdo, portanto o fechamento precoce causaria hipoplasia dos ventrículos. Em animais prematuros ou de partos distócicos, a pressão no AE não é suficiente para o completo fechamento do forame oval, e a hipóxia a que o recém-nascido é submetido, pode levar a persistência do ducto arterioso (15).

Após o nascimento, a resistência vascular pulmonar diminui rapidamente e aumenta o fluxo sanguíneo na artéria pulmonar, que receberá todo o débito do VD. O retorno venoso pulmonar aumenta a pressão no AE e comprime o septo interatrial, fechando o forame oval. Associado a baixa resistência pulmonar, o aumento da pressão sistêmica e maior tensão de oxigênio, ocorre inversão no fluxo do ducto arterioso e constrição deste vaso. O fechamento também está relacionado à circulação de citocinas pulmonares (bradicinina e prostaglandina E2). O volume de sangue que chega ao VE é igual ao que sai do VD permitindo o aumento na resistência vascular periférica e a manutenção do débito cardíaco, volume plasmático, perfusão tecidual e pressão venosa central para suprir as necessidades metabólicas da vida extrauterina (14,15).

O débito cardíaco consiste no volume total de sangue bombeado em um minuto por cada ventrículo. Nos fetos, as comunicações cardíacas e a passagem sanguínea para a mesma circulação impedem a diferenciação entre os volumes ejetados por cada ventrículo separadamente, então o débito passa a ser o total das duas câmaras. Por repassarem sangue à mesma circulação, as câmaras cardíacas possuem tamanhos e paredes de espessura iguais (1:1). Logo após o parto, a força de ejeção sofre alteração estando aumentada no VE e diminuída no VD. Com isso a relação VD:VE passa a aumentar, ou seja, segue para 1:2 na vida neonatal e se estabelece em 1:3 na vida adulta. Essa maturação miocárdica durante a fase neonatal garante a rápida resposta frente ao aumento de volume sanguíneo que chega aos ventrículos. A geometria cardíaca também se altera com a

hipertrofia esquerda e pode ser observada no tamanho do coração em relação à cavidade torácica em radiografias, no traçado eletrocardiográfico das ondas R e S, devido maior proximidade dos eletrodos, e no aumento da câmara na ecocardiografia. Em cães, as alterações provenientes da dominância do VE podem ser observadas entre o terceiro e o nono dia de vida por aumento da musculatura esquerda (13,14,16,17).

O coração possui controle autonômico e não necessita do sistema nervoso central para atuar, mas o mesmo pode sofrer influência do sistema simpático e parassimpático, representados pelas fibras adrenérgicas e pelo nervo vago, respectivamente. Quando a atuação se dá pelo sistema nervoso simpático, ocorre ativação do nodo sinusal resultando em eventos generalizados como hipertensão, taquipnéia e vasoconstrição periférica, e eventos cardíacos como taquicardia (cronotropismo positivo) e aumento da contração ventricular (inotropismo positivo). O sistema parassimpático está, fisiologicamente, relacionado com o repouso, logo atua na diminuição da frequência cardíaca (cronotropismo negativo) e da força de contração atrial (inotropismo negativo) (18).

Durante a fase fetal inicia-se o desenvolvimento do sistema autonômico e sua completa maturação se dará no período pós-parto tardio. Em humanos, o desenvolvimento completa-se aos dois anos de idade. Essa imaturidade do sistema logo após o parto pode ser observada pelas altas frequências cardíacas e respostas reduzidas dos barorreceptores tornando a força de contração miocárdica menor e limitando as respostas compensatórias frente a situações de estresse, como hipertermia e desequilíbrio ácido-básico. Nos cães, o parassimpático apresenta-se atuante apenas após a oitava semana de vida (19,20).

O período neonatal possui características singulares e devem ser respeitadas no momento da avaliação clínica. Os exames devem ser seguidos como nos adultos, mas necessitam de cuidado frente às interpretações diagnósticas. Na auscultação pode ser detectado um sopro cardíaco suave no início da sístole que, se não estiver associado a nenhum defeito congênito, é considerado fisiológico. O ritmo predominante é o sinusal, com pequenas alterações influenciadas pelo ciclo respiratório, que cessarão quando o tônus vagal estiver adaptado. O eletrocardiograma também apresenta alteração devido a mudança na orientação vetorial (eixo) por aumento das câmaras cardíacas, necessitando que os eletrodos sejam posicionados de forma a melhorar a visualização do traçado. Os índices obtidos no ecodopplercardiograma poderão acusar aumento do VD na semana logo após o parto, pois as câmaras ainda possuem características volumétricas fetais. Durante os primeiros dias, o Doppler pode apresentar um fluxo na região da aorta e artéria pulmonar correspondente ao fechamento do ducto arterioso. As imagens radiográficas poderão estar opacificadas na região intersticial por diminuição no volume de ar alveolar que, em adultos, é característico de pneumonia. Outra observação no exame radiográfico é a maior proporção do coração em relação à cavidade torácica (16,19).

### **Eletrocardiografia e Eletrocardiograma ambulatorial / Sistema Holter**

O eletrocardiograma (ECG) é um exame complementar, não invasivo e de baixo custo, que permite detectar alterações na condução elétrica cardíacas, arritmias e do eixo elétrico no plano frontal (21,22). O ECG tem sido utilizado em diversas espécies em Medicina Veterinária como a equina (23,24), bovina (25,26), caprina (27,28) e a ovina (29,30).

A espécie ovina tem sido amplamente estudada em diversos protocolos experimentais, em Medicina, como modelo para o remodelamento em insuficiência cardíaca crônica na cardiologia (31), a eletrocardiografia fetal na obstetrícia (32), e em variados protocolos farmacológicos na anestesiologia (8,29,30), devido sua similaridade à anatomia e fisiologia cardiovascular dos seres humanos (7). Além da disponibilidade, o tamanho, o baixo custo de manutenção e a rápida gestação desta espécie (33).

Os estudos eletrocardiográficos em ovelhas são exíguos, sendo um dos primeiros na espécie feito por Schultz et al. (34). Os autores pesquisaram os padrões normais do registro eletrocardiográfico em 31 ovelhas da raça Merino nas derivações do plano frontal. Os valores para frequência cardíaca, amplitude e duração das ondas P e T, e do complexo QRS foram descritos. De

acordo com o estudo há grande variação individual, sobretudo na onda T e na frequência cardíaca (60 a 197 batimentos por minuto). Vale destacar que a variação ocorrida na onda T parece ser uma característica normal do eletrocardiograma de ovinos, sem necessariamente indicar uma enfermidade. Tório et al. (35) também encontraram altos valores para frequência cardíaca (119 bpm) durante os registros eletrocardiográficos em ovinos saudáveis.

A padronização de parâmetros eletrocardiográficos em 76 cordeiros da raça Dorper foi descrita por Augusto et al. (36) em quatro diferentes faixas etárias (nascimento a três meses; três a seis meses; seis a 12 meses e acima de 12 meses), utilizando as derivações bipolares, unipolares aumentadas e precordiais. Os resultados permitiram a observação de valores estáveis entre os ovinos como a duração da onda P e do complexo QRS. Contudo parâmetros como amplitude da onda P e do complexo QRS, e o eixo elétrico cardíaco apresentaram grande variação entre os animais. Segundo os autores, a disposição diferente dos eletrodos (evitando interferência das diferenças anatômicas, como o perímetro torácico e camada de gordura) é necessária para a obtenção de resultados mais regulares.

Assim como os valores de referência para interpretação do eletrocardiograma em ovinos adultos são variáveis, pouco se conhece a cerca de sua interpretação em cordeiros neonatos. Em humanos as mudanças no eletrocardiograma, desde o nascimento até a vida adulta, são conhecidas. Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (37), a tabulação mais completa foi elaborada por Davignon et al. (38) representando um auxílio precioso na interpretação do eletrocardiograma pediátrico. O estudo eletrocardiográfico mostra as mudanças frequentes do traçado no primeiro ano de vida, particularmente no período neonatal (do primeiro ao 30º dia), refletindo as alterações anatomofisiológicas que ocorrem logo após o nascimento.

As dificuldades para estabelecer os padrões eletrocardiográficos normais tanto em crianças como em animais (39) decorrem de uma série de aspectos que devem ser considerados na análise do eletrocardiograma pediátrico. Assim como em humanos, em animais as características do traçado eletrocardiográfico devem ser avaliadas de acordo com a idade do paciente. O eletrocardiograma do recém-nascido reflete as repercussões hemodinâmicas sobre o ventrículo direito na vida intra-uterina, padrão de sobrecarga ventricular direita e as alterações anatomofisiológicas decorrentes da transição da circulação fetal para a circulação neonatal, podendo durar até dois anos nas crianças (37). As modificações são decorrentes do desenvolvimento fisiológico, do tamanho corporal, da posição do coração em relação ao corpo e da variação na conformação estrutural das câmaras cardíacas e vasos pulmonares (40).

Os parâmetros fisiológicos como frequência cardíaca em cordeiros mestiços (1/2 e 3/4 Dorper) do nascimento aos 90 dias de idade foram descritos por Lima et al. (41). A frequência cardíaca atingiu um valor máximo logo após o nascimento seguindo um decréscimo (prolongamento do intervalo RR), com o avançar da idade com valores mínimos aos 75 dias de idade. De acordo com Piccione et al. (42) há uma relação inversamente proporcional entre a idade e a frequência cardíaca até os 30 dias de vida. A frequência cardíaca superior, em relação aos adultos, em recém-nascidos de diversas espécies animais deve-se ao baixo volume sistólico durante o período neonatal (39,40).

A diminuição da frequência cardíaca com o avançar da idade (42,43) e o consequente aumento do intervalo RR descrito em ovinos por Tovar et al. (44), são reflexo das alterações nos mecanismos intrínsecos de controle da frequência cardíaca, não relacionadas ao tônus autonômico propriamente dito. A atuação intrínseca do sistema colinérgico e beta-adrenérgico na variabilidade da frequência cardíaca foi investigada em cordeiros recém-nascidos a partir da primeira a oitava semana de idade. Durante este período de crescimento, a frequência cardíaca diminuiu semanalmente.

A monitoração eletrocardiográfica feita em 24 horas permite ao clínico observar detalhes sobre o ritmo cardíaco, condução elétrica, presença ou ausência de complexos anormais do paciente durante o dia, que não são possíveis de serem detectados em um traçado eletrocardiográfico realizado em poucos minutos. Além disso, é útil para estudar a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) como indicador do equilíbrio autonômico e de redução da atividade vagal protetora contra a indução de arritmias ventriculares (45).

O eletrocardiograma ambulatorial/sistema Holter é baseado em gravações de sinais com baixa e alta frequências (0,05 a 200 Hz) capazes de detectar o segmento ST. O registro é feito na derivação bipolar modificada de três canais que permite diagnosticar ocorrências anormais de condução elétrica, sendo elas V5, V3 e derivação inferior (45,46).

Os dados obtidos podem ser lidos no domínio tempo e/ou no domínio frequência. No primeiro, a frequência dos complexos QRS é detectada em 24 horas, excluindo-se os artefatos e batimentos ectópicos, com cálculo da média e do desvio padrão. No domínio frequência, os intervalos NN (distância entre duas ondas R consecutivas) são separados em componentes com diferentes amplitudes e frequências (46).

## Radiografia

O posicionamento do coração na caixa torácica sofre modificações no decorrer da transição neonatal-jovem acarretando alterações nos diversos exames complementares que auxiliam no diagnóstico cardiológico. A radiografia de tórax fornece informações sobre a integridade anatômica das paredes torácicas e pleura, vias aéreas intratorácicas, vascularização e estado do parênquima pulmonar, além de ter maior sensibilidade para as dimensões das câmaras cardíacas (47).

Outra utilização é a determinação do tamanho cardíaco indicativo de cardiomegalia ou atrofia. Em recém-nascidos humanos a relação cardio:torácica maior que 60% indica aumento cardíaco, mas não deve ser confundida com a cardiomegalia transitória fisiológica devido aumento do ventrículo esquerdo durante o primeiro mês de vida (15). Assim como em humanos, os animais possuem características cardíacas que devem ser avaliadas de acordo com a idade do paciente atentando-se ao fato de que o recém-nascido reflete a dinâmica da vida intra-uterina e as alterações anatomofisiológicas decorrentes da transição da circulação fetal para a circulação neonatal (37).

Animais jovens possuem alta frequência respiratória e menor superfície alveolar, cerca de um terço do observado em adultos de pequenos animais, o que aumenta a movimentação torácica na tentativa de elevar o volume minuto respiratório. Isso dificulta a obtenção de boas imagens por não ser possível observar o início da expiração e, assim, ter uma imagem mais nítida (19). Em radiografias realizadas em recém-nascidos nas primeiras horas de vida, observou-se cardiomegalia transitória em razão do maior aporte sanguíneo advindo do cordão umbilical e da placenta. Associado a isso, comunicações ainda abertas como forame oval e ducto arterioso podem causar sobrecarga devido circulação bidirecional. Com o estabelecimento da circulação e respiração, esses fatores deixam de existir e o coração passa a ter tamanho normal (15).

Souza et al. (48) realizaram a mensuração cardíaca de 18 borregas Santa Inês para fins de referência literária, encontrando valores de  $10,36 \pm 0,35$  vértebras (v) para a projeção lateral direita. Caprinos da raça *West African Dwarf* (WADG) com peso de 4,8 a 14 kg foram avaliados com o objetivo de padronização do VHS para a espécie resultando no valor médio de  $10,1 \pm 0,01$  v. (49). Alguns métodos foram propostos na tentativa de padronizar o VHS nas diferentes espécies, mas nenhum pôde generalizar os valores devido a grande diferença que existe entre as espécies animais, entre as raças e as conformações torácicas (49,50).

## Ecodopplercardiografia

A avaliação ecodopplercardiográfica constitui-se de um procedimento não invasivo, que dispensa sedação e fornece uma avaliação morfofuncional fidedigna do coração e dos principais vasos (51). Importante método para o diagnóstico de doenças cardíacas congênicas, adquiridas, aumento do coração, insuficiência cardíaca entre outros (52).

Ovinos e caprinos são animais fáceis de manejar e, por possuírem caixa torácica e coração com tamanho semelhante ao dos humanos, foram escolhidos como modelo para pesquisas cardiológicas, principalmente quando necessitam de medidas em exercício (53). Mesmo tendo utilidade em Medicina, poucos estudos relatam todas as dimensões cardíacas ou se quer diferenciam os índices em animais jovens e adultos (30).

As imagens obtidas a partir de pacientes recém-nascidos demandam atenção aos padrões de crescimento e desenvolvimento anatômico das câmaras, pois após o nascimento as dimensões se

modificam, o ventrículo esquerdo passa a ter maior massa quando comparado ao ventrículo direito. Em cães, sabe-se que o aumento de peso está diretamente ligado ao aumento do VE (19). Uma vantagem na avaliação ecocardiográfica em recém-nascidos é a proximidade do coração com o tórax e menor cobertura de gordura na região esternal, permitindo a obtenção de melhores imagens (16).

Hallowell et al. (30) estudaram as dimensões das câmaras cardíacas e os índices normais em ovelhas e cabras adultas, afim de facilitar a identificação, quantificação e avaliação das doenças cardíacas, além da diferenciação entre as espécies. Os ovinos, quando comparados aos caprinos, possuem dimensões ventriculares maiores, o que explica o formato do tórax diferente entre as espécies. Caprinos e ovinos necessitam de medidas de referências espécie-específicas baseadas na mesma técnica e metodologia, pois isso pode interferir nas análises. Os resultados obtidos não puderam ser comparados e definidos como fidedignos por não haver dados na literatura para comparação.

As mudanças no VD são mais lentas, pois dependem da FC. Quanto mais alta, menor o tempo de permanência do sangue no ventrículo, logo não há estímulo para a distensão da câmara. À medida que a FC diminui, juntamente com a contratilidade, o volume residual aumenta e força a mudança na capacidade volumétrica. Em recém-nascidos humanos, essa contratilidade decresce após 24 horas. Outro fator que pode incrementar o amadurecimento do VD é o fechamento do ducto arterioso (54).

### **Pressão Arterial Sistêmica**

A avaliação da pressão sanguínea arterial é uma ferramenta importante e indispensável na prática clínica veterinária, devido sua utilidade no diagnóstico, tratamento e acompanhamento de diversas doenças, bem como a monitorização de pacientes anestesiados ou sob cuidados intensivos (55). As técnicas empregadas na mensuração compreendem a forma invasiva ou direta, e não invasivas ou indiretas. A forma invasiva é a técnica mais precisa e considerada por grande parte dos autores como o “padrão ouro”, pois proporciona uma avaliação mais fidedigna da pressão arterial (PA). Requer a colocação de um cateter numa artéria periférica, que apesar de tecnicamente mais difícil e dispendiosa, é a exigida em determinadas situações clínicas, incluindo cirurgia, traumatologia e na medicina de cuidados intensivos (56). Tem como vantagem a monitorização continuada da PA e a facilidade para se colher amostras sanguíneas para realização de hemogasometria (57).

A monitoração indireta é a mais utilizada nas clínicas por ser de fácil realização não requerendo sedação ou anestesia do paciente, ou qualquer intervenção invasiva gerando estresse no animal. Utiliza um manguito que bloqueia, momentaneamente, o fluxo da artéria periférica e por meio de palpação, auscultação, doppler ou oscilometria, detecta-se a movimentação do fluxo sanguíneo ou da parede arterial (58).

Em cordeiros, a pressão sanguínea arterial sofre modificações a partir do parto. O fechamento dos desvios vasculares e a ruptura do cordão umbilical aumentam a pressão sistêmica e a partir da terceira semana, por diminuição da concentração de catecolaminas circulantes e do tônus adrenérgico, a pressão começa a atingir valores semelhantes aos adultos. Uma vez que o ducto arterial está fechado e a resposta pulmonar completamente estabelecida, a pressão pulmonar também estabiliza próximo a dos adultos (59).

Em adultos, a pressão arterial é controlada pelo balanço entre o simpático e parassimpático, e pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona. As alterações pressóricas produzem sensibilização dos barorreceptores, do córtex renal e das adrenais. Estes respondem com modificações na resistência vascular periférica, frequência cardíaca, volume sanguíneo e reabsorção de sódio (60).

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os neonatos, sejam eles ovinos ou de outra espécie, possuem características fisiológicas singulares e por isso merecem maior atenção durante a fase de maturação orgânica. Por serem

animais de uso experimental para a cardiologia humana e veterinária, definir a fisiologia e os períodos de maior desenvolvimento cardíaco possibilitam melhores resultados e conclusões clínicas. Pesquisas sobre os diferentes padrões de avaliação cardiovascular do neonato ovino, orientam a propor um protocolo de avaliação, pois várias das alterações podem refletir simplesmente em uma resposta compensatória ao período crítico de adaptação do recém-nascido.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa e do auxílio à pesquisa (2012/15144-5 e 2012/14281-9).

## REFERÊNCIAS

1. Viana JGA. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. *Rev Ovinos*. 2008;12:1-9.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tabela 1 – Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as categorias – Brasil – 2012 – 2013. *Produção da Pecuária Municipal*. Rio de Janeiro: IBGE; 2013.
3. Ulian CMV. Avaliação da absorção colostrar em neonatos ovinos da raça Bergamácia [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2011.
4. Rook JS, Scholman G, Wing-Proctor S, Shea ME. Diagnosis and control of neonatal losses in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1990;6:531-62.
5. Borenstein N, Bruneval N, Behr L, Laborde F, Montarras D, Dairès JP, et al. An ovine model of chronic heart failure: Echocardiographic and tissue Doppler imaging characterization. *J Card Surg*. 2006;21:50-6.
6. Jousset F, Tenkorang J, Vesin JM, Pascale P, Ruchat P, Rollin AG, et al. Kinetics of atrial repolarization alternans in a free-behaving ovine model. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012;23:1003-12.
7. Rabbani S, Ahmadi H, Fayazzadeh E, Sahebjam M, Boroumand MA, Sotudeh M, et al. Development of an ovine model of myocardial infarction. *Aust N Z J Surg*. 2008;78:78-81.
8. Locatelli P, Olea FD, Lorenzi A, Salmo F, Janavel GLV, Hnatiuk AP, et al. Reference values for echocardiographic parameters and indexes of left ventricular function in healthy, young adult sheep used in translational research: comparison with standardized values in humans. *Int J Clin Exp Med*. 2011;4:258-64.
9. Gompf RE, Tilley LP. Comparison of lateral and sternal recumbent positions of Electrocardiography of the cat. *Am J Vet Res*. 1979;40:1483-6.
10. Unshelm J, Thielscher HH, Haring F, Hohns H, Pfeleiderer UE, Schutzbar WV. Elektrokardiographisch untersuchungen bei schafen unter berücksichtigung der rasse, des lebensalters und anderer einflubfaktoren. *Zbl Vet Med A*. 1974;21:479-91.
11. Silva VT, Silva JA. Avaliação cardiovascular do neonato. *Rev SOCERJ*. 2000;13:13-21.

12. Dyce KM, Wensing CJG, Sack WO. Sistema cardiovascular. In: Dyce KM, Wensing CJG, Sack WO. Tratado de anatomia veterinária. 4a ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2010. p.223-67.
13. Stephenson RB. Fisiologia cardiovascular. In: Klein BG. Cunningham tratado de fisiologia veterinária. 5a ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2013. p.158-260.
14. Liebman J. The normal electrocardiogram in the newborn and neonatal period and its progression. *J Electrocardiol.* 2010;43:524-9.
15. Swischuk LE. Diagnostico por imagens em neonatologia e pediatria. Rio de Janeiro: Revinter; 1991.
16. Voss E. Cardiovascular System. In: McAuliffe SB, Slovis NH. Color atlas of disease and disorders of the foal. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p.189-211.
17. Lourenço MLG, Machado LHA. Características do período de transição fetal-neonatal e particularidades fisiológicas do neonato canino. *Rev Bras Reprod Anim.* 2013;37:303-8.
18. Miranda-Vilela AL. Componentes do sistema cardiovascular [Internet]. 2011 [cited 2016 Aug 2]. Available from: <http://www.afh.bio.br/cardio/cardio2.asp>.
19. Bright JM. The cardiovascular system. In: Hoskins JD. Veterinary pediatrics. dogs and cats from birth to six months. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995. p.95-123.
20. Landrot IR, Roche FR, Pichot V, Teyssier G, Gaspoz JM, Barthelemy JC, et al. Autonomic nervous system activity in premature and full-term infants from theoretical term to 7 years. *Auton Neurosci Basic.* 2007;136:105-9.
21. Camacho AA, Mucha CJ. Sistema circulatório: semiologia do sistema cardiocirculatório de cães e gatos. In: Feitosa FL. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. 3a ed. São Paulo: Rocca; 2014. p.241-62.
22. Mendes-Netto D. Sistema circulatório: semiologia do sistema cardiovascular de equinos e ruminantes. In: Feitosa FL. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. 3a ed. São Paulo: Rocca; 2014. p.207-41.
23. Yonezawa LA, Barbosa TS, Kohayagawa A. Eletrocardiograma do equino. *Rev Cienc Agroveter.* 2014;13:84-93.
24. Cruz RKS, Alfonso A, Lourenço MLG, Ulian CMV, Sudano MJ, Oba E, et al. Electrolyte, blood gas and electrocardiographic profile of neonatal foals in the first 48 hours of life. *Acta Sci Vet.* 2015;43:1321.
25. Oliveira PCL, Paneto JCC, Ruas-Neto JF, Silva RC. Padronização da técnica de execução e parâmetros eletrocardiográficos normais, em derivações periféricas, para bovinos indianos adultos (*Bos taurus indicus*) da raça Nelore. *Rev Ceres.* 2008;55:224-30.
26. Nunes RB, Ferreira CFX, Aboin RM, Deus HG, Saito ME, Yonezawa LA. Parâmetros eletrocardiográficos de novilhas da raça Jersey. *Arch Vet Sci.* 2014;19:17-23.

27. Pogliani FC, Birgel-Junior EH, Monteiro BM, Grisi-Filho JHH, Raimondo RFS. The normal electrocardiogram in the clinically healthy Saanen goats. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33:1478-82.
28. Atmaca N, Şimşek O, Emre B. Some electrocardiographic values of Angora goats. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2014;61:15-9.
29. Clutton ER, Glasby MA. Cardiovascular and autonomic nervous effects of edrophonium and atropine combinations during neuromuscular blockade antagonism in sheep. *Vet Anaesth Analg.* 2008;35:191-200.
30. Hallowell GD, Potter TJ, Bowen IM. Reliability of quantitative echocardiography in adult sheep and goats. *BMC Vet Res.* 2012;8:181.
31. Navarro FB, Costa FDA, Mulinari LA, Pimentel GK, Roderjan JG, Vieira ED, et al. Avaliação do comportamento biológico de homoenxertos valvares pulmonares descelularizados: estudo experimental em ovinos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2010;25:377-87.
32. Assad RS, Thomaz PG, Valente AS, Costa R, Barbero-Marcial M, Oliveira SA. Avaliação experimental de novo eletrodo para implante de marca-passo em fetos. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2006;21:272-82.
33. Dixon JA, Spinale FG. Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. *Circ Heart Fail.* 2009;2:262-71.
34. Schultz RA, Pretorius PJ, Terblanche M. An electrocardiographic study of normal sheep using a modified technique. *Onderstepoort J Vet Res.* 1972;39:97-106.
35. Torio R, Cano M, Montes A, Prieto F, Benedito JL. Comparison of two methods for electrocardiographic analysis in Gallega sheep. *Small Rumin Res.* 1997;24:239-46.
36. Augusto CFB, Leme MC, Larsson MHMA, Sucupira MCA. Padronização de parâmetros eletrocardiográficos de ovinos da raça Dorper [Internet]. 2006 [cited 2016 Apr 7]. Available from: <https://sistemas.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=4329&numeroEdicao=15>.
37. Sociedade Brasileira De Cardiologia. Diretrizes de interpretação do eletrocardiograma de repouso. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2003 [cited 2016 Apr 7];80. Available from: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/sbc-palm/diretrizes.asp>.
38. Davignon A, Rautaharju P, Boiselle E, Soumis F, Megelas M, Choquette A. Normal ECG standards for infants and children. *Pediatr Cardiol.* 1980;1:123-34.
39. Lourenço MLG, Ferreira H. Electrocardiographic evolution in cats from birth to the 30 days of age. *Can Vet J.* 2003;44:914-7.
40. Nogueira SSS, Faria EG, Sousa MG. Avaliação do eletrocardiograma em cães e gatos neonatos. *Medvop Ver Cient Med Vet.* 2010;8:101-7.
41. Lima CCV, Silva DFM, Costa JN, Costa-Neto AO, Souza TS. Parâmetros fisiológicos de cordeiros mestiços (1/2 e 3/4 Dorper) do nascimento aos 90 dias de idade. *Rev Bras Saude Prod Anim.* 2010;11:354-61.

42. Piccione G, Borruso M, Fazio F, Giannetto C, Caola G. Physiological parameters in lambs during the first 30 days postpartum. *Small Rumin Res.* 2007;72:57-60.
43. Ulian CMV, Koether K, Lourenço MLG, Gonçalves RS, Sudano MJ, Cruz RKS, et al. Physiological parameters in neonatal lambs of the Bergamasca breed. *Acta Sci Vet.* 2014;42:1183.
44. Tovar P, Castejon FM, Santisteban R. Analisis de la sístole electrica ventricular de ovinos. I Fenómenos de despolarización. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;33:365-72.
45. Sosa EA, Terzi R, Gruppi C, Brito FS, Paola AAV, Pimenta J, et al. Consenso SOCESP-SBC sobre eletrocardiografia pelo sistema holter. *Arq Bras Cardiol.* 1995;65:447-50.
46. Lorga-Filho A, Cintra FD, Lorga A, Grupi CJ, Pinho C, Moreira DAR, et al. Recomendações da sociedade brasileira de arritmias cardíacas para serviços de holter. *Arq Bras Cardiol.* 2013;101:101-5.
47. Gabay A. Radiologia Cardiovascular. In: Belerenian GC, Mucha CJ, Camacho AA. Afecções cardiovasculares em pequenos animais. São Caetano do Sul: Interbook; 2003. p.40-5.
48. Souza PM, Rodello L, Inamassu LR, Monteiro CDT, Babicsak V, Machado VM, et al. Radiographic evaluation of the cardiac silhouette by the method of measurement VHS (vertebral heart size) in Santa Ines Boregas clinically normal. In: Abstract Book – 27o World Buiatrics Congress; Lisboa; 2012. Lisboa: World Association for Buiatrics; 2012. p.155.
49. Ukaha RO, Kene ROC, Gbonko OE. Vertebral scale system to measure heart size in thoracic radiographs of west african dwarf goats. *NVJ.* 2013;34:912-6.
50. Martini AC, Meireles YS, Monzem S, Vasconcelos LP, Turbino NCMR, Dahroug MAA, et al. Avaliação radiográfica da silhueta cardíaca, pelo método VHS (Vertebral Heart Size), de quatis (*Nasua nasua*, Linnaeus 1766) jovens e adultos mantidos em cativeiro. *Semina Cienc Agrar.* 2013;34:3823-30.
51. Boon JA. Veterinary ecocardiography. 2nd ed. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2011.
52. McGuirk SM, Reef VB. Doenças do sistema cardiovascular. In: Smith BP. Medicina interna de grandes animais. 3a ed. São Paulo: Manole; 2006. p.445-6.
53. Leroux AA, Moonen ML, Farnir F, Sandersen CF, Deleuze S, Salciccia A, et al. Two-dimensional and M-mode echocardiographic reference values in healthy adult Saanen goats. *Vet Rec.* 2012;170:154.
54. Tamura M, Harada K, Ito T, Takahashi Y, Ishida A, Takada G. Changes in right ventricular volume in early human Neonates. *Early Hum Dev.* 1997;48:1-9.
55. Carvalho BVLA. Hipertensão arterial felina [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa; 2009.
56. Fox P, Sisson DD, Moise NS. Systemic hypertension: recognition and treatment. In: Fox P, Sisson DD, Moise NS. Textbook of canine and feline cardiology – principles and clinical practice. Philadelphia: Saunders; 1999. p.795-813.

57. Egner B, Carr A, Brown S. Essential facts of blood pressure in dogs and cats. 3a ed. Babelnhausen, GER: Vet Verlag; 2003.
58. Littman MP. Distúrbios hipertensivos e hipotensivos. In: Ettinger SJ. Tratado de medicina interna veterinária. 4a ed. São Paulo: Manole; 1997. p.128-35.
59. Woods-Jr JR, Dandavino A, Murayama K, Brinkman CR, Assali NS. Autonomic control of cardiovascular functions during neonatal development and in adult sheep. Circ Res. 1977;40:401-7.
60. Stephenson RB. Fisiologia cardiovascular. In: Klein BG. Cunningham tratado de fisiologia veterinária. 5a ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2013. p.158-260.

**Recebido em: 03/10/2016**

**Aceito em: 07/02/2018**

## COLANGITE CRÔNICA ASSOCIADA À INFESTAÇÃO DE TREMATÓDEO POR *PLATYNOSOMUM FASTOSUM*, CONCOMITANTE À VESÍCULA BILIAR DUPLA EM UM GATO – RELATO DE CASO

Karina Maria Basso<sup>1</sup>  
Alexandre Arenales<sup>2</sup>  
Nazilton de Paula Reis Filho<sup>3</sup>  
Mauro José Lahm Cardoso<sup>4</sup>  
Celmira Calderón<sup>4</sup>

### RESUMO

Este trabalho tem o objetivo de relatar um caso de um felino de cinco anos, sem raça definida, apresentando icterícia intensa, petéquias e equimoses cutâneas generalizadas, aumento da enzima ALT, aumento de colesterol sérico e diminuição de proteínas plasmáticas. Foi instituído tratamento médico, entretanto o animal morreu dois dias após a intervenção clínica. No exame anatomopatológico observou-se colangite crônica associada à infestação de trematódeo *Platynosomum fastosum* e vesícula biliar dupla verdadeira. Conclui-se que alterações anatômicas associadas à infestação por parasitas podem agravar significativamente o quadro clínico de colangite crônica e devem sempre ser consideradas no plano diagnóstico.

**Palavras-chave:** Anomalias congênitas da vesícula biliar, trematódeo hepático, colangite crônica.

## CHRONIC CHOLANGITIS ASSOCIATED WITH LIVER FLUKE INFESTATION CAUSED BY *PLATYNOSOMUM FASTOSUM*, CONCURRENT WITH GALLBLADDER DUPLICATION IN A DOMESTIC CAT – CASE REPORT

### ABSTRACT

This paper aims to report a case of a 5-years-old, mixed breed cat showing severe jaundice, skin petechiae and ecchymosis, high values of ALT enzyme and serum cholesterol and low plasmatic proteins. A medical treatment was instituted; however the animal died two days after clinical intervention. Anatomicopathological analysis showed a chronic cholangitis associated with liver fluke infestation caused by *Platynosomum fastosum*, and duplex gallbladder. We conclude that anatomical changes associated with infestation by parasites may significantly aggravate the clinical condition of chronic cholangitis and should always be considered in the diagnostic plan.

**Key words:** gallbladder congenital anomalies, hepatic fluke, chronic cholangitis.

## COLANGITIS CRÔNICA ASOCIADA A LA INFESTACIÓN POR TREMATODO HEPÁTICO CAUSADO POR *PLATYNOSOMUM FASTOSUM*, CONCURRENTENTE CON LA DUPLICACIÓN DE LA VESÍCULA BILIAR EN EL GATO DOMÉSTICO - PRESENTACIÓN DE UN CASO

### RESUMEN

<sup>1</sup> Doutoranda no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina. Contato principal para correspondência.

<sup>2</sup> Anatomopatologista Veterinário autônomo

<sup>3</sup> Mestrando na Universidade Estadual Paulista - Unesp campus de Jaboticabal

<sup>4</sup> Docente na Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP campus de Bandeirantes

Este trabalho pretende informar un caso de un felino de cinco años mestizo, presentando intensa ictericia, petequias y equimosis cutánea generalizada, aumento de enzima ALT, aumento del colesterol sérico y disminución de las proteínas plasmáticas. Se instituyó el tratamiento médico, pero el animal murió dos días después de la intervención clínica. El examen histopatológico mostró colangitis crónica asociada con infestación por trematodos *Platynosomum fastosum* y verdadera duplicación de la vesícula biliar. Se conclui que los cambios anatómicos asociados con la infestación por parásitos pueden agravar significativamente el cuadro clínico de colangitis crónica y siempre debe ser considerado en el plan de diagnóstico.

**Palabras Claves:** anomalías congénitas de la vesícula biliar; trematodo hepático; colangitis crónica.

## INTRODUÇÃO

Na medicina de felinos, as colangites se encontram entre as principais afecções clínicas, em especial pela susceptibilidade anatômica, onde há maior facilidade da ascensão de bactérias do intestino para trato biliar (1,2). Em 2006 a World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) propôs uma padronização na nomenclatura das doenças biliares sendo as colangites de felinos divididas em quatro grupos: colangite neutrofílica, colangite linfocítica, colangite destrutiva e a colangite crônica associada à infestação de trematódeos (3).

Dentre os quadros de colangite crônica associada à infestação de trematódeos, o *Platynosomum fastosum* é o parasita trematódeo mais comum de fígado de gatos domésticos no Brasil. Este se encontra comumente nos ductos biliares e vesícula biliar, e é capaz de causar um quadro de hepatopatia (2,4,5). O *Platynosomum fastosum* é comum nas regiões tropicais e subtropicais por todo o mundo (6); No Brasil, a prevalência do parasita varia conforme a localização do animal, alcançando de 1,91 a 45% (7).

Na maioria das vezes a infestação por *P. fastosum* é assintomática ou causa poucos sinais clínicos, entretanto deve-se considerar a carga parasitária, o tempo de parasitismo e a reação individual do hospedeiro. Portanto, nas infestações graves e crônicas é possível ocorrer obstrução dos canalículos biliares e consequente sobrecarga hepática, resultando em cirrose biliar (2,4,5,8). Microscopicamente, o fígado infestado por *P. fastosum* apresenta ectasia dos ductos biliares, e no lúmen pode-se visualizar o parasita trematódeo, caracterizado por cutícula fina, cavidade sólida, testículo, ovário e ovos operculados. Conforme aumenta a carga parasitária, a presença mecânica do parasita intraductal leva a uma obstrução de ductos biliares e colestase intra-hepática, associada à fibrose e inflamação linfocítica predominantemente portal, bem como, hiperplasia ductal. O parênquima também poderá ser afetado, em que se verifica perda da arquitetura dos cordões de hepatócitos associada a presença de colônias bacterianas e infiltrado neutrofílico. Ocasionalmente ocorre hiperplasia papilar do epitélio dos ductos; proliferação cística do epitélio ductal com preenchimento luminal por conteúdo mucinoso e a visualização de ovos operculados livres no lúmen ductal (1,9).

Outro fator que deve ser considerado é que geralmente essas infecções biliares ascendentes necessitam de algum fator predisponente como a estase biliar, colelitíase ou anormalidades anatômicas (10). A vesícula biliar dupla é uma alteração congênita, raramente observada em humanos (6,11,12), quase não descrita na medicina veterinária e leva à sobrecarga biliar com lesão hepática (13,14).

Qualquer das quatro formas de apresentação da colangite nos felinos não revela características particulares no exame físico ou anamnese, em geral os sinais são sistêmicos e inespecíficos como: êmese, anorexia, depressão, distensão abdominal, perda de peso, febre, diarreia, desidratação e icterícia (2,7,15). Portanto, o diagnóstico diferencial é importante para diferenciar qual é a forma da colangite, e este deve ser feito associado os exames auxiliares de ultrassonografia abdominal, biópsia hepática, citopatologia e cultivo da bile, para pesquisa de ovos e bactérias (5).

O presente relato se justifica pela ausência de descrições na literatura que cite a ocorrência simultânea de doenças do trato biliar em felinos, a duplicação verdadeira da vesícula biliar e infecção hepática por *P. fastosum*.

## RELATO DE CASO

Um felino de cinco anos, sem raça definida, fêmea foi encaminhado ao atendimento clínico veterinário. O animal pesava 3,2kg e apresentava histórico de emagrecimento progressivo, êmese, diarreia, anorexia, adipsia, protocolo antiparasitário atrasado e livre acesso à rua na cidade de Bandeirantes, na região do norte do Paraná. Ao exame físico demonstrou aumento da sensibilidade abdominal, icterícia intensa, petéquias e equimoses cutâneas generalizadas.

Os exames complementares solicitados revelaram aumento moderado da enzima aspartato aminotransferase (ALT) (534 UI/L), aumento de colesterol (211mg/dl), aumento da proteína total (8,8g/dl), e diminuição de albumina (1,96g/dl). O hemograma revelou leucocitose com neutrofilia e desvio a esquerda, além de discreta trombocitopenia. A urinálise evidenciou bilirrubinúria e proteinúria. Em ultrassonografia abdominal observou-se aumento da ecogenicidade em região epigástrica.

Foi instituído o tratamento com fluidoterapia com solução fisiológica com glicose 5%, acrescida de vitaminas do complexo B e C, além do uso de hepatoprotetor (Ornitil<sup>®</sup>), porém o animal morreu dois dias após o atendimento.

Ao exame necroscópico, se observou a duplicação verdadeira da vesícula biliar (Figura 1), e o fígado com consistência firme, padrão lobular evidente distribuído de maneira difusa. Macroscopicamente não se observou a presença de parasitas ou espessamento dos ductos biliares, entretanto o ducto biliar comum encontrava-se espessado e sem fluxo de bile para o duodeno (manobra de Virchow negativa).

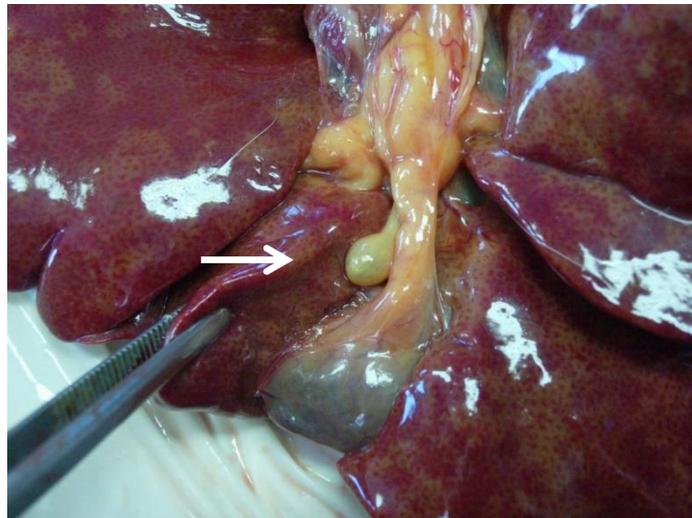


Figura 6. Fígado de felino que apresentou duplicação verdadeira da vesícula biliar (seta) e parênquima hepático com padrão lobular evidente e áreas multifocais a coalescentes, amareladas.

Microscopicamente, no fígado observaram-se ductos biliares hiperplásicos associados a intensa ectasia. Região portal com fibrose moderada associada a infiltrado linfoplasmocitário moderado (Figura 2) e no conteúdo biliar intraductal foram observados ovos operculados e de casca espessa, compatíveis com ovos de *P. Fastosum* (Figura 3). O parênquima adjacente apresentou, de forma difusa degeneração vacuolar de hepatócitos associada a moderada desorganização das trabéculas de hepatócitos.

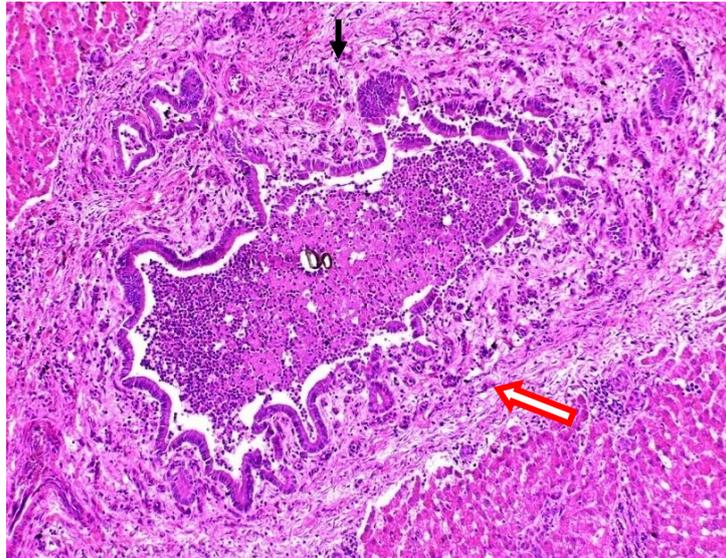


Figura 2. Fotomicrografia de fígado felino. Notar hiperplasia de células epiteliais do ducto biliar (seta preta), associado à fibrose periportal (seta vermelha). Hematoxilina e Eosina, Obj. de 10x.

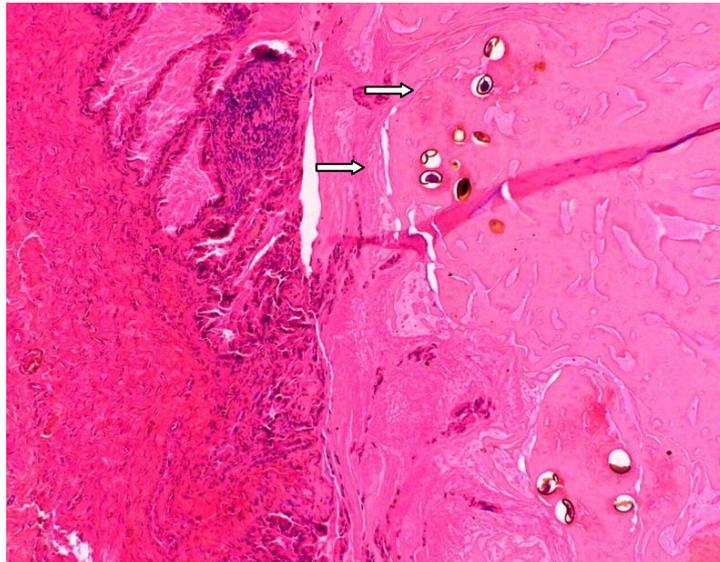


Figura 3. Vesícula biliar de felino. Notar a presença de ovos operculados (setas) de *Platynosomum fastosum* mesclados ao conteúdo da vesícula biliar. Hematoxilina e Eosina, Obj. de 10x.

## DISCUSSÃO

No presente relato de caso, os achados histopatológicos permitiram concluir um quadro de platinossomíase, devido à visualização de ovos operculados, fibrose e colangite linfocítica que envolvia a região portal e estendia-se para o parênquima. A ausência de parasitas trematódeos na análise macro e microscópica do fígado, coincide com os relatos de Headley (1), que destacou que apesar de atípica, a visualização de ovos operculados é uma característica diagnóstica do *P. fastosum*.

De acordo com a classificação da WSAVA (3), o presente caso caracteriza-se por uma colangite crônica associada à infestação de trematódeos, entretanto *P. fastosum* não é citado nessa classificação. Assim ao avaliar o presente caso e outros relatos e estudos, sua importância é indiscutível em casos de hepatopatias de felinos no Brasil.

Embora ocorra inespecificidade dos sinais sistêmicos para a colangite crônica, a disfunção hepática devido ao processo inflamatório que envolvia todo o parênquima, resultou em icterícia, petéquias e equimoses, que também foram observadas por outros autores (7) e Brain (10,11). Esta inespecificidade faz dos exames auxiliares, principalmente a biópsia hepática, pontos críticos para a elucidação do diagnóstico e uma consequente terapia adequada, assim como recomendado pela WSAVA (3).

Apesar do tratamento dos casos crônicos ou de cirrose biliar ser limitado quanto à cura, pode-se obter melhores resultados no tratamento ou aumento na sobrevivência do animal com o diagnóstico preciso e precoce.

O presente relato de caso coincide com os autores Brain (11); Stanley (15) e Pressel (6), os quais afirmaram que alterações anatômicas, como a duplicação da vesícula biliar, com sobrecarga da bile e/ou a presença de parasitas nos ductos biliares, predispõem o desenvolvimento de colangites, obstrução ductal e fibrose periportal. Carreira (8) destacou que a infestação por *P. fastosum* promove a estase biliar e pode favorecer a contaminação ascendente do trato biliar e consequentemente levar ao envolvimento hepático e agravamento do quadro. Esses aspectos estão de acordo com os relatados no presente estudo.

## CONCLUSÕES

As doenças do trato biliar em felinos, principalmente a colangite crônica por infestação parasitária, são raramente descritas na literatura, mas são de grande importância no atendimento clínico desta espécie, devido à gravidade do quadro no momento do diagnóstico. Portanto, a colangite crônica associada à infestação de trematódeos (*Platynosomum fastosum*) deve ser considerada no diagnóstico diferencial dos processos patológicos que envolvem a vesícula biliar e ductos em felinos.

A associação da anomalia congênita de vesícula biliar dupla com a infestação parasitária nos ductos e vesícula biliar intensifica o processo inflamatório hepático, dificulta o tratamento e pode, assim como presente relato, culminar no óbito do animal.

## REFERÊNCIAS

1. HEADLEY SA, FERIOLI RB, REIS ACF, BRACARENSE APFRL. *Platynosomum fastosum*-induced Infections in Domestic Shorthair Cats: a Retrospective Study of Seven Cases. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2011;4(3):227-234.
2. SAMPAIO MAS, BERLIM CM, ANGELIM AJGL et al, Infecção natural pelo *Platynosomum Looss 1907*, em gato no município de Salvador, Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 2006;7:01-06.
3. Van den Ingh, TSGAM, CULLEN JM, TWEDT DC, WINKLE TV, DESMET VJ, ROTHUIZEN J. Morphological classification of biliary disorders of the canine and feline liver . In: World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Liver Standardization Group. Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Diseases. Spain:Elsevier, 2006. p.61-76.
4. DANIEL AGT, DIAZ RF, CAMMIGNATTO LO, KAGE NK, PELLEGRINO A, COGLIATI B. Polycystic liver disease associated with *Platynosomum fastosum* infection in a cat. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2012;5(3):137-141.
5. CASTRO LS, ALBUQUERQUE GR. Ocorrência de *Platynosomum iliciens* em felinos selvagens mantidos em cativeiro no estado da Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Paras. Vet.* 2008;17:239-241.

6. PRESSEL MA, FOX LE, APLEY MD, SIMUTIS FJ. Vancomycin for multi-drug resistant *Enterococcus faecium* cholangiohepatitis in a cat. *Journal of feline medicine and surgery*. 2005;7:317-321.
7. SALOMÃO M, SOUZA-DANTAS LM, BRANCO AS, BASTOS OPM, STERMAN F, LABARTHE N. Ultrasonography in hepatobiliary evaluation of domestic cats (*Felis catus*, L., 1758) infected by *Platynosomum looss*, 1907. *The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 2005;3(1):271-279.
8. CARREIRA VS, VIEIRA RFC, MACHADO GF, LUVIZOTTO MCR. Feline cholangitis/cholangiohepatitis complex secondary to *Platynosomum fastosum* infection in a cat. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2008;17:184-187.
9. VIEIRA ALS, ECCO R, LIMA WS, GUEDES RMC. *Platynosomum fastosum* infection in two cats in Belo Horizonte, Minas Gerais State – Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2009;2(1):45-48.
10. ILHA MR, et al. Cirrose biliar em felinos associada a ectasia do ducto cístico. *Ciência Rural*. 2004;34:1147-1153.
11. BRAIN PH, BARRS VR, MARTIN P, et al. Feline cholecystitis and acute neutrofilic cholangitis; Clinical findings, bacterial isolates and response to treatment in six cases. *J. Fel. Med. Sur*. 2006;8:91-103.
12. COELHO JCU, et al. Colecistectomia Laparoscópica em um paciente com ducto cístico duplo. *Rev. Col. Bras. Circ*. 2003;30:486-488.
13. MOENTK J, BILLER DS. Bilobed gallbladder in a cat: ultra-sonographic appearance. *Journal of Veterinary Radiology and Ultrasound*. 1992;34:354-356.
14. MOORES AL, GREGORY SP. Duplex gall bladder associated with choledocholithiasis, cholecystitis, gall bladder rupture and septic peritonitis in a cat. *Journal of Small Animal Practic*. 2007;48:404-409.
15. STANLEY LM. Update on the Diagnosis and Management of Feline Cholangiohepatitis. In: *FELINE MEDICINE SYMPOSIUM, 2003, USA. Anais...USA: School of Veterinary Medicine, 2003*.

**Recebido em: 03/05/2014**

**Aceito em: 21/02/2018**

## PRE-PUBIC TENDON RUPTURE IN EWE

Gabriel Augusto Monteiro<sup>1</sup>  
Fernanda Saules Ignacio<sup>1</sup>  
Rosiara Rosária Dias Maziero<sup>1</sup>  
Carmo Emanuel Almeida Biscarde<sup>1</sup>  
Maria Clara Costa Mattos<sup>1</sup>  
Patrícia Alves Dutra<sup>1</sup>  
Sony Dimas Bicudo<sup>2</sup>

### ABSTRACT

Pre-pubic tendon rupture is an often affection in mares, rarer in ewes and cows because of an additional connection of the pre-pubic tendon found in these species. Etiology of this affection is not completely elucidated, but it is associated with many gestation affections. Treatment is usually unsatisfactory. This report aims to describe principle clinical and anatomopathologic findings in an ewe at the fifth month of gestation with pre-pubic tendon rupture. Bad general clinical status led to euthanasia. Clinical and anatomopathological findings are consistent with pre-pubic tendon rupture. The report of this case works as an alert to the possibility of the occurrence of this affection in ewes and demonstrate a necessity to the parturition assistance of these animals.

**Key words:** dystocia, gestation, sheep

## RUPTURA DO TENDÃO PRÉ-PÚBICO EM OVELHA

### RESUMO

A ruptura do tendão pré-púbico é uma afecção frequente em éguas, rara em ovelhas e vacas devido a ligação adicional do tendão pré-púbico encontrado nestas espécies. A etiologia desta afecção não está elucidada, mas está associada a muitos aspectos da gestação. O tratamento é geralmente insatisfatório. O objetivo desta nota é descrever os principais achados clínicos e anatomopatológicos de uma ovelha no quinto mês de gestação com ruptura do tendão pré-púbico. O mau estado clínico geral levou à eutanásia. Os achados clínicos e anatomopatológicos são consistentes com a ruptura do tendão pré-púbico. Esta nota funciona como alerta para a possibilidade da ocorrência desta patologia em ovelhas e demonstrar uma necessidade de assistência para o parto desses animais

**Palavras-chave:** distocia, gestação, ovelha

## RUPTURA DEL TENDÓN PRE-PÚBICO EN OVEJAS

### RESUMEN

La ruptura del tendón pre-púbico es una afección frecuente en yeguas, rara en ovejas y vacas debido a una conexión adicional del tendón prepúbico encontrado en estas especies. La etiología de esta afección no ha sido completamente elucidada, aunque está asociada con muchas afecciones de la gestación. El tratamiento es usualmente insatisfactorio. Este reporte tiene como objetivo describir los hallazgos clínicos y anatomopatológicos en una oveja en el quinto mes de gestación con ruptura del tendón pre púbico. El mal estado clínico conllevó a la eutanasia. Los hallazgos clínicos y

<sup>1</sup> Departamento de Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista -FMVZ/UNESP-Botucatu Contato principal para correspondência.

<sup>2</sup> Docente do Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/UNESP-Botucatu

anatomopatológicos son consistentes con la ruptura del tendón prepúbico. El reporte de este caso funciona como alerta ante la posibilidad de la ocurrencia de esta afección en ovejas y demuestra la necesidad de la asistencia al parto de estos animales.

**Palabras clave:** distocia, embarazo, ovejas

## INTRODUCTION

Pre-pubic tendon rupture is an often affection in mares, rarer in ewes (1) and cows (2) because of an additional connection of the pre-pubic tendon found in these species (1,3). In mares this condition is not related to age nor breed (1) and usually occurs during the last third of gestation, when fetus shows a fast growing rate (1,4).

Pre-pubic tendon rupture is clinically characterized in mares by ventral sore edema of 8 to 12cm thick (1,5), abdominal pain, walking reluctance, sweating, taquicardiy and taquipnea (1). Complete pre-pubic tendon rupture promotes ischiatic tuberosity elevation, lordose, mammary glands displacement (1) and bloody secretion secondary to the increased tension over the mammary gland and vascular ruptures (6). However, the etiology of this affection is not completely elucidated, but it is often associated with twinning, fetal membranes hidropsia (7), fetal gigantism, prolonged gestation (1) and trauma (8).

Diagnosis is difficult especially when it involves a partial rupture. Pre-pubic tendon rupture might also be differentiated to physiologic edema of the abdominal wall (1), hydroamnion, hydrallantois, vasculitis, neoplasia right cardiac failure and ventral abdominal hernia (9).

Treatment is usually unsatisfactory. Preventive treatment in mares with a remarkable edema of the ventral portion of abdomen and reluctant walk consists in an exercise restriction and abdominal support so that the abdominal viscera weight are transferred to the vertebral column (6).

Prognostic of pre-pubic tendon rupture is bad, as most of the mares and foals die during parturition. If it ends well, it is possible that the mare becomes able to do light works and unable to reproduction (1,8).

This report aims to describe principle clinical and anatomopathologic findings in a ewe with pre-pubic tendon rupture correlating it to described findings in other species.

## CASE REPORT

A three years old West Australian Merino ewe at the fifth month of gestation was assisted at the Veterinary Hospital of the São Paulo State University, FMVZ-UNESP, Botucatu-SP with excessive pendulous abdomen. Physical exam showed ventral edema, abdominal pain, walking reluctance, taquicardiy, taquipnea, ischiatic tuberosity elevation and lordose (Figure 1). Additionally, udder was cranially displaced and with hematomas.

From gynecologic exam, mucous secretion and cervical dilatation compatible with parturition were detected. Fetus showed normal moving at abdominal palpation. After physic-gynecologic exams, transabdominal ultrasound examination was done which revealed the presence of two fetus with normal development.

Based on clinical signs, general status of the animal and the proximity to birth, the ewe was kept in observation and 12 hours later it began to give birth showing abdominal and uterine contractions. With the beginning of contractions it was detected exposure of fetal membranes, however, even though cervical dilatation was satisfactory, abdominal contractions were denied and showing difficulties to expel the lambs making necessary the traction of both. Lambs showed posterior presentation and were born in good development status and were artificially fed because the absence of colostrum production by the ewe, probably because of the big compression made over the mammary glands before parturition. Lambs did not show any complication post-parturition and were discharged.



Figure 1. Ewe at the fifth month of gestation with pre-pubic tendon rupture. Large ventral distention at the place tricotomy was done for ultrasound examination.

After parturition, the ewe was apathetic, hyporexic, with placenta retention and deformation of the abdominal region. Additionally, the ewe kept with reluctance to walk and discrete lordose and as a result of the case severity, the euthanasia of the ewe was done. Anatomopathologic findings revealed a complete rupture of the pre-pubic tendon and avulsion of the muscular abdominal wall. It was also found that mucous were pale, placenta was retained in the uterus and a discrete rhinitis.

Clinical history showed consistent information of pre-pubic tendon rupture. However, definitive diagnosis is hard to be established *ante mortem* because detected signs can be found in many other conditions (1,9). Although, clinical characteristics are similar to reported in other studies (1,5) in other species. Different to the horse reports (1,10), fetus was insinuated through cervical channel even though abdominal contractions were not enough for expulsion.

Prognosis was bad (1,8), because the ewe had a discontinuation in the internal abdominal wall without possibilities of surgery correction. A bad general clinical status led to euthanasia three days after parturition.

Clinical and anatomopathological findings are consistent with a total pre-pubic tendon rupture, as reported by the literature (5), allowing the establishment of a definitive diagnosis for the case. Facts that determine the rupture are still unclear. The report of this case works as an alert to the possibility of the occurrence of this affection in ewes and demonstrate a necessity to the parturition assistance of these animals once the abdominal contractions are very wounded. This report also aims to emphasize the importance of differential diagnosis of this affection with other causes of distocia in ewes.

## REFERENCES

1. Roberts SJ. Obstetrícia veterinária y patologia de la reproduccion (teriogenologia). 2a ed. Buenos Aires: Hemisfério Sur; 1983.
2. Whalen RF. Rupture of the prepubic tendon in a cow. J Am Vet Med Assoc. 1956;1:509-10.
3. Hanson RR, Todhunter RJ. Herniation of the abdominal wall in the pregnancy mares. J Am Vet Med Assoc. 1986;189:790-3.
4. Perkins NR, Frazer GS. Reproductive emergencies in the mare. Vet Clin North Am Equine Pract. 1994;10:643-70.

5. Hendriks WK, Stout TAE, Van der Weijden GC. Spinal cord trauma in a recently foaled friesian mare as a complication of ventral abdominal rupture. *Equine Vet Educ.* 2007;19:247-50.
6. Mirza MH, Paccamonti D, Martin GS, Ramirez S, Pinto C. Theriogenology question of the month. Rupture of the prepubic tendon tearing of the abdominal tunic. *J Am Vet Med Assoc.* 1997;211:1237-8.
7. Kawcak CE, Stashak TS. Predisposing factors, diagnosis, and management of large abdominal wall defects in horses and cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1995;206:607-11.
8. Youngquist RS. Equine obstetric. In: Morrow DA. *Current therapy in theriogenology.* Philadelphia: WB Saunders; 1986. p.693-99.
9. Abdin-Bey MR, Ramadan RO. Retrospective study of hernias in goats. *Sci J King Faisal Univ.* 2001;2:77-87.
10. Jackson PGG. Rupture of the prepubic tendon in a shire mare. *Vet Rec.* 1982;111:38.

**Recebido em: 06/09/2017**

**Aceito em: 08/02/2018**

## MELANOCITOMA PERIVULVAR CONGÊNITO EM BOVINO

Juliane Teramachi Trevizan<sup>1</sup>  
Maria Emília Franco Oliveira<sup>1</sup>  
Alexandre Arenales<sup>2</sup>  
Daniela Bernadete Rozza<sup>2</sup>  
Carlos Antonio Miranda Bomfim<sup>2</sup>  
Marion Burkhardt Koivisto<sup>2</sup>

### RESUMO

O objetivo deste relato é descrever os achados clínicos, histológicos e o tratamento cirúrgico de um caso de melanocitoma congênito. Esta neoplasia é considerada rara na espécie bovina, de classificação histológica variável e comportamento biológico difícil de ser previsto.

**Palavra-chaves:** melanócitos, melanocitoma, tumor congênito.

### PERIVULVAR BOVINE CONGENITAL MELANOCYTOMA

### ABSTRACT

The objective of this report is to describe the clinical, histological and surgical treatment of a case diagnosed as congenital melanocytoma, located in perivulvar region in a half-breed cow (zebu). This neoplasia is considered rare in cattle, of variable histological classification and hard to predict biological behavior.

**Key words:** melanocytes, melanocytoma, congenital tumour.

### MELANOCITOMA PERIVULVAR CONGÉNITO EN BOVINO

### RESUMEN

El objetivo de este relato es describir los hallazgos clínicos, histológicos de un tratamiento quirúrgico de un caso diagnosticado como melanocitoma congénito. Localizado en región perivulvar en una vaca mestiza (cebuina). Neoplasia considerada rara en especie bovina, clasificación histológica variable y comportamiento biológico difícil de ser previsto.

**Palabras claves:** melanocito, melanocitoma, tumor congénito.

### INTRODUÇÃO

Neoplasias melanocíticas cutâneas são oriundas dos melanócitos e classificadas como melanocitomas quando benignos e melanomas quando malignos (1). Na espécie bovina esta neoplasia tem sido relatada na região cutânea do tórax, abdômen, lombar e nos membros, como jarrete e metacarpo (2,3), além de ocasionalmente ser encontrada nas regiões intraocular (4) e periauricular (5). O tipo congênito foi observado apenas em 1% dos casos notificados, mas compreendem 27% de todas as neoplasias de pele em bovinos (6).

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal-SP/UNESP.

<sup>2</sup> Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, campus de Araçatuba-SP/UNESP.

Trevizan J, Oliveira MEF, Arenales A, Rozza DB, Bomfim CAM, Koivisto MB. Melanocitoma perivulvar congênito em bovino. Vet. e Zootec. 2018 mar.; 25(1): 89-93.

Tumores em bezerros recém-nascidos ou jovens (> 2 meses de idade) são considerados raros e indicam uma provável natureza congênita, em que o fator genético ao invés do ambiental possa estar envolvido (6). A descrição de casos congênitos pode trazer dados relevantes para a literatura em relação ao efeito dessas neoplasias sobre a vida dos animais afetados, como risco de metástase, ascite, distocias ou outros achados clínicos que podem levar ao óbito (7). Além disso, o comportamento biológico e achados histopatológicos são considerados variáveis no melanocitoma e, que podem ser diferentes das lesões adquiridas na forma adulta comparado com casos congênitos. (2,6,8).

Informações referentes às neoplasias em bovinos são extremamente válidas tanto para compreensão da etiopatogenia, tratamento e prognóstico, como também para a redução de perdas econômicas. A ocorrência de patologias como estas em animais destinados ao abate leva a condenação da carcaça e/ou vísceras por serem consideradas impróprias para o consumo, segundo a legislação ou ainda, em muitos casos, ser responsável pela indicação de eutanásia dos animais (9,10).

Há certa carência de relatos de neoplasias em bovinos, possivelmente em virtude das descrições serem baseadas em peças de abatedouros. A ocorrência de melanocitomas na região perivulvar e de caráter congênito não foi relatada na literatura até o presente momento. Neste contexto, o objetivo deste relato é descrever os achados clínicos, cirúrgico e histopatológico de um caso de melanocitoma perivulvar congênito na espécie bovina, e compará-lo aos casos já descritos na literatura.

## RELATO DE CASO

Foi atendido nas proximidades do município de Ivinhema, estado do Mato Grosso do Sul, uma vaca, mestiça (zebuína), criada em sistema extensivo, com aproximadamente 4 anos de idade. A fêmea apresentava nódulo pendunculado perivulvar de crescimento lento, observado desde o nascimento, o qual ocorreu na mesma propriedade. No histórico genealógico verificou-se que a mãe deste animal era saudável e não apresentava nenhuma lesão semelhante. O animal com o nódulo já havia tido dois partos normais sem nenhuma complicação, apesar da grande massa perivulvar.

Ao exame clínico geral, o animal aparentava bom escore corporal, ativo e segundo histórico reprodutivo havia parido uma bezerra há dois anos por parto eutócico. No exame clínico específico, o nódulo localizado na região perivulvar esquerda media 20cm x 20cm x 8cm e apresentava consistência firme, superfície enegrecida, ulcerada e que havia previamente sido tratada contra miíase (Figura1).



Figura 1. Animal em decúbito lateral direito com destaque (seta) ao nódulo enegrecido medindo de 20cm x 20cm x 8cm, de consistência firme, ulcerado e localizado na região perivulvar esquerda.

Diante da reincidência de miíases e pensando no bem-estar do animal, optou –se pela exeresse do nódulo. Após sedação com xilazina (0,3 mg/kg/IM; Xilazin<sup>®</sup>, cloridrato de xilazina, Syntec, Brasil) e bloqueio infiltrativo com lidocaína (Anestésico-L<sup>®</sup>, cloridrato de lidocaína e epinefrina,

Pearson, Brasil), foi realizada incisão elíptica na pele e tecido subcutâneo até exérese do tumor. A massa tumoral não estava aderida a musculatura o que facilitou a ressecção cirúrgica. No entanto, durante o procedimento observou-se intensa hemorragia, devido à presença de grandes vasos que irrigavam o tumor que foi contido por ligadura com fio monofilamentar não absorvível (0.40mm).

Após ressecção cirúrgica da massa tumoral, verificou-se grande área de espaço morto ( $\pm 15$ cm), porém ao realizar a divulsão do tecido subcutâneo remanescente foi possível aproximar as bordas da ferida cirúrgica sem grandes dificuldades. O tecido subcutâneo foi aproximado com padrão de sutura simples contínuo (Cushing) e pele com ponto simples separado (Wolf), utilizando fio monofilamentar não absorvível (0.40mm). Foi instituída terapia parenteral com oxitetraciclina (20mg/kg/IM; Terramicina®LA, Pfizer, Brasil) três doses a cada 48 horas e flunexina meglumine (1.1mg/kg/IM; Flunamine®, Bayer, Brasil) por 2 dias a cada 24 horas.

A análise histopatológica revelou proliferação de alta densidade celular, nodular, expansiva e não encapsulada (Figura 2a), formada por múltiplos feixes sem direção definidos por células frouxamente agrupadas e entremeadas por estroma fibrovascular abundante (Fig. 2b). Individualmente as células mostraram citoplasma fusiforme, bem delimitado, de tamanho moderado e preenchido por quantidade abundante de grânulos enegrecidos de melanina; o núcleo mostrou-se central, pequeno e redondo com cromatina grosseiramente agregada, hipocromática e nucléolo central evidente. O pleomorfismo celular foi moderado a acentuado com baixo índice mitótico e ausência de invasão vascular. Na epiderme observou-se ausência de atividade juncional associado a uma estreita faixa de derme superior íntegra, caracterizando zona de Grenz (Fig. 2a), compatível com melanocitoma dérmico perivulvar.

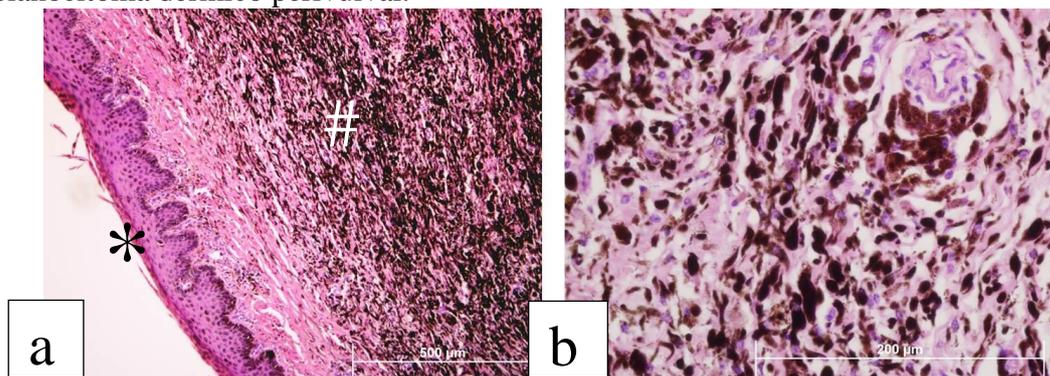


Figura 2. Corte histopatológico de melanocitoma dérmico perivulvar. a) proliferação nodular de alta densidade celular (#); zona de Grenz (\*) HE. 100x. b) células fusiformes com citoplasma preenchido por grânulos de melanina entre abundante estroma fibrovascular. Observe o pleomorfismo celular moderado a acentuado. HE. 400x.

## DISCUSSÃO

Em bovinos, os melanocitomas cutâneos são mais frequentes em rebanhos de pelagem vermelha, cinza ou preta (7). Os animais acometidos não apresentam alterações grave do estado clínico geral, no entanto, há possibilidade do tecido neoplásico se tornarem grandes massas e ulcerarem predispondo à miasas; achado comum nas grandes neoplasias ulceradas e com longo tempo de evolução ( $>11$  meses de idade) (8), como observado no presente caso.

A excisão cirúrgica de melanocitoma é sempre recomendada, considerada fácil e com baixos índices de recorrência independente da origem congênita ou adquirida (4,7). Porém, no presente caso, provavelmente devido ao longo tempo de evolução (4 anos), o grau de dificuldade da cirurgia foi maior, devido à formação de vasos sanguíneos calibrosos, presença abundante de estroma e consequentemente amplo espaço morto após a retirada da massa tumoral. No entanto, a escolha da remoção do tumor por meio de incisões em formato elíptico mostrou-se satisfatória, com prognóstico favorável, tendo em vista a boa cicatrização da ferida cirúrgica (sete dias) e a não

ocorrência de complicação pós-operatória, tais como infecções ou pneumovagina, visto o fácil contato com material fecal ou pela perda da integridade dos lábios vulvares, respectivamente.

A aparência macroscópica do melanocitoma no presente caso se assemelha com os descritos na literatura: grande nódulo solitário, firme, enegrecido e ulcerado (7,8). A coloração escura é resultado da deposição de melanina pelos melanócitos neoplásicos e considerado comum neste tipo de neoplasia, apesar dessa característica não ser excludente para o diagnóstico (2,7).

Os melanocitomas dérmicos variam de células epitelióides e/ou fusiformes, com quantidade variável de melanina intra-citoplasmática, apresentam baixo índice mitótico e pleomorfismo; fatores estes utilizados como critério de distinção com melanomas (1,6,7). Entretanto, estes achados devem ser utilizados com prudência, principalmente em lesões localizadas em junções mucocutâneas que tendem a ser mais agressivas, como descrito por Brito (8), ao relatarem um melanoma metastático na cavidade oral de uma vaca, com padrão histopatológico semelhante ao melanocitoma. Desta forma, uma observação criteriosa dos vasos linfáticos regionais e sanguíneos, principais vias de metástase (2) contribui para o diagnóstico diferencial. O predomínio de células fusiformes, núcleo pequeno, baixo índice mitótico e ausência de invasão vascular foram características suficientes para definir este caso de localização atípica como benigno.

O fator etiológico para o desenvolvimento de tumores congênitos e do melanocitoma ainda não está completamente esclarecido. Acredita-se que são de origem multifatorial, e uma possível via patogênica tem sido levada em consideração, em que estas neoplasias desenvolvem durante estágios embrionários ou imediatamente após o nascimento (7). Fatores hereditários foram associados com o desenvolvimento de melanomas em suínos recém-nascidos da raça Sinclair, pais com melanomas podem aumentar a incidência em 54% em sua prole nessa espécie, o que indica a existência de um fator transmissível pelos pais para o desenvolvimento desta neoplasia (9). Até o momento não há estudos em bovinos avaliando a relação do fator hereditário para o desenvolvimento da lesão. Infelizmente no presente caso essa teoria não foi possível de ser averiguada, devido à falta de informação referente ao histórico de todos os ascendentes na genealogia do animal, mas não pode ser descartado como possível fator etiológico envolvido.

Neoplasias melanocíticas podem desenvolver-se em diversos locais como já citados (2,4,6,7), porém no trato genital de bovinos são consideradas incomuns (10). Segundo Yeruham (10), o carcinoma de células escamosas na vulva são os mais prevalentes e a exposição solar é um dos potenciais agentes carcinogênicos. Fator este que também é mencionado em casos de melanomas, quando a exposição aos raios UVA e UVB podem induzir mutações secundárias em tecidos predispostos (2). Não é possível afirmar que fatores ambientais, como o anteriormente mencionado, foram os responsáveis pelo desenvolvimento inicial do tumor, por se tratar de uma neoplasia congênita. No entanto, supõem-se que a alta exposição solar e o tipo de sistema de criação (extensivo), em que geralmente há poucas áreas de sombreamento, também possa ter contribuído para o crescimento do tecido neoplásico.

## CONCLUSÃO

No caso relatado, o melanocitoma congênito perivulvar apresentou características clínicas e histológicas semelhantes aos casos descritos na literatura apesar da localização atípica e pelo longo tempo de evolução. O tratamento cirúrgico foi considerado satisfatório pela rápida recuperação, baixo custo e ausência de recorrência após cinco meses do pós-operatório. Apesar do prognóstico favorável e baixo risco de metástase é recomendado o descarte do animal devido a real possibilidade do fator hereditário estar associado a etiologia desta neoplasia.

## REFERÊNCIAS

1. Conceição LG, Santos RL. Sistema tegumentar. In: Santos RL, Alessi AC. Patologia veterinária. São Paulo: Roca; 2010. p.423-523.

2. Foley GL, Valentine BA, Kincaid AL. Congenital and acquired melanocytomas (benign melanomas) in eighteen young horses. *Vet Pathol.* 1991;28:362-9.
3. Schuh JCL. Congenital intraocular melanoma in a calf. *J Comp Pathol.* 1989;101:113-6.
4. Pochini LR, Alessi AC, Marques LC, Valadão CAA, Castro MB. Melanocitoma dérmico fibroso em bezerra. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1998;50:461-4.
5. Misdorp W. Congenital tumours and tumour-like lesions in domestic animals. 1 Cattle: a review. *Vet Q.* 2002;24:1-11.
6. Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten DJ. *Tumors in domestic animals.* Iowa: Ames; 2002. p.44-117.
7. Miller MA, Weaver AD, Stogsdill PL, Fischer JR, Kreeger JM, Nelson SL, et al. Cutaneous melanocytoms in 10 young cattle. *Vet Pathol.* 1995;32:479-84.
8. Brito MF, França TN, Jabour FF, Seixas JN, Andrade GB, Oliveira LI, et al. Metastasizing oral melanoma in a cow. *Cienc Rural.* 2009;39:1248-52.
9. Teixeira C, Pires I, Ferreira S, Vierira-Pinto M. Lesões melanocíticas em suínos abatidos para consumo. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2013;65:783-91.
10. Yeruham I, Perl S, Orgad U, Yakobson B. Tumours of the vulva and vagina in cattle: a 10 year survey. *Vet J.* 1999;158:237-9.

**Recebido em: 14/09/2016**

**Aceito em: 08/02/2018**

## ENDOCARDITE VEGETATIVA EM LEITÕES CAUSADA POR *Streptococcus suis* SOROTIPO 9

Thais Schwarz Gaggini<sup>1</sup>  
Thomas Bierhals<sup>2</sup>  
Glauber Machado<sup>2</sup>  
Wagner C. G. Bragança<sup>3</sup>  
Fernando Pandolfo Bortolozzo<sup>4</sup>

### RESUMO

A endocardite vegetativa é uma importante alteração do endocárdio do suíno, quase sempre associada a infecções sistêmicas provocadas por bactérias. Foi identificado como agente causador de endocardite vegetativa *Streptococcus suis* sorotipo 9, em leitões de 7 a 10 e 30 dias de idade. Esse caso mostrou-se de interesse devido à idade dos animais acometidos e o sorotipo identificado. Por ser uma lesão de causa crônica, a endocardite vegetativa em leitões jovens é considerada incomum, não sendo relatada anteriormente na literatura. Além disso, não foi encontrado relato que relacione o sorotipo 9 como causador de endocardite vegetativa em leitões jovens.

**Palavras-chave:** estreptococos, sorotipagem, suínos.

## VEGETATIVE ENDOCARDITIS IN PIGLETS CAUSED BY *Streptococcus suis* SEROTYPE 9

### ABSTRACT

Vegetative endocarditis is an important endocardium alteration in swine, related with bacterial systemic infection. It was identified *Streptococcus suis* serotype 9 as the causative agent of the vegetative endocarditis in piglets with 7 to 10 and 30 days of age. This case arouses interest due the age of the affected animals and the identified serotype. Because it is a chronic injury, the vegetative endocarditis is considered unusual in piglets and it is not report previously in the literature. Furthermore, it was not found report that relates serotype 9 causing vegetative endocarditis in young piglets.

**Key words:** serotyping, streptococcus, swine.

## ENDOCARDITIS VEGETATIVA EN LECHONES CAUSADAS POR *Streptococcus suis* SOROTIPO 9

### RESUMEN

La endocarditis vegetativa es una importante alteración del endocardio del cerdo, siendo casi siempre asociada las infecciones sistémicas provocadas por bacterias. Fue identificado como un agente causante de endocarditis vegetativa por *Streptococcus suis* serotipo 9 en cerdos de edad de 7 a 10 y 30 días de edad. Ese caso resultó ser de interés debido a la edad de los animales y el serotipo identificado. Al ser una lesión de causa crónica, endocarditis vegetativa en los lechones jóvenes es considerada inusual, no siendo relatada previamente en la literatura. Por otra parte, no se encontró

<sup>1</sup> Doutoranda em Ciências Veterinárias Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Correspondência.

<sup>2</sup> Médico Veterinário - Gerente Técnico DB Genética de Suínos

<sup>3</sup> Gerente A.G. AGRO Suinocultura

<sup>4</sup> Professor Dr. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

relato que relaciona el serotipo 9 como causador de endocarditis vegetativa causado en lechones jóvenes.

**Palabras claves:** cerdos, estreptococcus, suerotipado.

## INTRODUÇÃO

A endocardite vegetativa é uma importante alteração do endocárdio do suíno, quase sempre associada a infecções sistêmicas provocadas por bactérias. Os agentes causadores mais frequentes são *Streptococcus suis* (*S. suis*) (1), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (2) e, mais raramente, outras bactérias, como *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Actinobacillus equuli*, *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (2,3).

Em geral, a patogenia da endocardite vegetativa está relacionada a uma tromboembolia bacteriana, que acarreta inflamação e infarto do miocárdio. O processo inflamatório associado à exsudação de fibrina promove o desenvolvimento da lesão sobre as válvulas, podendo se disseminar até o endocárdio mural adjacente (4). Animais com endocardite vegetativa podem apresentar sinais de insuficiência cardíaca, como hipertermia (5), dispneia, taquicardia e cianose. Laminite, sinais de desconforto, superfície corporal fria, perda de peso e apatia também podem ser observados. Os animais acometidos são encontrados mortos ou gravemente enfermos (3), porém, podem curar-se, apresentando complicações de insuficiência cardíaca congestiva.

*S. suis* possui 35 diferentes sorotipos descritos (1), dos quais são associados a doenças os sorotipos 1/2, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 e 14 (1,6). O sorotipo 9 é relacionado com a ocorrência de doenças, particularmente em casos de pleurisia ou pneumonia, meningite e artrite (7) e não a ocorrência de endocardite (8).

O presente relato descreve a ocorrência incomum de endocardite vegetativa em leitões jovens causada por *S. suis* sorotipo 9, com ênfase aos aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da infecção por *S. suis* em suínos.

## RELATO DE CASO

As amostras foram coletadas no ano de 2015, em uma granja suína de 1300 matrizes, localizada no Estado de Minas Gerais, Brasil. As instalações continham cinco salas de maternidade com capacidade para alojar 270 fêmeas. Em todos os lotes foi realizado o manejo “todos dentro-todos fora” e o vazio sanitário de três dias. As leitões de reposição do rebanho foram vacinadas contra infecção por Erisipela, Parvovirose e Leptospirose, com o uso de duas doses de vacina, sendo a primeira dose aplicada aos 190 dias de idade e a segunda dose três semanas após a primeira. Fêmeas múltíparas foram vacinadas com apenas uma dose, três semanas pré-cobertura.

A granja apresentou, no período anterior ao surto, taxa de mortalidade média de 8% na maternidade e de 1,5% na creche. Porém, durante o surto, foi observada mortalidade de 12% nas duas fases. Os lotes afetados foram avaliados clinicamente e foram realizadas cinco necropsias de leitões, sendo quatro destes oriundos do setor de maternidade, com idade variando entre 7 e 10 dias e, um do setor de creche, com idade de 30 dias. Os principais sinais clínicos observados nos leitões de maternidade e de creche foram cianose nas extremidades, depressão e apatia. Durante a necropsia foram observadas lesões macroscópicas e coletados fragmentos de coração, pulmão e intestino dos animais, além da coleta de sangue cardíaco. Três dos cinco leitões necropsiados apresentaram endocardite vegetativa (Figura 1) e ascite. O animal de creche, além de apresentar endocardite, revelou aderência do saco pericárdico, enquanto o leitão restante não apresentou alteração macroscópica.



Figura 1. Aspecto macroscópico de lesões de endocardite vegetativa em três leitões com idade entre sete a 10 dias. Minas Gerais, 2016.

O conteúdo purulento da endocardite dos leitões foi encaminhado ao Laboratório de Patologia e Microbiologia da Microvet®, Viçosa, para realização do diagnóstico microbiológico. As amostras foram cultivadas em condições de aerobiose em ágar acrescido de sangue ovino (5%). Após a incubação à 37°C por 24 horas, colônias típicas foram isoladas e submetidas à coloração de Gram e testes bioquímicos para identificação. Os testes bioquímicos acusaram resultado negativo no ágar com 6,5% de NaCl no teste Voges-Proskauer e, reação positiva no teste de amilase (9). As culturas isoladas foram sorotipadas com base no teste de coaglutinação, usando os antisoros hiperimunes de 1 a 9. Foi utilizado o reagente preparado com *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (10). Para 1 mL de reagente, 50 µL de cada sorotipo hiperimune foi adicionado, homogeneizado e mantido a temperatura controlada por 1 hora, com suaves movimentações da mistura a cada quinze minutos. Após a realização de duas lavagens com solução tampão fostato-salina (PBS), as células ficaram em suspensão em PBS contendo 0,05% de azida de sódio e 0,1% de albumina de soro bovino. A massa de células da placa de ágar sangue foi suspensa em 1 mL de PBS e esterilizada a 121°C por 15 minutos. Em uma placa de vidro, uma gota da suspensão foi misturada a uma gota do reagente de coaglutinação, com cada sorotipo. Foi observada por 60 segundos a aglutinação da mistura. Foi utilizado como controle negativo estirpe de *Escherichia coli*.

No exame anatomopatológico de três amostras de coração foi observada presença de pericardite crônica no leitão de 30 dias e endocardite vegetativa nas outras duas amostras oriundas dos leitões de maternidade. No exame bacteriológico foi isolado *S. suis* em dois fragmentos de pulmão, em duas amostras de sangue cardíaco e uma amostra de pericardite. Em todos os isolados foi identificado o sorotipo 9 de *S. suis*. Microscopicamente foi observada a presença de infiltrados inflamatórios crônicos e fibrose.

## DISCUSSÃO

Os achados clínicos encontrados nas leitegadas e nos leitões necropsiados foram compatíveis macroscopicamente com endocardite vegetativa (11). A principal suspeita clínica foi infecção por *S. suis* e, baseado nos exames microbiológicos, foi possível confirmar o agente etiológico como *S. suis* sorotipo 9.

*S. suis* infecta suínos entre 5 e 10 semanas de idade. No entanto, animais jovens também podem ser acometidos, manifestando principalmente quadro de meningite (6). A maioria dos isolados de casos clínicos por *S. suis* pertence aos sorotipos 1/2, 1, 2, 7, 9 e 14 (6). O sorotipo 2 é o predominante na maioria dos países (6,8), apesar de certa variação na localização geográfica (6). Este sorotipo é o principal agente relacionado à ocorrência de meningite em suínos, mas também pode causar broncopneumonia, artrite, abscessos, endocardite, poliserosite (12), endometrite, abortamentos (4) e pericardite (13).

O sorotipo 9 é reconhecido como o mais frequentemente isolado na Bélgica, Alemanha e Holanda (6). Em outros países a sua ocorrência é baixa, como no Canadá (2,2%) (13) e no Brasil (6,4%) (8), apesar da descrição em casos de surto na América do Norte (14). Dados existentes na literatura indicam que o sorotipo 9 não apresenta grande impacto na produção de suínos e, até o

Gaggini, TS, Bierhals T, Machado G, Bragança WCG, Bortolozzo FP. Endocardite vegetativa em leitões causada por *Streptococcus suis* sorotipo 9. Vet. e Zootec. 2018 mar.; 25(1): 94-98.

momento, não foi referido como agente causal de endocardite vegetativa em plantéis de suínos no Brasil (14-17). Nesse contexto, o presente estudo descreve pela primeira vez no Brasil a endocardite vegetativa em leitões jovens causada por *S. suis* sorotipo 9. Com efeito, infere-se a importância de se considerar *S. suis* sorotipo 9 como potencial agente causal de mortalidade de leitões em fase de maternidade e creche, associado a lesões de endocárdio e válvulas cardíacas.

## REFERÊNCIAS

1. Boye M, Feenstra AA, Tegtmeier C, Andresen LO, Rasmussen SR, Bille-Hansen V. Detection of *Streptococcus suis* by in situ hybridization, indirect immunofluorescence, and peroxidase–antiperoxidase assays in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections from pigs. *J Vet Diagn Invest.* 2000;12:224-32.
  2. Jensen HE, Gyllensten J, Hofman C, Leifsson PS, Agerholm JS, Boye M, et al. Histologic and bacteriologic findings in valvular endocarditis of slaughter-age pigs. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:921-7.
  3. Katsumi M, Kataoka Y, Takahashi T, Kikiuchi N, Hiramune T. Histologic and bacteriologic findings in valvular endocarditis of slaughter-age pigs. *J Vet Med Sci.* 1997;59(1):75-78.
  4. Sobestiansky J, Barcellos DESN. Doenças dos suínos. 2a ed. Goiânia: Cãnone Editorial; 2012.
  5. Dewar HA, Jones MR, Griffin SG, Oxley A, Marriner J. A study of experimental endocarditis in pigs. *J Comp Pathol.* 1987;97(5):567-74.
  6. Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht U. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet Microbiol.* 2000;74(3):237-48.
  7. Berthelot-Herault F, Morvan H, Kéribin A-M, Gorrshalk M, Kobisch M. Production of Muraminidase-Released Protein (MRP), Extracellular Factor (EF) and Suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Vet Res.* 2000;31(5):473-9.
  8. Costa ATR, Lobato FCF, Abreu VLV, Assis RA, Reis R, Uzal FA. Serotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005;47(2):113-5.
  9. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudin M, Henrichsen J. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol.* 1991;29(11):2590-4.
  10. Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol.* 1993;31(8):2192-4.
  11. Santos JL, Del'arco AE, Guimarães WV. Aspectos atuais sobre infecção por *Streptococcus suis* em suínos. In: Anais do 10o Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos; 2001; Porto Alegre. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.
  12. Madsen LW, Svensmark B, Elvestad K, Aalbaek B, Jensen HE. *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects. *J Comp Pathol.* 2002;126(1):57-65.
- 
- Gaggini, TS, Bierhals T, Machado G, Bragança WCG, Bortolozzo FP. Endocardite vegetativa em leitões causada por *Streptococcus suis* sorotipo 9. *Vet. e Zootec.* 2018 mar.; 25(1): 94-98.

13. Coelho CF, Zlotowski P, Andrade CP, Borowski SM, Gaggini TS, Almeida LL, et al. Pericardite em suínos ao abate no Rio Grande Sul: avaliação de agentes bacterianos e lesões associadas. *Pesqui Vet Bras.* 2014;34(7):643-8.
14. Gottschalk M, Lacouture S, Bonifait L, Roy D, Fittipaldi N, Grenier D. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2012 from diseased pigs in Québec, Canada. *Vet Microbiol.* 2013;162(2-4):819-25.
15. Pagnani KJR, Castro AFP, Gottschalk M, Silveira WD, Nakazato G. Sorotipagem de amostras de *Streptococcus suis* isoladas de suínos em granjas dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. *Pesqui Vet Bras.* 2002;22(1):1-5.
16. Santos JL, Santos LF, Santos DL, Pasqualon HP, Guimarães WV. Agents isolated in pericarditis cases from pigs in the nursery, growing and finishing in Brazil. In: Proceedings of 21st International Pig Veterinary Society Congress; 2010; Vancouver. Vancouver: IPVS; 2010. p.604.
17. Soares TCS, Paes AC. Encefalite dos leitões. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças infecciosas dos animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca; 2016. p.112-9.

**Recebido em: 29/03/2016**

**Aceito em: 07/02/2018**

## CONTROLE POPULACIONAL DE ESPÉCIES SILVESTRES INVASORAS POR MEIO DE LAQUEADURA E VASECTOMIA EM PRIMATAS *Callithrix penicillata*: RELATO DE CASO

Davi Fragôso da Silva<sup>1</sup>  
Elisângela Barboza da Silva<sup>2</sup>  
André Preturlon Terra<sup>3</sup>

### RESUMO

Saguis-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) são consideradas espécies invasoras em regiões do sul e sudeste do Brasil. Espécies invasoras interferem com a dinâmica do ecossistema em áreas as quais foram introduzidas. A hibridização, a competição e a predação de outros animais são alguns dos problemas causados por estes calitriquídeos. A esterilização de primatas que se encontram em Centros de Recuperação para Animais Silvestres é um procedimento necessário que visa o controle populacional da espécie quando são destinadas para soltura. Técnicas como a de laqueadura e vasectomia, que preservam as glândulas sexuais que são imprescindíveis nestes primatas, pois necessitam de sua produção hormonal para se estabelecer e viver em grupos na natureza. Sendo assim, objetivou-se descrever a técnica cirúrgica de esterilização de um macho e uma fêmea da espécie *C. penicillata*.

**Palavras-chave:** cirurgia veterinária, controle populacional, espécies invasoras, sagui-de-tufo-preto.

### POPULATION CONTROL OF INVASIVE WILD SPECIES THROUGH TUBAL LIGATION AND VASECTOMY IN PRIMATES *CALLITHRIX PENICILLATA*: CASE REPORT

#### ABSTRACT

Black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) are considered invasive species in the regions of Southern and Southeast of Brazil. Invasive species interfere with the dynamics of ecosystem in areas which they were introduced. The hybridization, the competition and the predation of other animals are some of the problems caused by callitrichids. The sterilization of primates that are in wildlife rehabilitation centers is a necessary procedure because it is intended to control the population growth from species destined to reintroduction into the wild. Technics like tubal ligation and vasectomy that maintain the sexual glands are essential to these primates since they need their hormones production to be able to live in groups in the wild. Therefore the aim of this work is to describe in details the sterilization technique of a male and a female of *C. penicillata*.

**Keywords:** Black-tufted marmoset, invasive species, populacional control, veterinary surgery.

### CONTROL DE LA POBLACIÓN DE ESPECIES SILVESTRES INVASORAS MEDIANTE LIGADURA DE TROMPAS Y VASECTOMÍA EN PRIMATAS *CALLITHRIX PENICILLATA*: INFORME DEL CASO

#### RESUMEN

Los títes de Pincel Negro (*Callithrix penicillata*) son considerados especies invasoras en las regiones del sur y el surde de Brasil. Las especies invasoras interfieren con la dinámica de los

<sup>1</sup> Bacharel em Medicina veterinária, Universidade Estadual de Santa Cruz. Correspondência.

<sup>2</sup> Professora Doutora, Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade estadual de Santa Cruz - UESC.

<sup>3</sup> Médico Veterinário, Ortopedista e Cirurgia Veterinária

ecosistemas en las áreas em las que fueron introducidas. La hibridación, la competencia y la depredación de otros animales son algunos de los problemas causados por estos callitricidos. La esterilización de los primatas que se encuentran en Centros de Recuperación de Animales Silvestres es un procedimiento necesario dedicado a controlar la población de la especie destinada a su liberación. Técnicas como la ligadura de trompas y la vasectomía, las cuales preservan las glándulas sexuales, son imprescindibles para estos primatas ya que necesitan su producción hormonal para establecerse y vivir en grupos en la naturaleza. Por tanto, este estudio tiene como objetivo describir la técnica quirúrgica de esterilización de un macho y una hembra de la especie *C. penicillata*.

**Palabras claves:** cirugía veterinaria, control de población, especies invasoras, tití de pincel negro.

## INTRODUÇÃO

As espécies de primatas mais conhecidas do gênero *Callithrix* costumam viver em grupos familiares. A espécie *Callithrix penicillata* é endêmica do nordeste e centro-oeste predominante em áreas da caatinga, cerrado e mata atlântica. Reproduzem-se durante todo o ano e possuem uma dieta rica e bem variada consumindo desde exsudatos, sementes, flores, frutos, néctar, além de artrópodes, moluscos, filhotes de aves e mamíferos, anfíbios e pequenos lagartos (1).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2) as espécies *C. penicillata* e *C. jacchus* são consideradas invasoras em diversas regiões do Brasil, dando destaque para regiões do sul e sudeste. Espécies invasoras estatisticamente são causadoras da segunda maior perda de biodiversidade no planeta. Ao serem introduzidas em um novo ambiente, muitas dessas espécies não sobrevivem devido as diferentes condições do seu novo habitat, porém, aquelas que conseguem se adaptar possuem grandes chances de se estabelecer causando um potencial perigo de extinção às espécies nativas (3).

Segundo Vale e Prezoto (4) o processo de invasão de animais em novos ambientes é dividido em etapas. A primeira fase é caracterizada pelo período de introdução da espécie no novo habitat. A fase de colonização acontece em seguida, após as superações das barreiras encontradas pela espécie invasora. Caso sobreviva, segue-se pela fase de naturalização onde a nova espécie efetiva sua reprodução conseguindo dispersar seus genes e por fim a fase de impacto onde os danos, sejam ecológicos ou econômicos, ocorrem. Estes processos podem ocorrer tanto de maneira linear como simultânea.

De acordo com Levacov et al. (5), os primatas *C. jacchus*, *Cebus apella*, *C. penicillata* e *Callithrix geoffroyi* são alvos do tráfico interestadual e mais frequente em Centros de Recuperação e Triagem de Animais Silvestres. Sendo os animais retirados de biomas das regiões do norte, nordeste e centro-oeste. Demonstrando assim uma grande quantidade de espécies exóticas e potencialmente invasoras trazidas para região sul e sudeste.

Devido a grande flexibilidade adaptativa das espécies *C. penicillata* e que ao serem introduzidos em áreas não endêmicas onde não possuem predadores e/ou parasitos no ecossistema, geralmente se tornam consumidores do topo da cadeia (6). Aumentado os problemas causados devido ao aumento exacerbado da população.

Mais um problema gerado pelas invasões, é o do declínio da fauna ornitológica devido à predação de ninhos por *Callithrix spp.* Além das aves, mamíferos também são ameaçados pela invasão biológica por calitriquídeos. Como o sagui-da-serra-escuro (*C. aurita*) e o sagui-da-serra (*C. flaviiceps*) devido a sua capacidade de reprodução e hibridização com estas espécies que, por conseguinte, causa o seu desaparecimento devido à perda genética (7).

Outra espécie que corre riscos com a invasão de *C. penicillata* é o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) a qual já se encontra ameaçada devido a grande perda de seu habitat, remanescendo em fragmentos da mata atlântica. Além disso, estudos demonstraram que *C. penicillata* invasores, possuem maior capacidade de adaptação em áreas degradadas em comparação com espécies do gênero *L. rosalia* prejudicando ainda mais as condições de conservação do mico-leão-dourado (4).

## RELATO DE CASO

Um sagui macho e uma fêmea da espécie *C. penicillata*, foram escolhidos aleatoriamente dentre os 27 exemplares de *Callithrix spp.* presentes em um centro de recuperação de animais silvestres. Os animais hígdos foram então conduzidos para o centro cirúrgico objetivando-se executar o procedimento de esterilização para a posterior soltura destes animais.

Os primatas foram levados em caixas de transporte onde ficaram em jejum hídrico e alimentar por três horas até o momento do procedimento cirúrgico. Por serem animais com alta velocidade metabólica foi administrado 0,2-0,5 ml de glicose 50% via oral antes da indução anestésica evitando uma queda acentuada de glicose no organismo e o aparecimento de sintomas de hipoglicemia, sendo frequente, os animais apresentarem convulsões.

A indução anestésica foi realizada cobrindo-se a caixa de transporte com material plástico e bloqueando todas as saídas de ar ficando apenas uma abertura para entrada da mangueira pela qual o anestésico volátil era infiltrado, sendo utilizado o isoflurano a 5%. O animal então era observado até o momento de decúbito, e o tempo médio variou de 5-10 min.

O primeiro animal uma fêmea, adulta, pesava 0,334 kg que após a indução anestésica foi mantida com o agente inalatório isoflurano em sistema aberto do tipo Baraka, com utilização de máscara não sendo necessário sua intubação. Durante o trans-cirúrgico, as concentrações do isoflurano variaram de 0,2 – 1,0%.

O animal foi posicionado na mesa em decúbito dorsal para realização da tricotomia, antiseptia habituais. Logo então, uma pequena incisão mediana retroabdominal de aproximadamente 3 cm foi feita objetivando-se acessar a cavidade e o sistema reprodutor feminino. Foram expostos e identificados o útero, os cornos uterinos como também os ovários, para então, dar início ao procedimento de dupla ligadura na região dos ístimos tubários (Figura 1).

Estes foram duplamente pinçados em ambos os lados, direito e esquerdo, deixando uma pequena região da tuba uterina entre as duas pinças onde, aproximadamente 1 cm foi excisado. Em seguida fez-se a ligadura da porção cranial e caudal das tubas. A ligadura foi feita com fio de nylon 3-0 em ambos os lados. O procedimento foi repetido na tuba uterina contralateral.

Não havendo sangramentos durante o procedimento, os órgãos foram reposicionados na cavidade para prosseguir com a síntese. Foi utilizado o fio poliglactina 910 3-0 para a sutura da musculatura e subctâneo utilizando os padrões simples contínuo e zig-zag, respectivamente e para a síntese da pele foi utilizado cola cirúrgica a base de 2-octil-cianoacrilato.

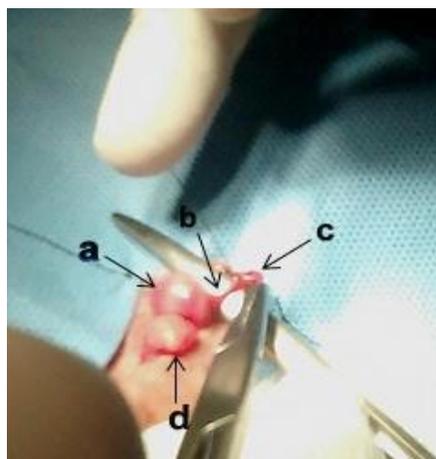


Figura 1. Posicionamento anatômico dos órgãos do sistema reprodutor feminino (a) útero (b) corno uterino esquerdo direito (c) ovário esquerdo. (d) bexiga

Terminada a cirurgia da fêmea, o macho, também do gênero *C. penicillata* com 0,304kg, foi conduzido para o procedimento de vasectomia. Seu preparo, indução e manutenção foi realizado da mesma maneira que a fêmea.

Uma incisão mediana ventral foi feita acima da sínfise púbica pretendendo-se alcançar o funículo espermático e seus ductos e em seguida foi feita a localização destas estruturas (Figura 2), divulsionou-se os ductos deferentes da fâscia espermática como também da veia e artéria presentes no funículo espermático para então pinçá-los. Foram pinçadas duas porções do ducto, cranialmente e caudalmente deixando um pequeno espaço entre as pinças que foi excisado (Figura 3), em seguida realizou-se a ligadura das duas extremidades.

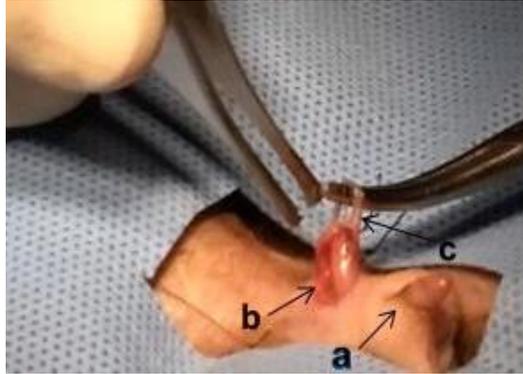


Figura 2. Exposição do ducto deferente para realização da vasectomia. (a) pênis (b) funículo espermático direito (c) ducto deferente.

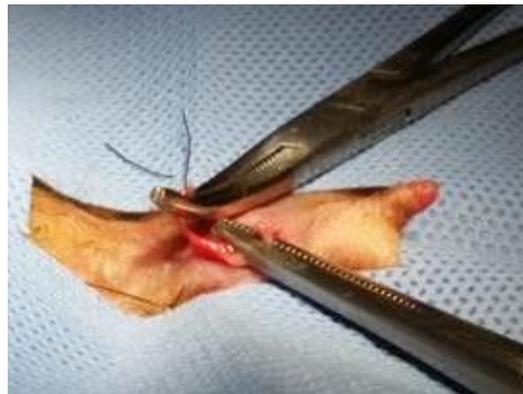


Figura 3. Ducto deferente seccionado aguardando a ligadura das porções cranial caudal.

Utilizou-se o fio nylon 3-0 para ligadura dos ductos. O procedimento foi realizado no ducto deferente direito e esquerdo. Após o reposicionamento das estruturas em seu local de origem, a síntese da pele foi feita com cola cirúrgica.

Durante o transcirúrgico os animais apresentaram-se estáveis com padrões fisiológicos normais para a espécie, frequência respiratória 20-40 rpm e temperatura entre 38 – 39,0 °C. Devido a alta frequência cardíaca da espécie, foi analisado com o estetoscópio apenas a regularidade dos batimentos, sendo os valores de referência para a espécie de: 38 – 39,7 °C, 20 – 50 rpm e 240 – 350 bpm.

Logo ao término da cirurgia foram administrados pela via intramuscular cloridrato de tramadol 3mg/kg e penicilina 20.000 UI/kg para prolongamento da analgesia e profilaxia antibiótica, respectivamente em ambos os animais.

No pós-cirúrgico os animais ficaram em observação no centro de recuperação onde eram alimentados e medicados. Foi prescrito para os saguis a administração de enrofloxacina 5mg/kg e dipirona 10mg/kg via oral, uma vez ao dia durante 7 dias. Para receber a medicação, os animais eram retirados do recinto com luvas de raspa evitando-se possíveis mordidas.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O procedimento de vasectomia em machos e laqueadura em fêmeas é recomendando para animais silvestres que são destinados para o retorno a natureza. A esterilização de calitriquídeos diminui a ocorrência de efeitos negativos comparados à castração, visto que esses animais convivem em grupos e a produção hormonal pela glândulas sexuais interfere enormemente no comportamento social e sexual dos indivíduos (8).

Primatas de pequeno porte como os da espécie *Callithrix*, necessitam realizar jejum alimentar em reduzido período de tempo comparado com outras espécies, devido a sua alta taxa metabólica. É recomendando o jejum de 6-8 horas antes da cirurgia. Entretanto, não existe ainda estabelecido um intervalo ideal para espécie *Callithrix penicillata* (9).

Durante o procedimento de esterilização optou-se pela indução com anestesia inalatória com isoflurano, agente comumente usado em pequenos primatas, pois são facilmente induzidos com anestesia volátil, seja usando máscaras ou caixas para indução. Os animais foram induzidos em suas próprias caixas de transporte devido à praticidade, além de evitar a manipulação dos saguis e consequente estresse e fuga pelo local. Este método teve funcionalidade semelhante à utilização de caixas para indução anestésica em pequenos animais (9,10).

A manutenção anestésica foi realizada com o isoflurano devido aos baixos riscos de mortalidade e morbidade nestes primatas, além de possuir uma baixa CAM de 1,2% (9). Os animais não foram intubados, porém em cirurgias de longa duração, esse procedimento é aconselhado visando à proteção das vias aéreas e correto fornecimento de oxigênio. A intubação endotraqueal de primatas com peso menor que 500g pode se tornar de difícil realização, podendo ser necessária à adaptação de sondas utilizando-se como, por exemplo, cateteres ou sondas uretrais (10).

Os procedimentos de esterilização foram baseados em técnicas cirúrgicas realizadas em humanos devido à semelhança anatômica entre as espécies. Na laqueadura foi utilizada a técnica de Parkland de salpingectomia parcial bilateral a qual é frequentemente usada na medicina humana (11).

A mesma técnica de dupla ligadura foi utilizada para a vasectomia dos machos a qual também se assemelha com a humana (12). Esta técnica já foi realizada com sucesso e descrita em um sagui da espécie *Callithrix jacchus* por Morris e David (13).

Animais do gênero *Callithrix* assim como outros primatas são conhecidos pela sua grande curiosidade (14). Conhecendo estas características comportamentais da espécie, optou-se pela utilização de cola cirúrgica para sutura da pele ao invés da tradicional síntese com fio de nylon, pois os fios de sutura poderiam estimular os saguis a removerem os pontos causando novas lesões prejudicando o pós-operatório.

No pós-cirúrgico os animais foram medicados com dipirona sódica via oral e enrofloxacina via oral, uma vez ao dia pretendendo-se promover uma analgesia e profilaxia de infecções bacterianas respectivamente. Estes medicamentos foram adotados devido ao seu amplo uso e baixos efeitos adversos em animais silvestres e exóticos sendo inclusive recomendado para primatas da espécie *C. penicillata* (15).

Conclui-se então que a laqueadura e vasectomia de primatas *Callithrix penicillata* é um procedimento simples com baixos riscos aos animais e que deve ser realizado devido a sua função no controle populacional destas espécies, amenizando os impactos causados no ecossistema advindo dos processos de invasões e proliferação permitindo o seu retorno à natureza. A descrição da técnica cirúrgica nestes primatas também colabora fornecendo informações sobre a clínica e cirurgia de animais silvestres da fauna brasileira área em constante desenvolvimento e que sempre necessita de novos dados.

## REFERÊNCIAS

1. Verona CED, Pissinatti A. Primates – Primatas do novo mundo (sagui, macaco-prego, macaco-aranha, bugio e miqui). In: Cubas ZS, Silva JCR. Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens. 2a ed. São Paulo: Rocca; 2014. p.723-30.

2. Ministério do Meio Ambiente (BR). Estratégia nacional sobre espécies exóticas invasoras. Brasília: Ministério do Meio Ambiente; 2009.
3. Dechoum MS, Pessato RD. Invasões biológicas: uma ameaça invisível. Recife: AMANE (Associação para Proteção da Mata Atlântica do Nordeste); 2010.
4. Vale CA, Prezoto F. Invasões biológicas: o caso do mico estrela *Callithrix penicillata*. CES Rev. 2015;29:58-76.
5. Levacov D, Jerusalinky L, Fialho MS. Levantamento dos primatas recebidos em centros de triagem e sua relação com o tráfico de animais silvestres no Brasil. In: Anais do 12o Congresso Brasileiro de Primatologia; 2011; Belo Horizonte. Belo Horizonte: SBP; 2011.
6. Traad RM, Leite JCM, Weckerlin P, Trindade S. Introdução das espécies exóticas *Callithrix penicillata* (Geoffroy, 1812) e *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758) em ambientes urbanos (Primates Callithrichidae). Rev Meio Ambiente Sustentabilidade. 2012;2:9-23.
7. Begott RA, Landesmann LF. Predação de ninhos por um grupo híbrido de Saguis (*Callithrix jacchus/penicillata*) introduzidos em área urbana: implicações para a estrutura da comunidade. Neotrop Primates. 2008;15:28-9.
8. European Association of Zoos and Aquaria. Husbandry guidelines for Callithrichidae. 2a ed. Saint-Aignan: Beauval Zoo; 2010.
9. Ølberg RA. Monkeys and gibbons In: West G, Heard D, Caulkett N. Zoo animal and wildlife - immobilization and anesthesia. Phoenix: Blackwell; 2007. p.375-84.
10. Longley LA. Anaesthesia of exotic pets. 1a ed. St. Louis: Saunders; 2008. p.103-10.
11. Campagnolo IM. Avaliação da cauterização completa da luz tubária com diferentes potências de eletrocoagulação bipolar para esterilização feminina [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.
12. Netto NR, Neves PA. Tratado de ginecologia. 2a ed. São Paulo: Rocca; 2000. v.1, p.743-7.
13. Morris TH, David CL. Illustrated guide to surgical technique for vasectomy of common marmoset. Lab Anim. 1993;27:381-4.
14. Milagres AP. Caracterização dos sítios de dormida de saguis híbridos *Callithrix* sp. (Mammalia, Primates), em um fragmento florestal urbano [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2015.
15. Valverde CR. Primates. In: Carpenter JW. Exotic animal formulary. 3a ed. St. Louis: Saunders; 2005. p.495-527.

**Recebido em: 05/04/2016**

**Aceito em: 07/02/2018**

## EFETIVIDADE NA RECICLAGEM DO GEL DE AGAROSE EM LABORATÓRIO COMERCIAL

Daniel Dávida<sup>1</sup>  
Paulo Roberto Rodrigues Ramos<sup>2</sup>

### RESUMO

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica frequentemente utilizada em laboratórios de biologia molecular. Esta técnica possibilita a separação de moléculas de ácidos nucleicos. A agarose é um polissacarídeo obtido das paredes celulares de algas marinhas tendo um custo elevado. Após a sua utilização, o produto em forma de gel é considerado um contaminante ambiental e necessita de descarte especializado. O produto obtido apresentou o rendimento total de 81% e foi testado quanto a sua eficiência. Os testes demonstraram que a agarose reciclada apresenta resultados idênticos quando comparados aos obtidos em géis produzidos com agarose comercial.

**Palavras-chave:** Agarose, eletroforese, resíduo laboratorial, biologia molecular.

### EFFECTIVENESS IN RECYCLING AGAROSE'S GEL IN COMMERCIAL LABORATORY

#### ABSTRACT

The agarose gel electrophoresis is a often technique used by molecular biology laboratories. This techninque allows acid nucleic molecules separation. The agarose is a polysaccharide obtained from celular walls of seaweed having a high cost. After your use, the product in gel form is considered enviorment's hazardous and needs specialized waste. The obtained product showed a yield of 81% and it was tested as to yours efficiency. Tests showed that recycled agarose presents identical results compared with gels made from commercial agarose.

**Key-words:** Agarose, electrophoresis, laboratorial waste, molecular biology.

### EFICACIA DEL RECICLAJE DE GEL DE AGAROSA EN LABORATORIO COMERCIAL

#### RESUMEN

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica usada con frecuencia en laboratorios de biología molecular. Esta técnica permite la separación de moléculas de ácido nucleico. La agarosa es un polisacárido obtenido a partir de las paredes celulares de las algas con un alto costo. Después de su uso, el producto en forma de gel, se considera un contaminante ambiental que debe ser desechado de forma adecuada. El rendimiento total del producto obtenido fue de 81% y el mismo fue estudiado para determinar su eficacia. Pruebas de laboratorio demostraron que la agarosa reciclada posee propiedades idénticas al comparar con otros geles de agarosa producidos comercialmente.

**Palabras clave:** Agarosa, electroforesis, residuos de laboratório, biologia molecular.

---

<sup>1</sup> Universidade De São Paulo. Contato principal para correspondência.

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

## INTRODUÇÃO

Resíduo é um conceito vinculado a um contexto tecnológico, de aprimoramento da produção, portanto cultural e histórico (1).

Todos os dias lança-se à natureza o desafio de ela ter que assimilar novos produtos artificiais, ultrapassando os limites da capacidade dos fluxos de energia e seus respectivos ciclos naturais (2).

O gerador do resíduo, ao tornar-se adepto a um programa de reciclagem, transpõe a imagem de que possui um programa de gerenciamento de resíduos aperfeiçoado. A reciclagem surge como um reflexo que aspirou à melhoria contínua.

Um modelo de gestão bem estruturado tem como cunho primordial a prevenção da poluição. Esta por sua vez, estimula a empresa a elaborar novas estratégias para a melhoria sistemática de seus processos, resultando no aumento da produtividade (3).

Para este trabalho, foi estudada a reciclagem do gel de agarose utilizado em análises eletroforéticas em laboratórios de biologia molecular. O gel torna-se um resíduo após o seu uso e depende de serviço especializado para seu descarte uma vez que é classificado como resíduo de serviço de saúde.

A agarose é um polissacarídeo linear obtido das paredes celulares de algas vermelhas da classe Rodophyceae, principalmente dos gêneros *Laurencia*, *Gracilaria* e *Gelidium*. Destaca-se principalmente o seu uso nas áreas ligadas à farmácia, setor alimentício e biotecnologia (4).

No Brasil a importação da agarose tem se demonstrado diminuta, sendo isso uma consequência ao seu alto valor (5).

Segundo a Agência Nacional De Vigilância Sanitária por meio da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N°306 – De 7 De Dezembro De 2004, o gel é caracterizado no Grupo A1, item 5.1. Um tipo de resíduo, no qual, estão presentes materiais resultantes de atividades genéticas (6).

O presente trabalho foi desenvolvido numa associação do Centro de Isótopos Estáveis Aplicados às Ciências da Vida (CIE), IBB, UNESP Botucatu com o laboratório Avex Tecnologia Biomolecular e teve como objetivo verificar a eficácia da agarose reciclada quanto aos resultados de sexagem de aves, comparando-se com os da agarose comercial.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### O processo de reciclagem

No presente trabalho foram empregados vinte géis de agarose comercial, a 2% de concentração, medindo 6x11cm. Na etapa inicial da reciclagem, aumentou-se o tempo de corrida da eletroforese (110V) em 10 minutos, promovendo a migração dos fragmentos de DNA para o polo positivo, até que saíssem dos géis.

Posteriormente, os géis foram fragmentados em frações circulares de 1,5cm de diâmetro e acondicionados num béquer com capacidade para um litro. Foram cobertos com água de torneira em temperatura ambiente, sem agitação, até a marcação de 1000mL. Estes fragmentos passaram por troca de água em igual volume a cada vinte e quatro horas, permanecendo imersos por três dias.

No quarto dia a água foi removida por escoamento, sendo acrescentado igual volume de água destilada para a completa remoção de sais. O béquer permaneceu em temperatura ambiente por 2 dias, sem agitação. Posteriormente essa água foi removida por escoamento e os fragmentos encaminhados para a secagem em estufa de circulação forçada no Centro De Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências UNESP de Botucatu.

Os fragmentos permaneceram em estufa de circulação forçada, Marconi, modelo MA 035 a 60°C por trinta e seis horas em graal de porcelana, sendo posteriormente acondicionados em frascos específicos para a moagem, onde receberam esferas de aço de 0,5 cm de diâmetro e foram acondicionados em moinho criogênico, Spex Sample Prep, modelo Geno/Grinder 2010, até a completa transformação em pó, obtendo-se a agarose reciclada.

## Teste de efetividade da reciclagem

As amostras de sangue utilizadas para esse trabalho foram coletadas em papel do tipo FTA. Após os processos de extração e purificação com reagente Whatman, as amostras foram combinadas a reações bioquímicas de PCR e posteriormente foram amplificadas (7).

Preparam-se os géis, pesando-se 0,60g de agarose comercial e reciclada, as quais foram transferidas para dois béqueres com capacidade de 200mL.

Em seguida foram tomados 30mL de solução tampão TBE, para cada béquer, levados ao forno de micro-ondas, Philco, modelo PMS22N3 e aquecidos em potência máxima por trinta segundos. Após a dissolução da agarose, foram adicionados aos géis 1,5 $\mu$ L do corante Neotaq Brilliant Green. Os géis assim preparados foram vertidos nas bandejas previamente montadas e mantidas em temperatura ambiente até a completa gelificação.

Em cada gel foram aplicadas amostras de DNA de aves da espécie *Nymphicus hollandicus*, previamente preparadas a partir de amostras de sangue fornecidas pelo laboratório AVEX. As amostras em questão foram previamente sexadas de modo que se aplicaram 5 $\mu$ L em cada ponto de aplicação, sendo cinco machos e cinco fêmeas. O último ponto de aplicação foi empregado como controle negativo de contaminação. Os géis preparados com agarose reciclada foram montados com três repetições.

Ambos os géis foram colocados na mesma cuba, imersos em solução tampão TBE e submetidos à eletroforese cujos parâmetros foram 110V por trinta minutos. Do início ao final da corrida a amperagem variou de 70mA a 100mA.

Finalizada a eletroforese, os géis foram removidos da cuba, colocados num transiluminador, UV, Crystal BioGlow, modelo ZT-21 e inspecionados quanto à presença de bandas de fragmentos de DNA, mediante exposição à luz ultravioleta. Uma vez verificada a presença das bandas os géis foram fotografados com uma câmera digital, Samsung, modelo ES65 para arquivamento da imagem e análises das mesmas.

As imagens assim obtidas foram investigadas quanto às mobilidades relativas (rfs) dos fragmentos de DNA encontrados em ambos os géis de agarose, empregando-se o pacote computacional GEL ANALYZER 2010.

Foi empregada a estatística descritiva para se avaliar a mobilidade relativa das bandas de fragmentos de DNA nos géis obtidos. Os dados quanto às mobilidades relativas foram analisados mediante o teste de correlação com o objetivo de comparar os géis preparados com agarose reciclada e comercial.

## RESULTADOS

A sexagem de amostras de *Nymphicus hollandicus* em agarose comercial e em agarose reciclada, mostrou-se efetiva, visto que as amostras de fêmeas revelaram duas bandas, caracterizando a heterozigose dos cromossomos Z e W, já os machos apresentaram apenas uma banda referente à homozigose do cromossomo Z (Figura 1).

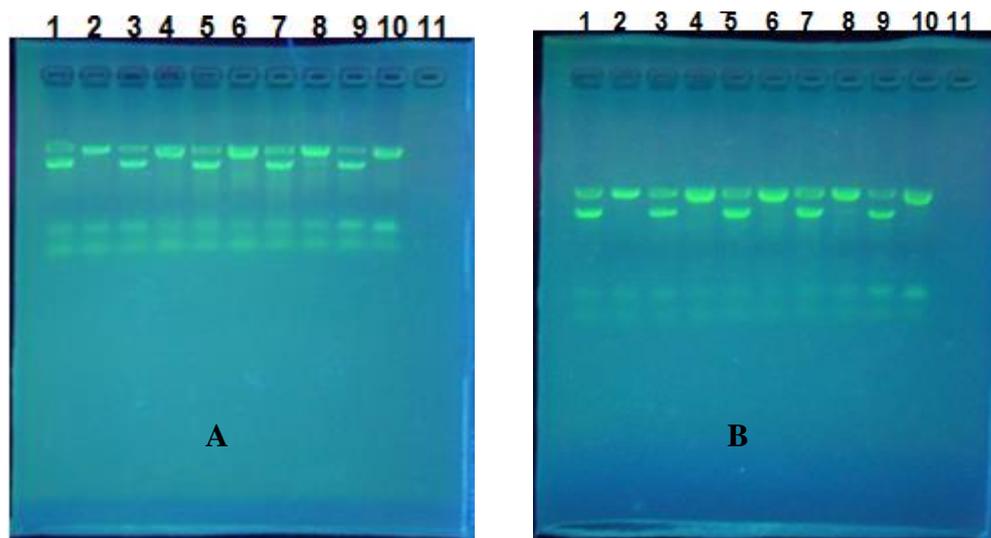


Figura 1. Gel de agarose comercial (A) e reciclada (B) a 2% em tampão TBE a 10%, com tempo de corrida de trinta minutos, corado com Neotaq Brilliant Green, demonstrando a existência de duas bandas nas amostras 1,3,5,7 e 9 caracterizando os cromossomos Z e W das fêmeas e uma banda nas amostras 2,4,6,8 e 10 caracterizando o cromossomo Z em homozigose de machos.

Na Tabela 1 estão descritos os dados referentes às mobilidades relativas obtidas por eletroforese em gel de agarose comercial, apresentando as bandas 1 e 2 referentes aos cromossomos Z e W na sexagem de *Nymphicus hollandicus*.

Tabela 1. Dados referentes às mobilidades relativas das bandas de fragmentos de DNA, referentes aos cromossomos Z (banda 1) e W (banda 2), obtidas em gel de agarose comercial na concentração de 2%, tampão TBE 10%.

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Banda 1</b>	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
<b>Banda 2</b>	0,20		0,20		0,20		0,20		0,20	

Na Tabela 2 estão dispostos os valores obtidos na estatística descritiva referentes às mobilidades relativas obtidas por eletroforese em gel de agarose comercial, apresentando as bandas 1 e 2 referentes aos cromossomos Z e W na sexagem de *Nymphicus hollandicus*.

Tabela 2. Estatística Descritiva referente aos dados de mobilidade relativa das bandas de fragmentos de DNA, referentes aos cromossomos Z (banda 1) e W (banda 2), obtidas em gel de agarose comercial na concentração de 2%, tampão TBE 10%.

	Média	Desvio Padrão	Variância
<b>Banda 1</b>	0,17	$2,93 \times 10^{-17}$	$8,56 \times 10^{-34}$
<b>Banda 2</b>	0,20	0,00	0,00

Na Tabela 3 estão descritos os dados referentes às mobilidades relativas obtidas por eletroforese em gel de agarose reciclada, apresentando as bandas 1 e 2 referentes aos cromossomos Z e W na sexagem de *Nymphicus hollandicus*.

Tabela 3. Dados referentes às médias de mobilidades relativas das bandas de fragmentos de DNA, referentes aos cromossomas Z (banda 1) e W (banda 2), obtidas em gel de agarose reciclada na concentração de 2%, tampão TBE 10%.

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Banda 1</b>	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
<b>Banda 2</b>	0,35		0,35		0,35		0,35		0,35	

Na Tabela 4 estão dispostos os valores obtidos na estatística descritiva referentes às mobilidades relativas obtidas por eletroforese em gel de agarose reciclada, apresentando as bandas 1 e 2 referentes aos cromossomas Z e W na sexagem de *Nymphicus hollandicus*.

Tabela 4. Estatística Descritiva referente aos dados das médias das mobilidades relativas das bandas de fragmentos de DNA, referentes aos cromossomas Z (banda 1) e W (banda 2), obtidas em gel de agarose reciclada na concentração de 2%, tampão TBE 10%.

	Média	Desvio Padrão	Variância
<b>Banda 1</b>	0,30	$5,85 \times 10^{-17}$	$3,42 \times 10^{-33}$
<b>Banda 2</b>	0,35	0,00	0,00

Na Tabela 5 estão apresentados os valores obtidos nas correlações referentes às mobilidades relativas obtidas por eletroforese em géis de agarose comercial e reciclada, apresentando as bandas 1 e 2 referentes aos cromossomas Z e W na sexagem de *Nymphicus hollandicus*.

Tabela 5. Valores de correlação dos dados das mobilidades relativas das bandas de fragmentos de DNA, referentes aos cromossomas Z (banda 1) e W (banda 2), obtidas em gel de agarose comercial e reciclada na concentração de 2%, tampão TBE 10%.

	Reciclada Comercial	
	Banda 1	Banda 2
Banda 1	1,00	-
Banda 2	-	1,00

## DISCUSSÃO

Os métodos criados e conduzidos nesse trabalho tiveram como suporte a comparação com os trabalhos revisados (8) (9). Contudo, algumas alterações introduzidas na metodologia empregada no presente trabalho demonstraram que a reciclagem da agarose teve um resultado bastante positivo.

Na primeira etapa do processo, optou-se por aumentar o tempo da eletroforese, garantindo então que eventuais contaminações devido à permanência de fragmentos de DNA fossem evitadas. Essa prática assegurou que a agarose reciclada tornasse-se isenta de contaminações oriundas de materiais genéticos.

Nos trabalhos revisados, a remoção do material genético foi feita por difusão em água. Quando comparadas as metodologias, verificou-se que a remoção pela extensão do tempo da eletroforese foi mais eficiente, pois foi mais rápida (8) (9).

Para o processo seguinte, a fragmentação, procurou-se padronizar um tamanho de fragmento adequado para a etapa de eluição. Os fragmentos foram convenientes para o processo de difusão de possíveis contaminantes, devido à área de contato com a água.

Ainda como uma garantia de qualidade, os fragmentos após as etapas de eluição foram conferidos novamente quanto à presença de material genético por meio da visualização dos mesmos no transiluminador UV. Nenhum resquício de DNA foi visualizado.

A etapa de desidratação teve como resultado fragmentos integralmente secos e, conseqüentemente, com tamanhos reduzidos, fatores ideais que contribuíram para o processo de moagem. Observou-se, que a desidratação em estufa provida de circulação forçada, favoreceria o tempo do processo, visto que é um equipamento mais eficiente quando comparado a uma estufa normal (9).

A desidratação numa estufa que não dispõe de circulação de ar forçada é realizada no tempo de cinquenta e quatro horas (9). Para este trabalho, utilizando a estufa de circulação forçada de ar, foi possível reduzir o tempo para trinta e seis horas mantendo-se a mesma temperatura a qual foi utilizada como referência. Em relação ao moinho criogênico, o mesmo foi utilizado em virtude de também apresentar-se mais eficiente quando comparado a um moinho normal.

Os resultados das correlações apresentaram-se iguais a 1,00, o que certificou que a agarose reciclada possui a mesma eficiência da comercial.

Foi observado que as bandas de DNA nos géis reciclados tiveram mobilidade relativa maior do que as bandas de DNA no gel de agarose comercial. Esse fato pode ser explicado porque, provavelmente, os processos de eluição em água e eletroeluição tornaram a agarose reciclada livres de elementos presentes na agarose comercial. Isso lhe conferiu uma resistência ligeiramente menor, não alterando o resultado final.

## CONCLUSÃO:

A agarose reciclada é tão eficiente quanto a comercial, quando empregada na sexagem de aves por técnicas moleculares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Kuhen, A. Reciclando o cotidiano: O lixo como política pública e como representação social [dissertação][Internet]. Santa Catarina: Universidade Federal De Santa Catarina; 1994. [acesso em 12 abr 2016]. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/111944>.
2. Ferreira, J. A. Resíduos Sólidos e Lixo Hospitalar: Uma Discussão Ética. Solid Waste and Nosocomial Waste : An Ethical Discussion. Cad. Saúde Públ. [Internet] 1995. [acesso em 07 abr 2016]; 11 (2): 314–320. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/%0D/csp/v11n2/v11n2a14.pdf>.
3. Filho, J. S, Sicsú, A. Produção mais limpa: uma ferramenta da gestão ambiental aplicada às empresas nacionais [internet]. In: XXIII Encontro Nac. De Eng. de Produção; 2003; Ouro Preto. [acesso em 18 abr 2016]. Disponível em: [http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP2003\\_TR1005\\_0001.pdf](http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP2003_TR1005_0001.pdf).
4. Vasconcelos, A. G, Araújo, K. V. D, Santana, L. DE A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: Uma revisão. Rev. Bra. Inov. Tecn. Saúde [Internet] 2015. [acesso em 20 abr 2016]; 27–51. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/reb/article/view/5898/5694>.
5. Cunha, P. L. R. DA, Feitosa, R. C. M. D. P. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: Uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. Quim. Nova [Internet] 2009. [acesso em 20 abr 2016]; 32 (3): 649-660. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/244750848\\_Polissacarideos\\_da\\_biodiversidade\\_brasileira\\_UM\\_A\\_oportunidade\\_de\\_transformar\\_conhecimento\\_em\\_valor\\_economico](https://www.researchgate.net/publication/244750848_Polissacarideos_da_biodiversidade_brasileira_UM_A_oportunidade_de_transformar_conhecimento_em_valor_economico).
6. Agencia Nacional De Vigilância Sanitária. Rdc nº 306, de 7 de dezembro de 2004 [Internet] 2004. [acesso em 07 mar 2016]. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0306\\_07\\_12\\_2004.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0306_07_12_2004.html).

7. Fridolfsson A.K, Ellegren H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Jour. Avian Bio.* [Internet] 1999. [acesso em 28 mar 2016]; 30:116-121. Disponível em: [https://www.jstor.org/stable/3677252?seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/3677252?seq=1#page_scan_tab_contents).
8. Palacios, G, Giménez, C, Garcia, E. Recycling agarose. *Plant Mol. Bio. Rep.* [Internet] 2000. [acesso em 28 mar 2016]; 18(1): 47-49. Disponível em: <http://www.nrc.ca/cisti/journals/ispmb/reporter.html>.
9. Reiniger L. R. S, Anthonisen D, Choer, E. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. *Ciê. Rural* [Internet] 2004. [acesso em 28 mar 2016]; 34(5): 1603–1605. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/crural/article/view/17986/18828>.

**Recebido em: 03/08/2016**

**Aceito em: 21/02/2018**

## DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE COLESTEROL-LDL DE EQUINOS POR ESPECTROFOTOMETRIA SUBMETIDOS A EXERCÍCIO EM ESTEIRA E SUPLEMENTADOS COM VITAMINA “E”

Pollyanny Ferreira Costa<sup>1</sup>  
Maria Carolina Gobbi de Oliveira<sup>1</sup>  
Letícia Andreza Yonezawa<sup>2</sup>  
Marcos Jun Watanabe<sup>3</sup>  
Aguemi Kohayagawa<sup>4</sup>  
Tatiana de Sousa Barbosa<sup>5</sup>

### RESUMO

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) faz parte de um grupo de lipoproteínas que, por sua natureza anfifílica, são responsáveis pelo transporte de colesterol plasmático, sendo esse carreamento importante, uma vez que o colesterol é insolúvel no plasma sanguíneo. Sabe-se que a principal fonte de energia dos cavalos, para a contração basal dos músculos, é obtida a partir dos ácidos graxos livres proveniente do tecido adiposo e os corpos cetônicos, produtos da quebra de ácidos graxos provenientes do fígado, processo que gera espécies reativas de oxigênio (ERO), que, em excesso, leva a um estresse oxidativo celular. Para evitar o dano resultante desse processo, o organismo tem um sistema de defesa antioxidantes, que conta com a participação da vitamina E (dl- $\alpha$ -tocoferol). Quando a LDL se encontra elevada, o colesterol pode se depositar na luz dos vasos sanguíneos, diminuindo o seu calibre e podendo, desse modo, causar o enrijecimento da parede do vaso sanguíneo e a formação de placas de atheroma nos cavalos. Normalmente, os valores desse colesterol LDL são obtidos pela equação de Friedewald, por isso neste estudo objetivou-se determinar os valores de colesterol LDL por espectrofotometria em equinos submetidos à exercício físico em esteira e suplementados com vitamina “E”. Para tal, foram selecionados dez cavalos hípidos da raça Árabe e Crioulo, em que as amostras foram processadas em duplicata utilizando os kits comerciais LDL Direto (BioClin®) por meio de espectrofotômetro semiautomático BA-88A (Mindray®). Neste estudo, não se obteve diferença estatística significativa entre os tempos analisados e nem com a suplementação de vitamina “E”, com o protocolo estabelecido.

**Palavras-chave:** cavalos, lipídios, espectrofotômetro, antioxidante.

### DETERMINATION OF EQUINE'S LDL CHOLESTEROL BY SPECTROPHOTOMETRY SUBMITTED TO EXERCISE ON TREADMILL AND SUPPLEMENTED WITH VITAMIN “E”

### ABSTRACT

Low density lipoprotein (LDL) is part of a group of lipoproteins which in amphiphilic nature, are responsible for transporting cholesterol plasma, it is important entrainment, since cholesterol is insoluble in blood plasma. It is known that the main power source of the horses to the basal contraction of the muscle, is obtained from the free fatty acids from adipose tissue and ketone bodies, breakage products of fatty acids from the liver, a process that generates species reactive oxygen (ROS), which, in excess, leads to cellular oxidative stress. To avoid the resulting damage of this

<sup>1</sup> Graduanda em Medicina, Universidade Vila Velha (UVV)

<sup>2</sup> Centro Ciências Agroveterinária UDESC - Av. Luis de Camões 2090- Conta Dinheiro, Lages - SC, 88520-000.

<sup>3</sup> Depto. Cirurgia e Anestesiologia Veterinária – FMVZ-UNESP

<sup>4</sup> Depto. Clínica Veterinária, FMVZ-UNESP

<sup>5</sup> Pós-graduanda em Ciência Animal, Universidade Vila Velha - UVV

process, the body has an antioxidant defense system, which includes the participation of vitamin E (dl- $\alpha$ -tocopherol). When LDL is high, cholesterol can be deposited in the lumen of blood vessels, reducing their size and can thus cause the hardening of the blood vessel wall and the formation of atheroma in horses. Normally, the values that LDL cholesterol are obtained by the Friedewald equation, so this study aimed to determine the LDL cholesterol levels by spectrophotometry in horses submitted to exercise on a treadmill and supplemented with vitamin "E". To this ten healthy Arabe and Criolo horses were selected. The samples were processed in duplicate using the Direct LDL commercial kits (BioClin<sup>®</sup>) by means of semi-automatic spectrophotometer BA-88A (Mindray<sup>®</sup>). This study did not present a statistically significant difference between the analyzed time and not with vitamin supplementation "E" with the established protocol.

**Keywords:** horses, lipids, spectrophotometer, antioxidants

## DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE COLESTEROL LDL EQUINA POR ESPECTROFOTOMÉTRICA SOMETIDOS A EJERCICIO EN ESTERA Y SUPLEMENTADOS CON VITAMINA "E"

### RESUMÉN

La lipoproteína de baja densidad (LDL) es parte de un grupo de lipoproteínas que en la naturaleza anfífilica, son responsables de transportar el colesterol en plasma, siendo el arrastre importante, ya que el colesterol es insoluble en el plasma sanguíneo. Se sabe que la fuente de alimentación principal de los caballos a la contracción basal del músculo, se obtiene a partir de los ácidos grasos libres del tejido adiposo y los cuerpos cetónicos, productos de rotura de los ácidos grasos del hígado, un proceso que genera especies reactivas de oxígeno (ROS), que, en exceso, conduce a estrés oxidativo celular. Para evitar el daño resultante de este proceso, el cuerpo tiene un sistema de defensa antioxidante, que incluye la participación de la vitamina E (DL- $\alpha$ -tocoferol). Cuando LDL es alta, el colesterol puede ser depositado en el lumen de los vasos sanguíneos, lo que reduce su tamaño y por lo tanto puede causar el endurecimiento de la pared del vaso sanguíneo y la formación de placas de atheroma en los caballos. Normalmente, los valores de colesterol LDL que se obtienen mediante la ecuación de Friedewald, por lo que este estudio tuvo como objetivo determinar los niveles de colesterol LDL por espectrofotometría en caballos sometidos a ejercicio en estera y suplementados con vitamina "E". Para esto diez caballos sanos fueron seleccionados de la raza Criollo y Árabe, en el que las muestras se procesaron por duplicado utilizando los kits comerciales de LDL directa (BioClin<sup>®</sup>) por medio de espectrofotómetro semi-automática BA-88A (Mindray<sup>®</sup>). Este estudio no presentó una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo analizado y no con la administración de suplementos de vitamina "E" con el protocolo establecido.

**Palabras clave:** cavallos, lípidos, espectrofotómetro, antioxidante.

### INTRODUÇÃO

Os lipídeos são a segunda maior fonte de energia em equinos, sendo no exercício intenso considerados a principal fonte (1). Para tanto, eles são digeridos no intestino delgado sobre ação das lipases e, concomitantemente, emulsificados pelos sais biliares(2,3). Finalmente, os ácidos graxos formados no processo são absorvidos no íleo distal, ceco ou intestino grosso(3). Sendo que, é no intestino grosso que há uma grande digestão, mediada pela microbiota local, que produz ácidos graxos voláteis essenciais no metabolismo energético (4). A produção de energia a partir dos lipídeos é feita pelo processo de oxidação aeróbica, em que o ácido graxo é oxidado e se torna energia pronta para o uso sob a forma de adenosina trifosfato (ATP) (5).

Dentre os lipídeos, o colesterol é um dos mais relevantes no organismo, que se apresenta no sangue ligado à lipoproteína, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), conhecido como “mau colesterol” (6). A LDL apresenta a função de transportar lipídeos do fígado para os tecidos, em excesso, é altamente aterogênica(7). Nos cavalos, a LDL é responsável pelo transporte de 15% do colesterol plasmático, apesar de ser a lipoproteína com maior concentração de colesterol, tendo como principal função fornecer colesterol para os tecidos periféricos(8). Seu peso em equinos é composto 6% por triacilglicerol, 8% por colesterol, 36% por ésteres, 23% por fosfolipídeos e 27% por proteína (apolipoproteína)(9).

Usualmente, o valor da LDL é estimado indiretamente a partir do valor do colesterol e duas de suas frações, que são lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) aplicados na equação de Friedewald[Colesterol LDL = Colesterol total - (colesterol-HDL + triglicéridos/5)], em seres vivos com predomínio da LDL no organismo (7,10). Porém, nos equinos, há o predomínio do colesterol-HDL, o qual se revela aumentado em resposta a maior ingestão de gordura e de colesterol, logo o uso da equação para cálculo da concentração sérica de LDL poderia enviesar os valores da LDL (10,11). Ademais, o método não é apropriado para determinar perfil lipídico sob condições de dislipidemias, como visto em humanos (12).

Em equinos submetidos a exercício físico exaustivo, esses lipídeos sofrerão maior lipoperoxidação, pois, com a atividade física, há o aumento acentuado da respiração celular com maior síntese de radicais livres, responsáveis pelo dano oxidativo que afeta a integridade celular e desencadeiam tal processo de oxidação lipídica (13,14). Portanto, para evitar os efeitos danosos do estresse oxidativo à célula, o organismo conta com um sistema antioxidante, no qual um de seus componentes é a vitamina E (dl- $\alpha$ -tocoferol)(14,15). Logo a suplementação de equinos com vitamina E reduz a produção de radicais livres, pois essa vitamina converte os radicais livres em espécies mais estáveis e, portanto, menos reativas(16). Essa ação antioxidante do tocoferol é verificada laboratorialmente por uma diminuição de malondialdeído, que é um marcador de injúria celular (17).

Assim, devido à importância dos lipídios no metabolismo equino e à não padronização dos valores basais de LDL usando a mensuração direta pelo espectrofotômetro, objetivou-se no presente estudo determinar os valores de colesterol-LDL por espectrofotometria e verificar a influência da vitamina “E” nos níveis séricos dessa lipoproteína.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

O trabalho foi realizado sob a aprovação do comitê de ética com o protocolo nº128/2009 CEUA/ UNESP – Botucatu.

Utilizou-se 10 equinos, sendo cinco da raça Puro Sangue Árabe e cinco da raça Crioula, mantidos em piquetes do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, sob as mesmas condições de manejo alimentar e sanitário. Os animais estavam sem treinamento físico por mais de um ano, com idade variando de oito a dez anos, e peso médio de  $372,1 \pm 32,9$  kg, foram considerados hígidos mediante exames hematológico e bioquímico sérico.

### Delineamento experimental

Os equinos foram submetidos a um teste padrão de exercício progressivo em esteira de alta velocidade (Mustang 2200 AG, Kagra, Suíça) inclinada a 6%, da qual a velocidade é elevada gradualmente, com o protocolo de exercício proposto por Watanabe et al. (18). Utilizou-se a máscara de análise de trocas gasosas e dados ventilatórios (Metavet, Cortex, Alemanha), para se

extrair a carga de trabalho para cada equino, com base no consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx)(19), sendo o valor médio dos animais de  $110,4 \pm 20,4$  mL/kg/min.

Após 14 dias do teste progressivo, os equinos foram submetidos ao teste de baixa intensidade e longa duração (TLD1). O teste, considerado de exercício predominantemente aeróbico (concentração de lactato inferior a 4mmol/L), foi realizado com a esteira inclinada a 6%, à velocidade de 35% do  $VO_2$ máx de cada animal pelo período de 60 min (20), correspondendo a uma velocidade média de  $2,3 \pm 0,5$  m/s.

A suplementação da vitamina E (dl- $\alpha$ -tocoferol) dos animais teve início logo após o teste TLD1, na dose de 1.000 UI/animal (21), por meio de cápsulas gelatinosas (E-tabs 1000 UI, Sigma Pharma, Hortolândia, Brasil) misturadas a raspas de rapadura, por via oral, diariamente e sem interrupção até o final do experimento. Após 59 dias do início da suplementação, os equinos realizaram o segundo teste (TLD2) com o mesmo protocolo de TLD1. A temperatura e a umidade relativa do ar do salão do Centro de Medicina Esportiva Equina da Unesp de Botucatu, onde os testes foram realizados, variou de 17,0 a 20,6°C e 66 a 81%, respectivamente.

### Colheita e processamento das amostras

As coletas de sangue foram realizadas antes do teste (M0), imediatamente após o exercício (PE) e 12h subsequente, sendo armazenadas em tubos contendo ativador da coagulação para obtenção de soro e foram imediatamente separados e congelados a -80°C até serem processadas.

Foi então determinada a concentração dos triglicerídeos séricos pelo método enzimático com kit comercial Bioclin® em analisador bioquímico semiautomático Mindray®, modelo BA-88A, no laboratório de Patologia Clínica da Universidade Vila Velha.

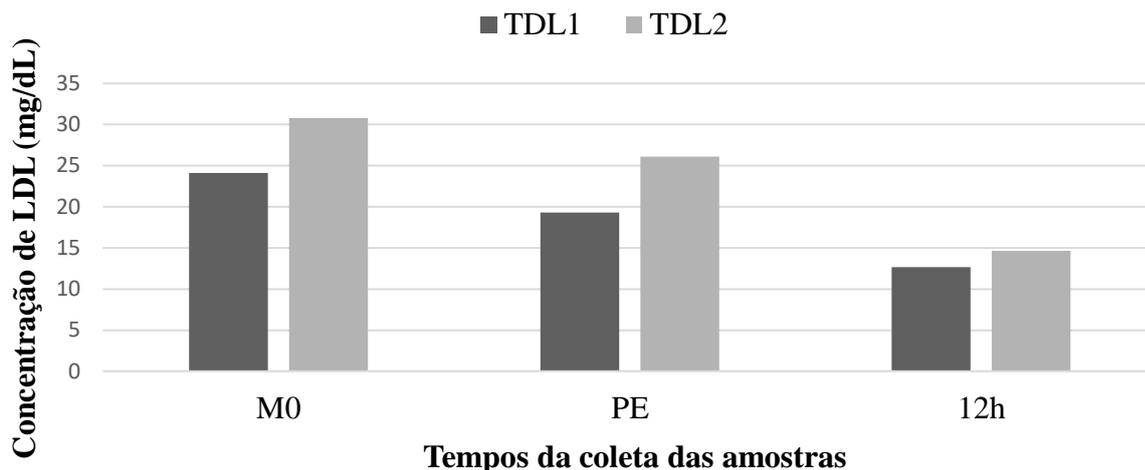
### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes do exercício (M0), as dosagens de LDL-colesterol na ausência de suplementação com vitamina E obteve-se uma média de  $24,11 \pm 7,37$  mg/dL. Já para as amostras de LDL-colesterol de equinos com suplementação com vitamina E, obteve-se média de  $30,78 \pm 20,74$  mg/dL.

Logo após o exercício (PE), as dosagens de LDL-colesterol na ausência de suplementação com vitamina E obteve-se uma média de  $19,29 \pm 10,36$  mg/dL. Já para as amostras de LDL-colesterol de equinos com suplementação com vitamina E, obteve-se média de  $26,11 \text{ mg/dL} \pm 10,68$  mg/dL.

Já no momento 12 horas após o exercício (12h), as dosagens de LDL-colesterol na ausência de suplementação com vitamina E obteve-se uma média de  $12,65 \pm 7,53$  mg/dL. Já para as amostras de LDL-colesterol de equinos com suplementação com vitamina E, obteve-se média de  $26,11 \text{ mg/dL} \pm 10,68$  mg/dL.

Todos os resultados estão apresentados na figura 1, sendo em TDL1 os equinos ainda sem suplementação e TDL2 o momento com suplementação de vitamina D.



M0 = LDL no repouso; PE = LDL imediatamente após o exercício; 12 h = LDL em horas após o exercício.

Figura 1. Comparação da dosagem de LDL em equinos com e sem a suplementação de vitamina E.

O estudo de Ozório e Velázquez (10), realizado com 200 cavalos revelou com o método de precipitação média de 32 mg/dL, com desvio padrão de 8,8 mg/dL, sendo que o valor mínimo foi de 13 mg/dL e o valor máximo de 59 mg/dL. No mesmo estudo, determinada a dosagem de LDL pelo método de Friedewald, encontrou-se média de 29 mg/dL, com desvio padrão de 7,0 mg/dL e valores mínimos e máximos de 11,2 e 54,2 mg/dL, respectivamente (10). Comparando-se tais resultados com os do presente estudo, observou-se que os valores mínimo e máximo obtidos por espectrofotometria se encontram dentro dos valores mínimos e máximos obtidos tanto por precipitação quanto pela fórmula de Friedewald, possivelmente pela semelhança na amostra, ou seja, cavalos de idade semelhante, mantidos adequadamente e com boas condições de saúde. Além disso, outra pesquisa realizada pelos mesmos autores (22), também feita pelo método direto e realizada com 200 equinos, encontrou valor médio de LDL-colesterol correspondente a 27,9 mg/dL, valor mínimo de 14,0 mg/dL e valor máximo de 51 mg/dL. Os valores obtidos são similares aos apresentados nesse estudo, possivelmente pela determinação da dosagem direta da LDL nos dois estudos.

Assenza et al. (23) em seu estudo realizado a partir da análise de 34 cavalos em programa de treinamento obteve, no dia zero do estudo, média do LDL-colesterol correspondente a 72,15 mg/dL, com desvio-padrão de 14,68 mg/dL para cavalos de trote e média de 45,26 mg/dL, com desvio-padrão de 21,13 mg/dL para cavalos puro sangue. Ambas as médias diferem das encontradas no presente estudo, possivelmente por se tratar de condições esportivas e raças diferentes de cavalos, que são de trote e de puro sangue.

Ao utilizar a fórmula de Friedewald em 92 cavalos de corrida da raça árabe e mestiça encontrou-se média de 35 mg/dL de LDL-colesterol, com desvio-padrão de 1,54 mg/dL, em estudo de Hasso et al. (24)<sup>10</sup>. Tal resultado se encontra dentro dos valores obtidos no presente estudo, possivelmente pela semelhança das raças, uma vez que ambos utilizam cavalos árabes. Porém, a diferença entre as médias pode se dar pela utilização da fórmula de Friedewald, diferindo do estudo em questão que usou o método de espectrofotometria.

Já no estudo de Gonzaga et al. (25), usando seis cavalos suplementados com um antioxidante gama-orizanol, foram obtidos uma média e um desvio padrão de LDL-colesterol, calculado pela fórmula de Friedewald, de 38,44 mg/dL e 10,38 mg/dL, respectivamente. Essa substância reduz o colesterol plasmático, diminui a biossíntese do colesterol hepático, reduz a absorção do colesterol e aumenta a excreção de ácidos biliares nas fezes (25). Essa diferença encontrada nos estudos pode ser explicada, possivelmente pela utilização de diferentes tipos de antioxidantes.

Com o passar do tempo de treinamento foi observado um aumento dos níveis de LDL, fato observado pelas médias de TDL2 que foram superiores a TDL1. Tal comportamento foi observado também por Kurcz(21), provavelmente, porque o exercício aumenta a utilização de lipídeos da dieta e sua mobilização como fonte de energia. Entretanto os resultados encontrados no presente estudo não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

A redução dos níveis plasmáticos de LDL após o exercício pode ser explicada pelo reflexo da redução do colesterol plasmático, que especialmente em esforços, é utilizado para síntese de cortisol pela glândula adrenal e pela sua utilização no metabolismo aeróbico(1). Porém as reduções dos valores da LDL encontrada após o exercício não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

## CONCLUSÃO

O presente estudo apresenta valores de LDL-colesterol por espectrofotometria em equinos, visando contribuir valores de referência basais por meio da dosagem direta. Entretanto, ainda há necessidade de estudos para a determinação de valores de referência de LDL-colesterol. A partir do estudo não é possível afirmar que a vitamina E altera os níveis séricos da LDL, pois os dados encontrados não apresentam significância estatística. Assim ainda se sugere mais estudos para determinar a real influência da vitamina E nos níveis séricos de LDL.

## APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos metodológicos envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista no dia 29/09/2009 (nº 128/2009-CEUA/ UNESP – Botucatu).

## APOIO E FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nº08/57366-9; 09/53314-7, Universidade Vila Velha M03-2014PI008.

## REFERÊNCIAS

1. Noleto PG. Perfil bioquímico de equinos submetidos a provas de esforço físico [dissertação]. Universidade Federal de Uberlândia e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2012.
2. Morgado E, Galzerano L. Utilização de óleos em dietas para equinos. Revista Eletrônica de Veterinária, 2006; 7.
3. Ribeiro RM. Inclusão de Gordura na Alimentação de Equinos [tese]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e Departamento de Nutrição e Produção Animal;2007.
4. Fassio PO et al. Uso do Óleo de Canola na Alimentação de Equinos Atletas. In: II Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG do campus Bambuí; 2009. Instituto Federal de Minas Gerais; Zootecnia do campus Bambuí; 2009.
5. Duarte PC. Avaliação do metabolismo energético de cavalos em provas de longa distância: Accutrend® Plus versus laboratório [dissertação]. Universidade de Brasília e Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária; 2013.

6. Santos JE, Guimaraes AC, Diamant J. Consenso Brasileiro Sobre Dislipidemias Detecção, Avaliação e Tratamento. *Arq Bras Endocrinol Metab.* São Paulo,1999; 43:287-305.
7. Motta VT. *Bioquímica Clínica para o Laboratório - Princípios e Interpretações.* Rio de Janeiro:Editora Medbook, 5ª Ed; 2009.
8. Brandi RA. Parâmetros sanguíneos de cavalos de pólo em Atividade, suplementados com óleo de girassol [dissertação]. Universidade Federal de Lavras; 2004.
9. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss, ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* Estados Unidos: Elsevier, 6ª edição; 2008.
10. Osorio, J.H. Determinación de los niveles de colesterol LDL en una especie con patrón HDL. *Rev. investig. vet. Perú, Lima,* 2013; 24.
11. Bauer JE. Metabolismo comparado de lípidos y lipoproteínas. *Pet's Ciencia,* 1997;13: 362-376.
12. Baigent, C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet,* 2000; 35(9224):147-52.
13. Avellini, L.; Chiaradia, E.; Gaiti, A. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B,* 1999; 123.
14. Vieira WSV. Perfil bioquímico e capacidade antioxidante total em cavalos de polo suplementados com selênio e vitamina E [tese]. Instituto de Veterinária e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.
15. Dias DCR. Estresse oxidativo na fisiopatogenia de enfermidades de equinos. In: II simpósio alagoano de medicina equina; 2012, *Revista Brasileira de Medicina Equina. Suplemento 1, v. 40.* 2012.
16. Catania, A. S.; Barros, C. R. de; Ferreira, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. *Arq Bras Endocrinol Metab,* São Paulo, 2009; 53:550-9.
17. Yonezawa, L.A, et al. Efeito da suplementação com vitamina E sobre os metabolismos oxidativo e cardíaco em equinos submetidos a exercício de alta intensidade. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,* 2015; 67:71-79.
18. Watanabe, M.J.; Silveira, V.F.; Machado, L.P. et al. Aplicação da espirometria durante teste padrão de exercício progressivo em esteira para avaliação da troca gasosa respiratória de equinos da raça Árabe. *Arch. Vet. Sci.,* v.14, p.17-24, 2009.
19. Kaneko, J.J., Harvey J.W., Bruss, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* Elsevier, 2008; 6.
20. Brandi RA. Parâmetros sanguíneos de cavalos de pólo em Atividade, suplementados com óleo de girassol [dissertação]. Universidade Federal de Lavras; 2004.

21. Kurcz EV. Lipoprote in profiles of the horse in response to increased dietary fat and exercise [dissertação]. University of Arizona; 1992.
22. Osorio, O.J.; Uribe-Velazquez, L. Comparación de los métodos Directo y de Fried ewald para la determinación de los niveles de colesterol LDL enel equino. Rev. MVZ Cordoba, Córdoba, 2011; 16.
23. Assenza, A, et al. Lipid Utilization Pathways Induced by Early Training in Standardbred Trotters and Thorough bred. Journal of Equine Veterinary Science, 2012; .32:704–710.
24. Hasso, S. A, et al. Serum glucose concentration and lipid profile in racing horses. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 2011; 26:1-3.
25. Gonzaga, I. V. F. et al. Qualidade espermática e perfil plasmático de lipídeos em garanhões suplementados com óleo de arroz semi-refinado com alto teor de gama-orizanol. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. São Paulo, 2012; 49: 215-220.

**Recebido em: 22/06/2016**

**Aceito em: 21/02/2018**

**LIPID CONTENT, MITOCHONDRIAL ACTIVITY AND EARLY EMBRYO DEVELOPMENT IN OOCYTE COLLECTED FROM CROSSBRED COWS (*Bos taurus indicus*)**

Yoeli Mendez<sup>1</sup>  
Nohely Parra<sup>2</sup>  
Francisco Baez<sup>2</sup>  
Robert Valeris<sup>3</sup>  
Patricia Villamediana<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

The objective of this research was to evaluate the effect of phenotypic predominance on lipid content, mitochondrial activity and early developmental competence as indicators of oocyte quality. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were recovered through follicular aspiration, and underwent *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF), and *in vitro* culture (IVC) of presumptive zygotes. Lipid content and mitochondrial activity in immature and IVM oocytes were determined. A maturation rate of 80.6% and 69.3% was found for oocytes predominantly *B. indicus* and predominantly *B. taurus*, respectively. Total fertilization rate was 27.6%; 26.1% for predominantly *B. indicus* oocytes and 29% for predominantly *B. taurus* oocytes. A total of 55.5% and 57.5% of cleaved embryos after 48 and 72 h post-insemination (hpi) in predominantly *B. indicus* group were observed, respectively. As for the predominantly *B. taurus* group, 48.6% and 60.4% of cleaved embryos were found after 48 and 72 hpi, respectively. In both groups, immature oocytes showed a greater amount of small lipidic droplets ( $p < 0.0001$ ); IVM decreased the number of small lipid droplets ( $p < 0.0001$ ) and increased the number of medium and large lipid droplets ( $p < 0.0001$ ). Predominantly *B. indicus* oocytes had a greater number of small and medium-sized lipid droplets, while there were no significant differences in large lipid droplets. IVM oocytes had higher mitochondrial activity than immature oocytes group ( $p < 0.05$ ) without any effect of phenotypic predominance on this parameter. Assessment of lipid content was not a predictive factor of oocyte quality in crossbred cows.

**Key words:** Oocyte quality, lipid content, phenotypic predominance, *Bos indicus*, *Bos taurus*.

**CONTEÚDO LIPÍDICO, ATIVIDADE MITOCONDRIAL E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE DE OÓCITOS COLETADOS DE VACAS MISTIÇAS (*Bos taurus indicus*)**

**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da predominância fenotípica no conteúdo lipídico como um indicador da qualidade do oócito. Os COC foram recuperados por aspiração folicular e submetidos a maturação *in vitro* (IVM), fertilização *in vitro* (FIV) e cultura *in vitro* (CIV). Determinou-se o conteúdo lipídico e atividade mitocondrial em oócitos imaturos e IVM. A taxa de maturação total era de 75%, com valores de 80,6% e 69,3% para oócitos predominantemente *B. Indicus* e predominantemente *B. taurus*, respectivamente. A taxa de fertilização total foi de 27,6%, para oócitos predominantemente *B. indicus* e predominantemente *B. taurus*, este foi de 26,1% e 29%, respectivamente. Um total de 52,1% de embriões divididos e 58,9% foi observada após 48 e 72 horas após a inseminação (hpi), respectivamente. Além disso, para o grupo predominantemente *B. indicus*

<sup>1</sup> Técnico de Área Inversiones Porcinas Venezuela. Correspondência.

<sup>2</sup> Laboratorio de Citogenética, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia.

<sup>3</sup> Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias.

55,5% e 57,5% embrião clivada após 48 e 72 hpi foi observado. Enquanto para o grupo predominantemente *B. taurus* 52,1% e 58,9% dos embriões divididos após 48 e 72 hpi respectivamente. Oócitos imaturos mostraram gotas lipídicas mais pequenas ( $p < 0,0001$ ), em contraste com oócitos IVM com maior número de gotas lipídicas médias e grandes ( $p < 0,0001$ ). Oócitos predominantemente *B. indicus* mostraram mais gotas lipídicas pequenas ( $p = 0,0005$ ) e médias ( $p = 0,005$ ), enquanto que para as gotas lipídicas grandes não foram observadas diferenças significativas. Oócitos IVM tiveram maior atividade mitocondrial que o grupo de oócitos imaturos ( $p < 0,05$ ), não houve efeito de predominância fenotípica sobre este parâmetro. A avaliação do conteúdo lipídico não foi um preditor de qualidade dos oócitos nas vacas mestiças.

**Palabras-Chave:** Qualidade oocitária, conteúdo lipídico, predominância fenotípica, *Bos indicus*, *Bos taurus*.

## CONTENIDO LIPÍDICO, ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO DE OVOCITOS PROVENIENTES DE VACAS MESTIZAS (*Bos taurus indicus*)

### RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue el de valorar el efecto de la predominancia fenotípica sobre el contenido lipídico como indicador de la calidad ovocitaria. Los COC's fueron recuperados mediante aspiración folicular y sometidos a maduración in vitro (MIV), fecundación in vitro (FIV) y cultivo in vitro (CIV). Se determinó el contenido lipídico y actividad mitocondrial en ovocitos inmaduros y MIV. La tasa de maduración total se ubicó en 75%, con valores de 80,6% y 69,3% para ovocitos predominantemente *B. indicus* y predominantemente *B. taurus*, respectivamente. La tasa de fecundación total fue de 27,6%, para ovocitos predominantemente *B. indicus* y predominantemente *B. taurus*, esta fue de 26,1% y 29%, respectivamente. Se observó un total de embriones divididos de 52,1% y 58,9% tras 48 y 72 horas post inseminación (hpi), respectivamente. Por otro lado, para el grupo predominantemente *B. indicus* se apreció un 55,5% y 57,5% de embriones divididos tras 48 y 72 hpi. Mientras que para el grupo predominantemente *B. taurus* se apreció un 52,1% y 58,9% de embriones divididos tras 48 y 72 hpi. Ovocitos inmaduros presentaron mayor número de gotas lipídicas pequeñas ( $p < 0,0001$ ), en contraste con los ovocitos MIV que presentaron mayor número de gotas lipídicas medianas y grandes ( $p < 0,0001$ ). Ovocitos predominantemente *B. indicus* presentaron mayor número de gotas lipídicas pequeñas ( $p = 0,0005$ ) y medianas ( $p = 0,005$ ), mientras que para las gotas lipídicas grandes no se apreciaron diferencias significativas. Ovocitos MIV presentaron mayor actividad mitocondrial que el grupo de ovocitos inmaduros ( $p < 0,05$ ), sin observarse efecto de la predominancia fenotípica sobre este parámetro. La valoración del contenido lipídico no resultó un factor predictivo de la calidad ovocitaria en hembras mestizas.

**Palabras clave:** Calidad ovocitaria, contenido lipídico, predominancia fenotípica, *Bos indicus*, *Bos taurus*.

### INTRODUCTION

Intracellular lipids are a substrate that can be used as a source of energy during invitro embryo production (IVP) (1,2). Thus, alterations in the quantity and the type of lipid species may result in a decrease of competence in oocyte development (3), being a paramount condition for the success in IVP, as are sperm quality and culture system (4,5). Leroy et al. (6) reported that IVM oocytes matured under fatty acid concentrations similar to those of follicular fluid from dairy cows undergoing negative energy balance, showed a decrease in maturation, fertilization, cleavage, and blastocyst rates. Furthermore, the increase in lipid content may induce mitochondrial dysfunction,

Mendez Y, Parra N, Baez F, Valeis R, Villamediana P. Lipid content, mitochondrial activity and early embryo development in oocyte collected from crossbred cows (*Bos taurus indicus*). Vet. e Zootec. 2018 mar.; 25(1): 120-131.

which results in abnormal chromosome segregation, alterations in mitochondrial morphology, distribution, and membrane potential, along with an increase in lipid droplets (7,8,9).

Oocyte quality is a major factor in the success of reproductive biotechnology implementation. Several studies resulted in the selection of morphologic and biochemical parameters that contribute as a whole to determine oocyte development competence. Recently, attention has been focused to the study of lipid content as an indicator of oocyte quality, due to the possibility of taking advantage of an endogenous energy source during IVP and the susceptibility to cryotolerance related to an increase in lipid droplets (10). An increment in concentration and variation of the composition of free fatty acids in the oocyte may impair its developmental competence (3,6).

In western Venezuela, dual-purpose cattle husbandry has been developed. It has resulted in crossbreeding programs mainly alternating *B. taurus* and *B. indicus*, with the aim of producing an animal capable of adapting to the particular environmental conditions of the tropics (11). Moreover, the effect of phenotypic predominance on oocyte quality is paramount for cattle husbandry in the tropics. Oocytes from predominantly *B. indicus* cows are more competent in the early stages of development *in vitro* than oocytes from cows with phenotypic predominance *B. taurus* in tropical settings (12).

Several studies have aimed to increase the success of IVP systems, from improvements in recollection methods of oocytes to the design of culture media similar to the physiological conditions in cows. However, few studies have focused on the effect of lipid content and mitochondrial activity over oocyte development competence, and especially in their relation with phenotypic component in tropical crossbred cows.

## MATERIALS AND METHODS

### Selection of females in the slaughterhouse

Before slaughter, all cow and heifer was classified according to grade crossing and phenotypic ratio according Isea-Villasmil e Aranguren-Méndez (13). Only animals with phenotypic predominances above 5/8 *Bos taurus* and *Bos indicus* were included in one of two groups, phenotypic predominance *Bos taurus* and *Bos indicus*, respectively.

### Oocyte collection and IVM

Ovaries were collected from local slaughterhouses, in an area that has characteristics of tropical wet forest with annual rainfall between 550-1500 mm. After collection, ovaries were transported within 2h to the laboratory in 0.9% NaCl (w/v) at 35-37 °C. For this study, bovine oocytes obtained from predominantly *B. indicus* (n=367) and predominantly *B. taurus* (n=369) crossbred cows, were used. COCs were recovered by aspiration of all visible follicles (2-8 mm) and resuspended in TCM-199 (11150-059, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with NaHCO<sub>3</sub> (2.2 mg/L), gentamicin sulfate (50 µg/mL), BSA (0.4 g/L), HEPES (25 Mm) and heparin (11.1 µg/mL). Oocytes enclosed in a compact cumulus with an evenly granulated cytoplasm were selected. Groups of 25 COCs were IVM in 100 µL drops of TCM-199 supplemented with FSH (0.5 µg/ml, Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche), 17β estradiol (1 µg/mL) gentamicin sulfate (25 µg/mL) and 10% fetal calf serum (FCS) in plates covered by mineral oil. COCs were cultured for 23 h at 38.5 °C in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air saturated humidity.

### Sperm preparation and IVF

Frozen semen from a single bull (*Bos taurus*) were thawed at 37 °C for 30sec and washed in a 15 Falcon tube using Percoll<sup>®</sup> gradients of 45% and 90% prepared with Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (TALP) solution (2 mL of 45% Percoll<sup>®</sup> at the top and 2 mL of 90% Percoll<sup>®</sup> in the bottom of the tube) by centrifugation at 325 g for 15 min; then the pellet was diluted with 0.5 mL TALP

Mendez Y, Parra N, Baez F, Valeis R, Villamediana P. Lipid content, mitochondrial activity and early embryo development in oocyte collected from crossbred cows (*Bos taurus indicus*). Vet. e Zootec. 2018 mar.; 25(1): 120-131.

solution and centrifuged a second time at 325 g for 10 min. After maturation, batches of COCs were fertilized in 100  $\mu$ L Talp Fert medium containing 0.6% fraction V fatty acid free BSA, 10  $\mu$ g/mL heparin, 20 mM penicillamine, 10 mM hypotaurine, and 1 mM epinephrine. Spermatozoa were added to a concentration of  $1 \times 10^6$  spermatozoa/mL. COCs and spermatozoa were incubated for 18 h at 38.5 °C under an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air saturated humidity.

## IVC

Presumptive zygotes were denuded of cumulus cells by manual pipetting. Droplets of 50  $\mu$ L of modified synthetic oviduct fluid with amino acids, citrate and myo-inositol (mSOFaaci) supplemented with fatty acid free BSA (6 mg/mL), sodium pyruvate (11mg/mL) and gentamicin sulfate (50  $\mu$ g/mL) were layered under mineral oil and embryos cultured in group of 25 at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in air saturated humidity. The embryos were cultured for 3 days.

## Oocytes denudation

Cumulus cells were mechanically removed from intact COCs by repeated pipetting with PBS supplemented with BSA (3mg/mL). Dispersion of cumulus was verified by a stereoscopic microscope.

## Assessment of lipid content

Oocytes were previously fixed in 10% formaldehyde in PBS, pH 7.4, for 2 h at room temperature. After fixation, they were washed in distilled water containing 0.05% polivinyl-alcohol (PVA) and then transferred to drops of 50% ethanol. After 2 min, oocytes were stained in drops of 1% Sudan Black B (w/v; S668, Fisher) in 70% ethanol for 1–2 min, then they were washed three times with 50% ethanol, 5 min each, followed by a 5 min wash in 0.05% PVA in distilled water. Prepared oocytes were mounted in 10  $\mu$ L glycerol on cover slips and examined under a light microscope at 600X magnification. To estimate the relative amount of lipid droplets in the cytoplasm in each oocyte, a grid with five squares of 1,600  $\mu$ m<sup>2</sup> (40 x 40  $\mu$ m) each was designed using ImageJ 14.1 software. Lipid droplets were classified as small, medium, and large (<2  $\mu$ m, 2–6  $\mu$ m, and >6  $\mu$ m, respectively). The number of droplets per category in the 1,600  $\mu$ m<sup>2</sup> square was counted, and the average number of droplets from five squares for each embryo was calculated. Data regarding lipid accumulation are presented as number of lipid droplets per 1,000  $\mu$ m<sup>2</sup> (14).

## Evaluation of mitochondrial activity in oocytes

Oocytes were stained with 0.02% Janus Green B in maturation medium and maintained at 38.5° C in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in humidity saturated air for 30 min. After several washes in PBS and PVA (0.1 mg/mL), oocytes were observed under light microscope (600X) (15). To estimate mitochondrial activity, a photograph of each oocyte was taken and processed with Adobe® Photoshop® CS6 software. Color photographs of oocytes were converted to gray scale images and the average gray intensity (arbitrary units) was obtained.

## Nuclear maturation

After denudation, oocytes were fixed with methanol + acetic acid (3:1) for 48 h at 4°C, stained with 1% solution of lacmoid in 45% glacial acetic acid, evaluated under an optical microscope (Olympus CX31, Japan®) (400X), and classified according to the meiotic stage reached: mature (metaphase II + polar body, telophase I) and immature (anaphase I, metaphase I, chromosomal condensation and in GV). Oocytes that could not be included in previous groups were considered as degenerate.

## Assessment of fertilization and cleavage rate

To evaluate the fertilization rate, oocytes were removed from culture at 17 hpi and fixed and stained as described in the previous section. Oocytes were examined under an optical microscope (Olympus CX31, Japan<sup>®</sup>) and classified as either (a) non fertilized – the presence of female and the absence of male chromatin; (b) normal fertilized: the presence of female and male chromatin in the cytoplasm, a decondensed sperm head, pronuclei or cleavage; (c) abnormal fertilized: asynchronous oocytes (marked alteration in the formation of pronuclei, as undecondensed sperm head or telophase II) and > 2 pronuclei (oocytes in which more than 2 pronuclei were observed in the cytoplasm); or (d) degenerate oocytes. Cleavage rate was evaluated at 48 and 72 hpi, taking into account the total of embryos of 2 or more cells obtained in relation to the total of oocytes that were fertilized. All embryos were observed under stereoscopic microscope (Olympus, SZX12, Japan<sup>®</sup>).

## Experimental design

Oocytes obtained from each of the phenotypic predominance were divided into two groups, the first group (GI) corresponding to immature oocytes were fixed and stained for evaluation of lipid content and mitochondrial activity. The second group (GII) were oocytes for IVM, from which a pooled sample of 10 oocytes in each group were used for the evaluation of meiotic progression, lipid content and mitochondrial activity. The rest of IVM oocytes (GII) were used in IVF, and a pooled sample of 10 oocytes of each group were fixed for the evaluation of fertilization rate after 17 hpi. Finally, cleavage rate after 48 and 72 hpi was assessed.

## Statistical analysis

Nuclear state, fertilization and cleavage rate were expressed as frequencies and analyzed using the Chi-square test. Lipid content and mitochondrial activity were expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed using General Linear Model (GLM PROC) and statistical LSMEANS of the SAS<sup>®</sup> Version 8.2 software (1999; SAS<sup>®</sup> Institute Inc., Cary, NC, USA). A value of  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## RESULTS

A total of 736 oocytes were included in this study; 367 oocytes represented the experimental group with *B. indicus* phenotypic predominance, and 369 oocytes represented the experimental group with *B. taurus* phenotypic predominance. Eighty-eight oocytes were analyzed for lipid content (Table 1). Immature oocytes showed a greater amount of small lipiddroplets; this condition changed as oocytes reached maturation, having a cytoplasm richer in medium and large lipid droplets ( $p < 0.0001$ ). No significant differences in large lipid droplets were found due to phenotypic predominance.

Table 1. Lipid content in immature and IVM oocytes from cows with phenotypic predominance of *B. indicus* and *B. taurus*.

Stage	Predominance	Total of evaluated oocytes	Small droplets <2 µm	Medium-sized droplets 2 a 6 µm	Large droplets > 6 µm
Immature oocytes	<i>B. indicus</i>	29	74.7 ± 37.1 <sup>a</sup>	12.4 ± 12.2 <sup>ab</sup>	0.1 ± 0.3 <sup>a</sup>
	<i>B. taurus</i>	26	41.7 ± 27.6 <sup>b</sup>	7.5 ± 6.8 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.5 <sup>a</sup>
	<b>Total</b>	<b>55</b>	59.1 ± 36.6 <sup>x</sup>	10.1 ± 10.2 <sup>y</sup>	0.2 ± 0.4 <sup>y</sup>
IVM oocytes	<i>B. indicus</i>	15	21.6 ± 12.5 <sup>bc</sup>	26.4 ± 11.2 <sup>c</sup>	2.1 ± 1.1 <sup>b</sup>
	<i>B. taurus</i>	18	8.6 ± 9.4 <sup>cd</sup>	17.8 ± 8.7 <sup>bc</sup>	2.4 ± 1.4 <sup>b</sup>
	<b>Total</b>	<b>33</b>	14.5 ± 12.6 <sup>y</sup>	21.7 ± 10.7 <sup>x</sup>	2.3 ± 1.3 <sup>x</sup>

Mean ± SD. Lipid droplets /10<sup>3</sup> µm<sup>2</sup>. <sup>a,b,c,d</sup> Values within the same column with different superscripts differ (p < 0.0005). <sup>x,y</sup> Values within the same column with different superscripts differ (p < 0.0001).

IVM oocytes showed greater mitochondrial activity (128.5 AU) than immature oocytes (133.9 AU). On the other hand, there was no effect of phenotypic predominance on this parameter (Table 2).

Table 2. Mitochondrial activity in bovine immature and IVM oocytes from cows with phenotypic predominance of *B. indicus* and *B. taurus*.

Stage	Predominance	Total of evaluated oocytes	Gray scale intensity
Immature oocytes	<i>B. indicus</i>	24	131.4 ± 11.2
	<i>B. taurus</i>	26	136.3 ± 9
	<b>Total</b>	<b>50</b>	133.9 ± 10.3 <sup>b</sup>
IVM oocytes	<i>B. indicus</i>	15	128.9 ± 15
	<i>B. taurus</i>	17	128.1 ± 12.5
	<b>Total</b>	<b>32</b>	128.5 ± 13.5 <sup>a</sup>

Mean ± SD. Arbitrary units. <sup>a,b</sup> Values within the same column with different superscripts differ (p < 0.05).

Maturation rate for predominantly *B. indicus* oocytes was 80.6%, whereas for the predominantly *B. taurus* group it was 69.3%. A 3.3% and 6.5% incidence of degenerate oocytes for predominantly *B. indicus* and predominantly *B. taurus* groups was observed, respectively. There were no significant differences in the above-mentioned parameters (Table 3).

Table 4 displays data corresponding the assessment of bovine oocyte fertilization, wherein a total of 145 presumptive zygotes were taken into account. The predominantly *B. indicus* group had 26.1% normal fertilized oocytes. As for the group predominantly *B. taurus*, 29% normal fertilized oocytes and 2.6% of degenerate oocytes, without any significant differences in any case.

Table 3. Nuclear maturation of bovine oocytes from cows with phenotypic predominance of *B. indicus* and *B. taurus*.

Predominance	Total of evaluated oocytes	N° of mature oocytes			N° of immature oocytes			N° Deg. n (%)	
		Total n (%)	TeloI n (%)	MII+CP n (%)	Total n (%)	GV n (%)	MI n (%)		AnaI n (%)
<i>B. indicus</i>	62	50 (80.6)	1 (1.6)	49 (79)	10 (16.1)	1 (1.6)	8 (12.9)	1 (1.6)	2 (3.3)
<i>B. taurus</i>	62	43 (69.3)	2 (3.2)	41 (66.1)	15 (24.2)	0	15 (24.2)	0	4 (6.5)
<b>Total</b>	<b>124</b>	<b>93 (75)</b>	<b>3 (2.4)</b>	<b>90 (72.5)</b>	<b>25 (20.2)</b>	<b>1 (0.8)</b>	<b>23 (18.5)</b>	<b>1 (0.8)</b>	<b>6 (4.8)</b>

TeloI: Telophase I. MII+CP: Metaphase II + polar body. GV: Germinal vesicle. MI: Metaphase I. AnaI: Anaphase I. N° Deg: degenerate oocytes.

Table 4. Assessment of fertilization in bovine oocytes from cows with phenotypic predominance of *B. indicus* and *B. taurus*

Predominance	Total of evaluated presumptive zygotes	N° of adnormal fertilized oocytes					N° Deg. n (%)
		Non Fert. Oocytes n (%)	Norm. Fert. Oocytes n (%)	Activated n (%)	Async. n (%)	>2PN n (%)	
<i>B. indicus</i>	69	45 (65.2)	18 (26.1)	3 (4.3)	0	0	3 (4.4)
<i>B. taurus</i>	76	47 (61.8)	22 (29)	2 (2.6)	2 (2.6)	1 (1.3)	2 (2.6)
<b>Total</b>	<b>145</b>	<b>92 (63.4)</b>	<b>40 (27.5)</b>	<b>5 (3.4)</b>	<b>2 (1.3)</b>	<b>1 (0.6)</b>	<b>5 (3.4)</b>

Non Fert. Oocytes: non fertilized oocytes. Norm. Fert. Oocytes: normal fertilized oocytes. Async: asynchronous oocytes. >2PN: oocytes with more than 2 pronuclei. Deg: degenerate oocytes.

The evaluation of embryo development was performed. After 48 and 72 hpi, 52.1% and 58.9% of total cleaved embryos, respectively, were observed (Table 5). The predominantly *B. indicus* group showed 55.5% and 57.5% cleaved embryos after 48 and 72 hpi, respectively; whereas, the predominantly *B. taurus* group had 48.6% and 60.4% cleaved embryos after 48 and 72 hpi, respectively. No statistically significant differences were observed.

Table 5. Evaluation of embryo development of bovine oocytes from cows with phenotypic predominance of *B. indicus* and *B. taurus*.

Predominance	Total zygotes in IVC	Total cleaved embryos 48 hpi n (%)	2 Cells n	>2 Cells n	Total cleaved embryos 72 hpi n (%)	2 Cells n	>2 Cells n
<i>B. indicus</i>	153	85 (55.5)	35	50	88 (57.5)	20	68
<i>B. taurus</i>	144	70 (48.6)	27	43	87 (60.4)	20	67
<b>Total</b>	<b>297</b>	<b>155 (52.1)</b>	<b>62</b>	<b>93</b>	<b>175 (58.9)</b>	<b>40</b>	<b>135</b>

Mendez Y, Parra N, Baez F, Valeis R, Villamediana P. Lipid content, mitochondrial activity and early embryo development in oocyte collected from crossbred cows (*Bos taurus indicus*). Vet. e Zootec. 2018 mar.; 25(1): 120-131.

## DISCUSSION

Research focusing on determination of lipid content in bovine oocytes is scarce, especially in *B. indicus* oocytes. This study presents the first findings for quantification and dynamics of lipid droplets in oocytes from crossbred cows. In this research, it was observed that lipid content was affected by both phenotypic predominance and maturation stage of the oocyte. A previous study by Ballard et al. (16), reported the presence of oocytes with greater amount of lipid content in *B. indicus* cows, having in turn higher levels of cholesterol and triglycerides in blood compared with *B. taurus* cows, which suggests the use of these indicators as predictive parameters of oocyte lipid content. By contrast, Ordóñez-León et al. (17) observed a greater amount of lipid droplets in *B. taurus* oocytes, followed by *B. indicus* x *B. taurus*, and finally *B. indicus* oocytes. As to maturation stage, immature oocytes showed greater amounts of lipid droplets; an abundance of small lipid droplets could be observed. This condition varied toward an increase in the presence of medium-sized and large droplets as MII was reached. Those results coincide with the findings of Hyttel et al. (18) who reported that the number, size, and distribution of lipid droplets change during oocyte maturation: immature oocytes have small lipid droplets, whereas mature oocytes have larger droplets.

The recognition of lipid droplets as functional organelles in the cell that participate in the regulation of lipid storage and metabolism is quite recent (19). Moreover, models trying to reveal the mechanisms of biogenesis and growth of these structures are continually modified and updated. There are at least three models that seek to explain the process of growth of lipid droplets: a) incorporation of neutral lipids and phospholipids to lipid droplets through domains having close contact with endoplasmic reticulum; b) lipid synthesis by the enzymatic machinery present in lipid droplets; c) fusion of preexistent lipid droplets (20).

The findings of this research seem to support the model of fusion of lipid droplets (19,20). In this case, small lipid droplets are abundantly found in immature oocytes ( $59.1/10^3 \mu\text{m}^2$ ), whereas medium-sized ( $10.1/10^3 \mu\text{m}^2$ ) and large ( $0.2/10^3 \mu\text{m}^2$ ) droplets are found in lesser amounts. After IVM, a decrease in the total number of lipid droplets occurred, but the amount of medium-sized ( $21.7/10^3 \mu\text{m}^2$ ) and large ( $2.3/10^3 \mu\text{m}^2$ ) lipid droplets increased (Table 1), in such a way that it is possible that the decrease in the total amount of lipid droplets is related to the fusion of small droplets that would integrate into larger droplets.

The presence of more lipid content in immature oocytes is associated with a greater number of mitochondria, higher division and blastocyst rate and greater numbers of total cells (21). Lipids in the oocyte may play a paramount role in its metabolism, due to the fact that triglyceride concentrations have been observed to decline in female gamete after IVM, and the inhibition of fatty acid oxidation during IVM results in alteration of embryo development (1,2).

In this research, mitochondrial activity was not affected by phenotypic predominance. No report about this parameter in oocytes from crossbred cows could be found. However, Esper and Barboza (In: 17), observed that IVP *B. indicus* embryos had a greater number of mitochondria than *B. taurus* embryos. Moreover, *B. indicus* oocytes had greater lipid content and tended to show higher mitochondrial activity after cows were administered fat enriched diets (22).

On the other hand, oocyte maturation stage is a factor that influences that parameter, IVM oocytes having higher mitochondrial activity than immature oocytes. These results coincide with previous studies wherein higher concentrations of ATP are observed in oocytes at MII (23,24,25). According to this, evaluation of oocyte morphology revealed that this trait is related to oocyte mitochondrial activity (23,24). Immature oocytes with brownish cytoplasm would have the ideal amount of lipid droplets and ATP to reach oocyte maturation; oocytes with pale cytoplasm would have few lipid droplets and lower concentrations of ATP, and finally, oocytes with dark cytoplasm would have a high amount of lipid droplets as well as high concentrations of ATP. Oocytes with high concentrations of ATP in the cytoplasm have a lower rate of first polar body extrusion after

they are subjected to IVM, whereas those with low levels of ATP could reach blastocyst stage with a low number of cells (24).

Oocytes from predominantly *B. indicus* and predominantly *B. taurus* cows showed maturation rates of 80.6% and 69.3%, respectively. By contrast, Báez et al. (12) reported values of 66.17% and 50.94% for oocytes from predominantly *B. indicus* and predominantly *B. taurus* cows, respectively. Fertilization rate was not affected by oocyte lipid content. That was also the conclusion of Cerri et al. (26), who administered diets enriched with fatty acids from different sources to cows without observing significant variations in fertilization rates. Leroy et al. (6) observed that IVM in the presence of stearic or palmitic acids had no influence on oocyte lipid content, but resulting in decreasing fertilization rates, maybe as part of a collateral effect mediated by alterations of oocyte maturation.

Mitochondrial activity, determined by oxygen consumption and reactive oxygen species (ROS) production, is augmented during fertilization process in bovine oocytes and it is related to pronuclei formation (27). On the other hand, swine oocytes with positive staining for bright cresyl blue had a greater number of mitochondrial DNA copies and higher fertilization rates than those negative to that stain (28). However, Ge et al. (29) reported that oxidative phosphorylation inhibition, even though it diminishes mitochondrial membrane potential and ATP synthesis, has no effect on murine oocytes fertilization rates; in this case it is probable that the inhibitory effect was not enough to cause a critical decrease in ATP concentrations.

Camargo et al. (30) found differences between racial groups, so that oocytes from *B. indicus* cows showed higher cleavage rates than those from *B. taurus* cows, with values of 66.7% and 53.1%, respectively. However, Paula-Lopes et al. (31) and Hernández-Cerón et al. (32) failed to detect differences in cleavage rates between oocytes from *B. taurus*, tropicalized *B. taurus*, and *B. indicus* at 38.5°C.

A slight increase in oxygen consumption is seen during the beginning of the first embryo cleavage, along with an increase in ROS concentrations, which is an indicator of the mitochondrial activity needed to meet the energy demand inherent to embryo cleavage (27). It is well known that the inhibition of oxidative phosphorylation and the decrease in the amount of mitochondrial DNA copies induce the decline of blastocyst rates in bovines in a dose-dependent way possibly due to the decrease in ATP concentrations by alterations in mitochondria distribution, and by mitotic spindle disarrangement (29). Culture media supplementation with L-carnitine augments ATP content in the oocyte and induces lipid droplets redistribution (33), as well as increases blastocyst rates (34) and enhances embryo development competence after vitrification (33).

The oocyte meiotic stage affects mitochondrial activity; IVM oocytes had higher mitochondrial activity than immature oocytes. Phenotypic predominance had no effect on this parameter. Studies undertaken to date have surmised the possibility of establishing lipid content determination as an indicator of oocyte quality. However, this research has proved that lipid content in slaughterhouse-derived oocytes determined through lipid droplets quantification vary according to phenotypic predominance, but they are not related to oocyte competence in crossbred cows; therefore, lipid content does not qualify as a parameter predictive of oocyte development potential for IVP in the tropics. However, the effect of phenotypic predominance on oocyte lipid content and the existence of studies that indicate a relationship between genotype and cryopreservation susceptibility, it would be worthwhile to consider the effect that lipid content could have on post-thawing survival in oocytes and embryos obtained from crossbred (*B. taurus indicus*) cows.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This project was funded by CONDES-LUZ (CC-0054-13).

## REFERENCES

1. Kim J, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocyte. *Reproduction*. 2001;122:131-8.
2. Ferguson E, Leese H. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev*. 2006;73:1195-201.
3. Aardema H, Vos P, Lolicato F, Roelen B, Knijn H, Vaandrager A, Helms J, Gadella B. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biol Reprod*. 2011;85: 62-9.
4. Krisher R. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*. 2004;82:E14-23.
5. Boni R. Origins and effects of oocyte quality in cattle. *Anim Reprod*. 2012;9:333-40.
6. Leroy J, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer A, de Kruif A, et al. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction*. 2005;130:485-95.
7. Igosheva N, Abramov A, Poston L, Eckert J, Fleming T, Duchon M, et al. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocyte and zygote. *PLoS One*. 2010;5:e10074.
8. Wu L, Dunning K, Yang X, Russell D, Lane M, Norman R, et al. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology*. 2010;151:5438-45.
9. Grindler N, Moley K. Maternal obesity, infertility and mitochondrial dysfunction: potential mechanisms emerging from mouse model systems. *Mol Hum Reprod*. 2013;19:486-94.
10. Leroy J, Genicot G, Donnay I, Van Soom A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reprod Domest Anim*. 2005;40:76-8.
11. Aranguren-Méndez J, Yáñez L. Planifique los cruzamientos. In: González-Stagnaro C, Soto-Belloso E. *Manual de ganadería doble propósito*. Maracaibo: Ediciones Astro Data SA; 2005. p.119-24.
12. Báez F, Chávez A, Hernández H, Villamediana P. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Rev Cient*. 2010;20(3):259-67.
13. Isea-Villasmil W, Aranguren-Méndez J. Clasificación fenotípica en vacas mestizas. In: González-Stagnaro C, Belloso ES. *Manual de ganadería doble propósito*. Maracaibo: Ediciones Astro Data SA; 2005. p.76-81.
14. Sudano M, Paschoal D, Rascado T, Lima J, Landim-Alvarenga F. The effect of fetal calf serum concentrations upon the *in vitro* *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* crossbred embryo production and the cytoplasmic lipid accumulation. *Vet Zootec*. 2011;18(1):123-34.

15. Popescu L, Gherghiceanu M, Hinescu M, Cretoiu D, Ceafalan L, Regalia T, et al. Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *J Cell Mol Med.* 2006;10(2):429-58.
16. Ballard C, Looney C, Lindsey B, Pryor J, Lynn J, Bondioli K, et al. Comparing oocyte lipid content with circulant cholesterol and triglyceride levels of *Bos taurus* and *Bos indicus* donor cows. *Reprod Fertil Dev.* 2008;20:177.
17. Ordóñez-León E, Merchant H, Medrano A, Kjelland M, Romo S. Lipid droplet analysis using *in vitro* bovine oocytes and embryos. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(2):306-14.
18. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology.* 1997;47(1):23-32.
19. Farese R, Walther T. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell.* 2009;139(5):855-60.
20. Yang H, Galea A, Sytnyk V, Crossley M. Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr Opin Cell Biol.* 2012;24(4):509-19.
21. Jeong W, Cho S, Lee H, Deb G, Lee Y, Kwon T, et al. Effect of cytoplasmic lipid content on *in vitro* developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology.* 2009;72(4):584-9.
22. Castaneda C, Kaye P, Pantaleon M, Phillips N, Norman S, Fry R, et al. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology.* 2013;79(3):417-22.
23. Stojkovic M, Machado S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves P, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol Reprod.* 2001;64(3):904-9.
24. Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote.* 2006;14(4):299-304.
25. Tarazona A, Rodríguez J, Restrepo L, Olivera-Ángel M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. *Reprod Domest Anim.* 2006;41(1):5-11.
26. Cerri R, Juchem S, Chebel R, Rutigliano H, Bruno R, Galvão K, et al. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 2009;92(4):1520-31.
27. Lopes A, Lane M, Thompson J. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Hum Reprod.* 2010;25(11):2762-73.
28. El Shourbagy S, Spikings E, Freitas M, John J. Mitochondria directly influence fertilization outcome in the pig. *Reproduction.* 2006;131:233-45.
29. Ge H, Tollner T, Hu Z, Dai M, Li X, Guan H, et al. The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation *in vitro* on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. *Mol Reprod Dev.* 2012;79(6):392-401.

30. Camargo L, Viana J, Ramos A, Serapião R, de Sa W, Ferreira A, et al. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*. 2007;68(4):626-32.
31. Paula-Lopes F, Chase C, Al-Katanani Y, Krininger C, Rivera R, Tekin S, et al. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction*. 2003;125(2):285-94.
32. Hernández-Cerón J, Chase C, Hansen P. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. *J Dairy Sci*. 2004;87(1):53-8.
33. Chankitisakul V, Somfai T, Inaba Y, Techakumphu M, Nagai T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology*. 2013;79(4):590-8.
34. Sutton-McDowall M, Feil D, Robker R, Thompson J, Dunning K. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*. 2012;77(8):1632-41.

**Recebido em: 05/10/2016**

**Aceito em: 21/02/2018**

## A PRÁTICA DO TRATAMENTO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS, CUIDADOS E PROTOCOLOS

Ana Luísa Holanda de Albuquerque<sup>1</sup>  
Helio Langoni<sup>2</sup>

### RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas que afetam humanos, animais domésticos (cães e gatos) e silvestres, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre pela picada do mosquito do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC), a forma mais agressiva, é causa frequente de doença clínica em cães e, ocasionalmente em gatos. Seus reservatórios variam de acordo com a região, podendo ser animais domésticos ou silvestres. *Leishmania infantum* está presente do sul do México até a América do Sul. No caso da LVC, a recomendação do Conselho Federal de Medicina Veterinária é a eutanásia. O tratamento era considerado ilegal até 2013, quando houve autorização do tratamento pelo Tribunal Regional Federal da 3ª Região em todo País, desde que não se utilizassem medicamentos para o tratamento da leishmaniose humana. Tratar ou não, indicar ou não eutanásia é questão polêmica para os clínicos veterinários, pois o tratamento não elimina totalmente a carga parasitária dos animais, e trata-se de uma zoonose. Em Brasília, a leishmaniose visceral é considerada endêmica, considerando o comportamento epidemiológico e a confirmação da autoctonia dos casos humanos. No presente estudo, foi aplicado questionário para se avaliar a prática do tratamento dessa enfermidade, em clínicas veterinárias de pequenos animais de Brasília. Cinco delas realizam o tratamento da LVC. Todas recomendam o alopurinol, quatro a miltefosina, três a marbofloxacina e duas a anfotericina B e antimoniais pentavalentes. Duas clínicas se recusaram a responder o questionário, e outras duas não realizam o tratamento, recomendando eutanásia.

**Palavras-chave:** LVC, tratamento, clínicas particulares, Brasília.

## TREATMENT PRACTICE IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS (CVL) IN VETERINARY CLINICS, CARE AND PROTOCOLS

### ABSTRACT

The leishmaniasis are a group of infectious diseases that affect humans, dogs, cats and wild animals worldwide. It is caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The infection is transmitted by sandflies of the genus *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World. The Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), the most severe disease form, is a frequent cause of clinical illness in dogs depending on the region, being less common in cats. The Brazilian Federal Counsel of Veterinary Medicine recommendation for the CVL illness is euthanasia, being illegal to treat until 2013, when the Third Region Federal Court authorized it all over the Country, as long as the medication isn't the same used in humans. Whether to treat or not and sacrifice the animal is a polemic veterinary issue, since the treatment does not eliminate the entire parasite load, and it is a zoonosis. In Brasilia, Visceral Leishmaniasis is endemic, considering its epidemiological behavior and the confirmation of autochthony of human cases. In this study, small animal veterinarians were questioned about the treatment of Canine Visceral Leishmaniosis in Brasilia, DF, Brazil to evaluate the treatment practice of the CVL. Five out of nine do the treatment. All of the clinicians use alupurinol, four use miltefosin, three of them use marbofloxacin, two use pentavalents antimonial

<sup>1</sup> Médica Veterinária Residente da Clínica de Grandes Animais da FMVZ UNESP Botucatu.

<sup>2</sup> Professor Titular do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - FMVZ-UNESP-Botucatu.

and anfotericin B. However, two veterinary clinics do not treat and recommend euthanasia, two clinics didn't want to discuss their protocol.

**Keywords:** CVL, treatment, small animal clinics, Brasilia, Brazil.

## LA PRÁCTICA DEL TRATAMIENTO EN LA LEISHMANIOSIS VISCERAL CANINA (LVC) EN CLÍNICAS VETERINÁRIAS, CUIDADOS Y PROTOCOLOS

### RESUMEN

La leishmaniasis son un grupo de enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, animales domésticos (perros y gatos) y salvajes causadas por protozoos del género *Leishmania*. La transmisión se produce a través de la picadura del mosquito género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. La Leishmaniasis Visceral Canina (LVC), es la causa más agresiva, y más frecuente de la enfermedad clínica en perros, y gatos de vez en cuando. Sus depósitos varían según la región y pueden ser animales domésticos o salvajes. *Leishmania (leishmania) infantum* está presente en el sur de México hasta América del Sur. En el caso de la LVC, la recomendación del Consejo Federal de Medicina Veterinaria es la eutanasia y el tratamiento se consideraba ilegal hasta 2013, cuando se produjo la autorización del tratamiento por el Tribunal Regional 3ª Región Federal en todo el país, desde que no se utilizan fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis humana. Tratar o no, indicar o no la eutanasia es tema polémico para los veterinarios porque el tratamiento no elimina totalmente la carga parasitaria de los animales, y es una zoonosis. En Brasilia, la leishmaniasis visceral se considera endémica, teniendo en cuenta el comportamiento epidemiológico y la confirmación de los casos humanos autóctonos. En este estudio, se aplicó un cuestionario para evaluar la práctica del tratamiento de esta enfermedad en nueve clínicas veterinarias para pequeños animales en Brasilia. Cinco clínicas realizaron el tratamiento de LVC. Todas recomiendan alopurinol, cuatro miltefosina, tres marbofloxacina, dos anfotericina B y antimonio pentavalente. Dos clínicas se negaron a contestar el cuestionario, y dos no realizaron el tratamiento, recomendando la eutanasia.

**Palabras clave:** LVC, tratamiento, clínicas veterinarias para pequeños animales, Brasilia, Brasil.

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose na sua forma visceral é uma zoonose causada por protozoário. Além do ser humano, os cães e outros animais são acometidos. Nos últimos anos tem se observado um aumento do número de casos positivos da doença bem como uma maior preocupação das autoridades de saúde pública. Esta doença, pela sua gravidade, adquiriu maior importância, sendo considerada como de notificação compulsória e um importante problema em saúde pública. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é causada por protozoário do gênero *Leishmania* que em seu ciclo apresenta formas amastigotas, com flagelo interno e cinetoplasto visível, com forma de bastão e as formas promastigotas com flagelos longos que vivem no trato digestivo do inseto vetor (1).

Os reservatórios principais do agente são os roedores e os cães; humanos e gatos são provavelmente hospedeiros acidentais (2). O seu agente é *Leishmania chagasi* no novo mundo, e no velho mundo *Leishmania donovani*. *L. chagasi* é considerada sinônimo de *L. infantum* baseado em análises genéticas (3), sendo a forma mais encontrada no velho mundo.

A transmissão para o vertebrado ocorre pela picada de insetos dípteros pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, encontrados nas regiões tropicais, especialmente nas regiões quentes e úmidas do planeta. No Brasil, o principal gênero é *Lutzomyia*, com ampla distribuição, desde regiões do sul até o norte do país, sendo a espécie mais importante *L. longipalpis* (4). A transmissão pode ocorrer ainda por brigas, agulhas compartilhadas, por transfusões sanguíneas, acasalamentos e transmissão congênita (5,6), entretanto, a transmissão vetorial é a mais

Albuquerque ALH, Langoni H. A prática do tratamento na Leishmaniose visceral canina (LVC) em clínicas veterinárias, cuidados e protocolos. Vet. e Zootec. 2018 jun.; 25(1): 132-141.

importante, epidemiologicamente, a partir de formas prosmatigotas que se desenvolvem no flebotômico e são inoculadas no hospedeiro vertebrado quando o inseto se alimenta. Estas são fagocitadas pelos macrófagos e se disseminam pelo organismo do hospedeiro, na forma amastigota. Após um período de incubação de meses a anos, aparecem os sintomas (3).

As alterações mais frequentes em cães são esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, febre, rinite, dermatite, aumento dos ruídos pulmonares, icterícia, articulações doloridas e inchadas, uveíte e conjuntivite. As lesões cutâneas são caracterizadas por hiperqueratose, descamação e espessamento da pele. Ocorrem ainda perda de peso, poliúria, polidipsia, vômito, diarreia, epistaxis, petéquias, melena e, em ao redor de 30% dos casos, onicogribose (2,7). Algumas vezes cães infectados têm aparência normal, mas apresentam elevada carga parasitária na pele sadia e em órgãos (7), aspecto relevante para a saúde pública, na medida em que esses animais são fontes de infecção importantes na disseminação da LVC, devido ao repasto sanguíneo dos flebotômicos, vetores transmissores da doença.

Alguns testes sorológicos para diagnóstico estão disponíveis, mas os recomendados atualmente pelo Ministério da Saúde são o DPP, que é um teste imunocromatográfico que utiliza o antígeno recombinante rK39, produzido pelo Laboratório Biomanguinhos. É disponibilizado na forma de kit, de fácil utilização, com resultado em 10 a 15 minutos, podendo-se utilizar o sangue, soro ou plasma do animal suspeito. O DPP é recomendado para triagem e como confirmatório, recomenda-se o teste imunoenzimático de ELISA, também comercializado pela Biomanguinhos. Este também utiliza o antígeno rK39, fato que melhora a sensibilidade dos testes (8). Alguns laboratórios utilizam a reação de imununifluorescência indireta (RIFI), bem como outros capazes de detectar a presença de anticorpos ou o próprio agente (9).

No diagnóstico parasitológico, o parasito pode ser demonstrado em material obtido de punção de medula óssea, linfonodos e de baço, em imprints ou esfregaços corados com corantes básicos, tais como Giemsa, Wright e Panótico (9). É possível ainda o diagnóstico molecular a partir da Reação em Cadeia pela Polimerase-PCR, para a pesquisa do DNA do parasita, com elevada sensibilidade, utilizando-se primers gênero e espécie-específicos (10).

Os aspectos ambientais contribuem para a ocorrência da LVC e as condições socioeconômicas precárias, tais como moradia e o saneamento que favorecem a multiplicação e manutenção do vetor uma vez que eles encontram animais para o repasto sanguíneo. Devem ser considerados os aspectos nutricionais que podem reduzir a resistência imunológica dos humanos, sendo a baixa imunidade um fator importante para a manifestação da doença (11).

A sua ocorrência é muito ampla no país, com notificação de casos em mais de 1.600 municípios onde ocorre autoctonia, em praticamente todos os estados da federação. Ocorreu de fato a urbanização da LVC, que era considerada predominantemente como doença de ambientes rurais e periurbanos, entretanto, ocorre em grandes centros urbanos como Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Três Lagoas, Araçatuba, Bauru, entre outros (4).

A prevalência da LVC é elevada entre os cães do DF, sendo maior nos animais errantes (51%), e nos cães domiciliados (49%), em relação aos pertencentes a canis (24%) (12). Em Brasília, a leishmaniose visceral é considerada endêmica, considerando-se o comportamento epidemiológico descrito e a confirmação da autoctonia de casos humanos (13).

O tratamento da LVC é um tema bastante controverso, e a partir de 2008 passou a ser proibido no Brasil, por meio da Portaria Interministerial nº 1.426, e em 2009 o II Fórum de discussão sobre o assunto, realizado em Brasília, concluiu que o tratamento canino constitui em risco para a saúde pública, pois contribui para a disseminação da enfermidade, mantêm cães como reservatórios do parasito, há desenvolvimento de resistência de parasitos aos poucos medicamentos disponíveis para o tratamento da LV humana e dificulta a implementação de medidas de saúde pública (1).

As justificativas para a proibição da indicação de medicamentos utilizados para o tratamento de seres humanos com LV, para a terapia de cães infectados parte do princípio de que o tratamento da LVC traz riscos para a saúde pública, pela manutenção dos reservatórios da doença, uma vez que cães não curados parasitologicamente apresentam a remissão dos sinais clínicos, porém permanecem como fontes de infecção para o inseto transmissor, e conseqüentemente, perpetuam o

ciclo de transmissão da doença. Destaque-se, ainda, que o tratamento da LVC poderá levar à seleção de estirpes de parasitos resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento da LV humana (11).

Considerando que a prática de eutanásia de cães com diagnóstico de LVC não contribuiu para o controle da enfermidade, os profissionais médicos veterinários tentam buscar uma solução para os seus pacientes, atendendo na maioria das vezes uma cobrança dos proprietários dos animais que querem solucionar o problema, sem entretanto, eutanasiar seu animal de estimação. Dessa forma há clínicas que optam por tratamentos alternativos, com utilização de outros medicamentos que não são utilizados no tratamento realizado para a leishmaniose visceral humana.

O antimônio pentavalente foi o primeiro fármaco de escolha para tratamento, canino e humano, de leishmaniose visceral (3). A combinação de antimônio e alopurinol mostrou um resultado superior ao tratamento realizado com outro fármaco isolado (14). O tratamento de dois grupos de cães, um somente com o antimoníato de meglumina, e o outro com a associação do antimoníato de meglumina e alopurinol, revelou que, no primeiro grupo, todos os animais apresentaram recidivas em um período que variou de 4,5 a 21 meses, com 86% delas ocorrendo dentro dos primeiros 14 meses, enquanto no grupo tratado com a associação dos dois medicamentos nenhum dos cães apresentou recidivas da doença (15).

A utilização do antimoníato de meglumina, durante 30 dias, em associação com alopurinol, durante seis meses, em 15 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, apesar da evidencia de exame citológico de medula óssea negativo mostrou positividade em sete cães, por PCR (16). A anfotericina B, um antibiótico polienico primariamente utilizado como antifúngico, também apresenta atividade contra alguns protozoários (3). A anfotericina B não é superior ao Alopurinol, e é mais cara e mais tóxica (17). Animais submetidos à terapia com esse medicamento mostram sinais de nefrotoxicidade causada pela vasoconstrição e posterior diminuição do fluxo sanguíneo renal. Anfotericina B lipossomal ou emulsificada em lípides em doses variadas tem sido prescrita, com bons resultados clínicos, entretanto, pode também ocorrer recidiva (18,19).

De acordo com o estudo realizado por Nogueira (20), o efeito leishmanicida da terapia com anfotericina B associada ao alopurinol e prednisona foi comprovado pela ausência de parasitos no exame citopatológico de aspirado de linfonodo e por imunoistoquímica. A função das enzimas hepáticas ALT e AST não demonstrou alterações estatisticamente significativas durante o tratamento. O aumento significativo e progressivo das concentrações séricas de creatinina e uréia ocorreu após o início do tratamento, restabelecendo a normalidade posteriormente.

A formulação de antimônio lipossomal contendo fosfatidilserina demonstrou elevada eficácia in vivo, reduzindo 133 vezes a dose total de antimônio administrada, com diminuição de 100% da carga parasitária no fígado na dose de 0,75 mg/kg (21). Há resistência do protozoário a antimônios pentavalentes em áreas endêmicas como França, Espanha e Itália. Os dois principais medicamentos nessa classe são: estibogluconato de sódio, que requer injeção diária e apresenta vários efeitos adversos, e antimoníato de meglumina, que também tem menos efeitos colaterais (17).

A marbofloxacina foi eficaz in vitro e pode ser considerada para o tratamento de cães infectados se não houver outras opções disponíveis (22). Outros medicamentos estão sendo investigados para o tratamento da leishmaniose visceral canina, inclusive derivados de alquilfosfolcolina relacionado à miltefosina, que é utilizada em alguns tratamentos humanos para a leishmaniose visceral e metronidazol (3). A paramomicina tem mostrado ter menos efeitos colaterais do que outras substâncias em humanos. O seu uso tem sido primariamente indicado nas formas cutâneas de leishmaniose humana (17).

A imunomodulação adquirida em cães mediante a administração de 1mg por kg de peso vivo, a cada 12 horas durante um mês de domperidona oral em casos iniciais de LVC é efetiva para conter a evolução de enfermidade. A administração deste fármaco na mesma dose em cães com enfermidade avançada consegue melhorar os sintomas e em muitos casos mudar a resposta imune de Th2 a Th1 (23).

O ciprofloxacino a 0,2% se mostrou efetivo quando aplicado como solução salina hipertônica na leishmaniose no tratamento intralesional de casos de leishmaniose (24). A utilização de

glicocorticóides no tratamento da LVC visa deprimir a imunidade humoral e, conseqüentemente, reduzir os efeitos causados pelo depósito de imunocomplexos nos órgãos e tecidos, particularmente em animais com insuficiência renal (14,25). Há estudos com a utilização de peptídeos antimicrobianos como agentes anti-protozoários. Com destaque para os Bombinins, Temporins, Phylloseptins e Decoralins (26).

Ainda, na busca de novos compostos com atividade leishmanicida, destacam-se os alcalóides, os acetogeninas, flavonóides e componentes de óleos essenciais. Foram utilizados alcalóides e acetogeninas extraídos da semente da *Annona muricata* (graviola); rutina e quercetina isolados das sementes *Dimorphandra gardneriana* (faveira), o eugenol, timol e seus derivados sintéticos, além da cumarina isolada do caule e cerne de *Platymiscium floribundum* (sacambu). A cumarina escoparona, e os flavonóides rutina e quercetina inibiram a enzima AChE, indicando um possível mecanismo de ação para a atividade leishmanicida (27).

Verificou-se, também, efetiva atividade anti-*Leishmania* da secreção cutânea do caramujo gigante Africano, *Achatina fulica*, bem como a sua citotoxicidade em células de mamíferos e seu possível mecanismo de ação contra as formas promastigotas. A secreção bruta apresentou concentração efetiva 50% de 98,37 µg/mL contra promastigotas de *L.(L.) chagasi*. Por meio de ensaios enzimáticos, foi detectada a atividade L-aminoácido oxidase (L-AAO) na secreção bruta, e também foi demonstrado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado por esta enzima é um dos compostos responsáveis pelo efeito anti-leishmania (28).

A redução do parasitismo cutâneo, a eliminação das manifestações clínicas, e principalmente, a recuperação da resposta imune celular controladora da infecção poderiam levar a uma redução da capacidade infectante dos flebotomíneos e, conseqüentemente, a uma redução da prevalência nas espécies canina e humana, principalmente em áreas endêmicas (29), entretanto, apesar de inúmeras pesquisas, até o momento não há medicamentos profiláticos ou vacinas efetivas contra a leishmaniose. Medidas para proteger os cães incluem manter os animais dentro do domicílio, no período de maior atividade do vetor, o uso de repelentes e inseticidas. Coleiras impregnadas com repelentes também são efetivas para evitar que cães sejam picados por vetores (30,31).

Considerando-se a importância do controle da LVC, e os aspectos controversos com relação ao tratamento da enfermidade, o presente trabalho procurou conhecer a realidade da adoção de seu tratamento em cães com LVC em clínicas localizadas em Brasília, DF.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Aplicou-se questionário com dez perguntas para obtenção de informações, enviado por e-mail para cada veterinário responsável por sua clínica na cidade de Brasília (Asa Sul, Asa Norte, Lago Sul e Lago Norte), contendo perguntas sobre o número de casos atendidos na clínicas, provas diagnósticas realizadas, em caso de opção de tratamento, qual foi preconizado, medidas preventivas, utilização de imunoprofilaxia, critérios de escolha dos proprietários de acordo com nível sócio-econômico, grau de comprometimento (responsabilidade), e com relação ao acompanhamento dos animais durante o tratamento, incluindo consultas e exames realizados (Anexo 1).

Há aproximadamente 40 clínicas veterinárias de pequenos animais, de diversas especialidades, em Brasília. Somente nove clínicas responderam ao e-mail. Duas delas declararam que não iriam responder, duas não realizam o tratamento e cinco clínicas atenderam o pedido. Havia um link disponível em <<https://pt.surveymonkey.com/s/BX6NZBN>>, criado pelo site Survey Monkey, que foi enviado para o e-mail de cada veterinário, de maneira que as respostas eram anônimas, sem possibilidade de identificação do participante da pesquisa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A casuística atendida nas sete clínicas (cinco realizam tratamento e duas não realizam) é de, 350 animais com diagnóstico positivo de LVC em 2015. Sendo que a maioria, 187 (53, 42%), não recebeu tratamento e foram submetidos a eutanásia de acordo com a Portaria Interministerial n°

1.426 (1). Já os outros 163 (46, 57%) animais que receberam tratamento, 109 (66,9 %) apresentaram resposta favorável e 54 (33,13%) não responderam e foram submetidos a eutanásia.

Todas as clínicas utilizam o teste imunoenzimático ELISA como método diagnóstico, sendo este o teste sorológico confirmatório recomendado pela Vigilância das Doenças Transmissíveis do Ministério da Saúde (32). São utilizados ainda, a RIFI e a punção aspirativa de linfonodos ou de medula óssea. A PCR é utilizada por cinco clínicas. Três clínicas utilizam citologia e exame histopatológico e, outras duas, a impressão por aposição ou biópsia de lesões cutâneas ou gânglios linfáticos. Verifica-se que apesar do número de clínicas em que, voluntariamente, os veterinários responderam o questionário, mostrando interesse em participar da pesquisa, há conhecimento adequado e prática de diagnóstico laboratorial para confirmação da LVC, pois em 100% dos casos foi utilizado o teste de ELISA rK 39 que é recomendado como confirmatório (8), além de conhecer outras ferramentas diagnósticas

Algumas clínicas foram relutantes para discutir abertamente o tratamento da LVC, ou então, preferem não realizar o tratamento. Porém, nas cinco clínicas participantes, foram utilizados para o tratamento específico, além de tratamento suporte: miltefosina, marbofloxacina, alopurinol, anfotericina B, antimoniais pentavalentes (antimoniato de n-metil-glucamina ou estibogluconato de sódio), ciprofloxacino, cimetidina, doxiciclina, omeprazol, ranitidina, amitriptilina e domperidona.

O alopurinol foi utilizado em todas as clínicas, miltefosina em quatro, anfotericina B e antimoniais pentavalentes em duas; ciprofloxacino, amitriptilina, doxiciclina e domperidona somente em uma clínica. Verifica-se que os protocolos de tratamento são variados e por vezes sem base científica. Em desacato a orientação atual, quatro clínicas utilizam anfotericina B e antimoniais pentavalentes, medicamentos que são recomendados para o tratamento da leishmaniose humana (1, 11).

Todas as clínicas preconizam vacinação de animais como medida preventiva. Cinco delas recomendam Leish-tec® e duas Leishmune®. Da mesma forma todas preconizam a utilização de coleira repelente de deltametrina, seis a pulverização com inseticidas e duas recomendam a telagem de janelas. Há uma preocupação com relação à profilaxia da LVC e acredita-se que estas são condutas corretas e adequadas, que devem sempre estar associadas para que os resultados sejam favoráveis. Outra proposta relevante é a prática da guarda responsável e do bem estar animal, o que contribui também para melhor resposta do animal.

Enfatiza-se que apesar da proibição de medicamentos de uso humano no tratamento da leishmaniose como o glucantime e a anfotericina B, algumas clínicas têm preconizado o uso destes, contrariando a portaria interministerial. Essa conduta deve ser evitada pois além de, sabidamente, não promoverem a cura com eliminação total do agente, e tão somente diminuição de carga parasitária, pode haver a seleção de resistência do agente (11), fato que pode complicar a resposta no tratamento humano, no futuro.

Para realizar o tratamento, as cinco clínicas fazem a seleção prévia de acordo com responsabilidade e comprometimento do proprietário. Quatro clínicas selecionam os casos para tratamento de acordo com o nível socioeconômico do proprietário. O grau de comprometimento dos responsáveis pelos animais é de extrema importância pois muitos cuidados devem ser observados, além do simples oferecimento de medicação diária. Por outro lado, é necessário estabelecer critérios com relação aos animais a serem tratados, por exemplo seu estado geral, grau e gravidade das lesões cutâneas, se há comprometimento renal a partir de exames como uréia e creatinina, entre outros parâmetros. O médico veterinário deve estar consciente sobre todos esses aspectos ao optar pelo tratamento dos animais.

As cinco clínicas que realizam tratamento fazem acompanhamento dos animais, periodicamente, variáveis entre elas, a cada vinte e um dias, uma vez ao mês e de três em três meses, até a negatização dos exames. A seguir o paciente é reavaliado a cada seis meses. São realizados exames de função renal, hepática e hemograma completo em todas as clínicas. A pesquisa parasitológica é realizada somente em três clínicas, para controle dos animais em tratamento.

## CONCLUSÃO

Albuquerque ALH, Langoni H. A prática do tratamento na Leishmaniose visceral canina (LVC) em clínicas veterinárias, cuidados e protocolos. Vet. e Zootec. 2018 jun.; 25(1): 132-141.

Havendo condições clínicas suficientes, comprometimento do proprietário e conhecimento sobre a enfermidade, bem como de acordo com o estado geral do animal, ele pode ser submetido a tratamento experimental. No presente estudo a taxa de sucesso quanto a melhora clínica, e recuperação do estado geral do animal, foi de 66,9%.

Antimoniais pentavalentes e a anfotericina B, medicamentos de uso comum ao tratamento humano, são utilizadas em clínicas de Brasília, apesar da proibição. Ainda existem clínicas realizando tratamentos de forma inadequada, porém a maioria utiliza protocolo de tratamento com outros medicamentos, como o alopurinol.

Os proprietários são selecionados de acordo com comprometimento e responsabilidade, condição socioeconômica e presença nas consultas periódicas, o que possibilita a realização de tratamento de maneira contínua e consciente.

A maioria das clínicas de pequenos animais de Brasília, que responderam ao questionário opta pelo tratamento, sendo o medicamento mais utilizado o alopurinol, entretanto, são utilizados antimoniais pentavalentes, anfotericina B, domperidona, ciprofloxacina, marbofloxacina e miltefosina. Por outro lado, há clínicas que optam pela eutanásia e algumas não querem discutir a possibilidade de tratamento da LVC.

## ANEXO 1 : Questionário para obtenção de informações

### 1. Casuística:

Quantos animais infectados foram atendidos?

Quantos foram tratados?

Quantos foram tratados (sem resposta) e eutanasiados?

Quantos foram eutanasiados, sem tratamento?

### 2. Qual(is) os métodos diagnósticos laboratoriais utilizados?

Citologia por escarificação de lesão, citologia por punção aspirativa,

impressão por aposição ou biópsia de lesões cutâneas ou órgãos linfáticos,

citologia, histopatológico, isolamento do Parasita em meios específicos ou Hamsters, PCR, RIFI ou ELISA

### 3. Caso seja realizado tratamento, qual o tratamento de escolha?

Alopurinol, anfotericina B, antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil-glucamina ou estibogluconato de Sódio), marbofloxacina, aminosidina, miltefosina e tratamento suporte de acordo com a necessidade de cada animal (fluidoterapia, vitaminas) ou outro (especifique)

### 4. São recomendadas como ações preventivas? Quais?

Utilização de coleira de repelente, inseticidas, telagem de janelas e vacinação de animais contactantes

### 5. Caso seja realizada vacinação dos animais, qual a de escolha?

Leishmune®, Leish-tec® ou outra (especifique)

### 6. Em relação ao proprietário, há seleção dos mesmos de acordo com seu nível socioeconômico para realizar tratamento?

SIM NÃO

### 7. Há seleção dos proprietários de acordo com sua responsabilidade e presença nas consultas?

SIM NÃO

**8. Em relação aos animais infectados, são realizadas consultas periódicas dos animais em tratamento?**

SIM NÃO

9. Se sim, com que frequência?

**10. Se sim, são realizados exames laboratoriais de acompanhamento?** Sim, função renal  Sim, função hepática  Sim, hemograma completo,  Sim, pesquisa parasitológica  Não**REFERÊNCIAS**

1. Ferreira EC, De Melo LA, Gontijo CMF. Leishmanioses do novo mundo. Cad Tec Vet Zootec. 2012;65:9-27.
2. Lappin MR. Leishmaniose. In: Nelson RW, Couto CG. Medicina interna de pequenos animais. 4a ed. St. Louis: Elsevier; 2010. p.1364-5.
3. Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 4a ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2011.
4. Pirajá GV, Lucheis SB. A vigilância epidemiológica de flebotomíneos no planejamento de ações de controle nas leishmanioses. Vet Zootec. 2014;21:503-15.
5. Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. Emerg Infect Dis. 2006;12:440-6.
6. Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. Vet Parasitol. 2006;137:159-67.
7. Camargo JB, Troncarelli MZ, Ribeiro MG, Langoni H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. Clin Vet. 2007;71:86-92.
8. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 6a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
9. Camargo JB, Langoni H, Troncarelli MZ, Machado JG, Lucheis SB, Padovani CR. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymphonode aspirates of canine visceral leishmaniosis diagnosis. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2010;16:414-20.
10. Langoni H, Lucheis SB, Silva RC, Castro APB, Pas AC. American visceral leishmaniasis: a case report. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2005;11:360-71.
11. Donato LE, Lima Júnior FEF, Albuquerque R, Gomes MLS. Vigilância e controle de reservatórios da leishmaniose visceral no Brasil: aspectos técnicos e jurídicos. Rev Educ Contin Med Vet Zootec CRMV-SP. 2013;11:18-23.
12. Volkweis F, Cavalcanti L, Biazio G, Molinari F. Prevalência de *Leishmania* spp. em cães no Distrito Federal, utilizando a técnica de PCR. In: Anais do Congresso Medvet de Especialidades Veterinárias; 2013; Bento Gonçalves. Bento Gonçalves: Medvet; 2013.
13. Tamayo C, Carvalho M, Bofil M, Rodrigues R, Silva A, Cortez S, et al. Leishmaniose visceral autóctone em Brasília, Distrito Federal, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(4):396-9.

14. Denerolle P. Leishmaniose canine : difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). *Prat Med Chir Anim Comp.* 1996;31(2):137-5.
15. Ginel PJ, Lucena R, López R, Molleda JM. Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. *J Small Anim Pract.* 1998;39 (6):271-4.
16. Moura S, Fernandes C, Pandulho V, Rodrigues, Silva R. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, estado do Mato Grosso, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1999;36(2):123-6.
17. Petersen CA, Barr SC. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2009;39(6):1065-74.
18. Monteiro JM, Seguro AC, Rocha AS. Nefrotoxicidade aguda da anfotericina b no cão. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1992;48(2):54-9.
19. Tavares W. Poliênicos e outros antibióticos antifúngicos. In: Tavares W. *Manual de antibióticos.* 3a ed. São Paulo: Atheneu; 2002. p.747-64.
20. Nogueira FS. Avaliação clínico-laboratorial de cães naturalmente infectados por Leishmaniose visceral, submetidos à terapia com anfotericina B [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2007.
21. Tempone AG, Andrade Jr HF. Nanoformulações de antimônio pentavalente encapsuladas em lipossomos contendo fosfatidilserina demonstram maior eficácia contra Leishmaniose Visceral experimental. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2008;67(2):131-6.
22. Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pino P, Mazier D, Woehrlé F. Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol.* 2006;135(2):137-46.
23. Gómez Ochoa P. Estudio de un nuevo tratamiento de la leishmaniosis canina. Valoración del efecto inmunomodulador de la domperidona [tese]. Zaragoza: Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza; 2004.
24. Ai H, Awad A, Moker HM. Evaluation of intralesional 0,2% ciprofloxacin as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J.* 2010;16(1):89-93.
25. Noli C. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus.* 1999;9(2):16-24.
26. Guerra MER. Prospecção de novos peptídeos com ação leishmanicida por dinâmica molecular [dissertação]. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista; 2014.
27. Vila-Nova N, Morais S, Falcão M, Bevilaqua C, Rondon F, Wilson M, et al. Atividade inibitória leishmanicida e colinesterásica de compostos fenólicos de *Dimorphandra gardneriana* e *Platymiscium fliribunbum*, plantas nativas do bioma Caatinga. *Pesqui Vet Bras.* 2012;32(11):1164-8.
28. Tempone AG. Secreção cutânea do caramujo gigante africano, *Achatina fulica*, como fonte de compostos anti-Leishmania. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2007;66(1):73-7.
29. Gradoni L, Gramiccia M, Mancianti F, Pieri S. Studies on leishmaniasis control: effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the island of Elba, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998;82(3):568-71.

30. Foglia Manzillo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of Leishmania infection in kennelled stray dogs. Vet Parasitol 2006;142(1-2):142-5.
31. Langoni H. Leishmaniasis. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças infecciosas em animais de produção e companhia. 1a ed. Rio de Janeiro: Roca; 2016. p.1013-24.
32. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

**Recebido em: 20/04/2017**

**Aceito em: 21/02/2018**

## DIVERSIDADE E BIOMASSA FITOPLANCTÔNICA EM VIVEIRO DE CARCINICULTURA MARINHA NO ESTADO DO PARÁ

Rayette Souza da Silva<sup>1</sup>  
Alex da Silva Lobão de Souza<sup>2</sup>  
Glauber David Almeida Palheta<sup>3</sup>  
Maria Sintia Monteiro da Costa<sup>4</sup>  
Nuno Filipe Alves Correia de Melo<sup>5</sup>

### RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar durante um ciclo de cultivo de *Litopenaeus vannamei* a comunidade fitoplanctônica e parâmetros abióticos em duas estações dentro de um viveiro em Curuçá (PA), norte do Brasil. Foram medidos transparência, pH, oxigênio dissolvido, salinidade e temperatura. Considerando os últimos quatro parâmetros, foram registrados na água de superfície e próximo ao fundo. Além disso, também foram coletadas amostras para estudar o fitoplâncton e concentrações de clorofila "a". A temperatura variou de 31,5 a 35 °C; oxigênio dissolvido de 4,2 a 15,5 mg/L; pH entre 8,1 e 9,4; salinidade de 26,9 a 30 ppm. A transparência diminuiu de 55 para 17 cm. Clorofila *a* variou de 2,33 a 471,34 mg/m<sup>3</sup>. Em relação à análise do fitoplâncton, foram identificados 95 taxa e Bacillariophyta foi o grupo mais representativo, com dominância do *Navicula* sp, *Pleurosigma* sp e *Nitzschia* sp. A maior densidade registrada foi de 104.400 e a menor foi 3.600 org/L. A diversidade média na Estação 01 foi 1,49 bits/ind e na Estação 02, 1,43 bits/ind. Concluiu-se que: a divisão Bacillariophyta foi o grupo mais importante (riqueza e densidade); a classe dinophyceae revelou estar melhor adaptada em águas mais claras; Os valores de Clorofila "a" apresentaram uma relação direta com a alimentação artificial, aumentando com o tempo; Apesar da grande flutuação dos parâmetros abióticos como pH , oxigênio dissolvido e transparência , o sistema de cultivo foi considerado homogêneo.

**Palavras-Chave:** Carcinicultura, *Litopenaeus vannamei*, Microalgas.

## DIVERSITY AND BIOMASS PHYTOPLANKTON IN MARINE SHRIMP FARMING IN PARA STATE

### ABSTRACT

This work aimed to evaluate the the phytoplanktonic community and the abiotic parameters during a cycle of cultivation of *Litopenaeus vannamei* in two stations in a pond in Curuçá (PA), northern Brazil. Were measured transparency, pH, dissolved oxygen, salinity and temperature. Considering the last four parameters, were registered in the surface water and the bottom set. Additionally, also were collected samples to study the fitoplankton and chlorophyll "a" concentrations. The temperature values were between 31,5 and 35 °C; dissolved oxygen concentrations were between 4,2 and 15,5 mg/L; pH between 8,1 and 9,4; salinity from 26,9 to 30 ppm. The transparency decreased from 55 to 17 cm. The Chlorophyll *a* concentrations were from 2,33 to 471,34 mg/m<sup>3</sup>. The transparency decreased of 55 to 17 cm. Chlorophyll *a* from 2,33 to 471,34 mg/m<sup>3</sup>. Regarding

<sup>1</sup> Professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará - IFPA. Correspondência.

<sup>2</sup> Professor do Curso Técnico de Pesca e Aquicultura do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA) Campus Abaetetuba.

<sup>3</sup> Professor Adjunto I da Universidade Federal Rural da Amazônia e pesquisador no Instituto Sócio Ambiental dos Recursos Hídricos (ISARH/UFRA)

<sup>4</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará - IFPA

<sup>5</sup> Professor Associado I da Universidade Federal Rural da Amazônia.

the fitoplankton analyses, were identified 95 taxa and Bacillariophyta was the most representative group, with dominance of the *Navicula* sp, *Pleurosigma* sp and *Nitzschia* sp. The largest density registered was of 104.400 and to smallest was 3.600 org/L. The mean diversity at the station 01 was 1,49 bits/ind and in the station 02 was 1,43 bits/ind. Enter the main conclusions: the fitoplanktonic community was dominated by the diatom and the division Bacillariophyta was the most important group (wealth and density); the class dinophyceae revealed to be better adapted in the clearer waters; Chlorophyll "a" values presented a direct relationship to the feeding artificial, increasing with the time. Despite the great fluctuation of abiotic parameters such pH, dissolved oxygen and transparency, the cultivation system was considered homogeneous.

**Key-words:** Shrimp Farming, *Litopenaeus vannamei*, Microalgae.

## DIVERSIDAD Y BIOMASA DE FITOPLANCTON EN EL CULTIVO DE CAMARÓN MARINO DEL ESTADO DE PARÁ

### RESUMEN

Este estudio evaluó durante un ciclo de cultivo de *Litopenaeus vannamei* la comunidad de fitoplancton y los parámetros abióticos en dos estaciones dentro de un cuarto de niños en Curuçá (PA), el norte de Brasil. Se midieron la transparencia, pH, oxígeno disuelto, la salinidad y la temperatura. Teniendo en cuenta los últimos cuatro parámetros se registraron en la superficie del agua y cerca del fondo. Además, también se recogieron muestras para estudiar la concentración fitopláncton y clorofila "a". La temperatura varió desde 31,5 hasta 35 ° C; Oxígeno disuelto 4,2-15,5 mg / L; pH entre 8,1 y 9,4; la salinidad de 26.9 a 30 ppm. Transparencia redujo de 55 a 17 cm. La clorofila varió desde 2,33 hasta 471,34 mg / m<sup>3</sup>. En cuanto al análisis de fitoplancton se identificaron 95 taxa Bacillariofitas y fue el grupo más representativo, con predominio de *Navicula* sp sp *Pleurosigma* y *Nitzschia* sp. La densidad más alta registrada fue de 104.400 y el más bajo fue de 3.600 org / L. La diversidad promedio en la estación 01 era de 1,49 bits / ind y de la estación 02, 1,43 bits / ind. Se concluyó que: la división Bacillariophyta era el grupo más importante (riqueza y densidad); Dinophyceae la clase resultó ser el más adecuado en las aguas más claras; Los valores de clorofila "a" tenían una relación directa con la alimentación artificial, aumentando con el tiempo; A pesar de las grandes fluctuaciones de parámetros abióticos tales como el pH, el oxígeno disuelto y la transparencia, sistema de cultivo se consideró homogénea.

**Palabras chave:** Cultivo de camarón, *Litopenaues vannamei*, Microalgas.

### INTRODUÇÃO

A carcinicultura vem se destacando e para continuar crescendo e de forma sustentável é necessário realizar uma avaliação ambiental da área. Em viveiros, as condições da água estão sempre mudando, sendo fundamental observar o comportamento das principais variáveis físicas, químicas e biológicas que possam ser manipuladas. Com isso, é possível conferir aos animais, o maior conforto possível, refletindo positivamente na produtividade do sistema (1).

Nos viveiros de engorda de camarão marinho, o fitoplâncton desempenha um papel ecológico de grande importância como produtor primário, governando os principais processos físicos e químicos deste ecossistema. Dentre os vários processos e aportes no qual o fitoplâncton está envolvido destacam-se: (a) a produção de oxigênio dissolvido através da reação de fotossíntese (1); (b) a assimilação de nutrientes, incluindo a amônia e outros metabólitos tóxicos para o camarão, que são seqüestrados da água e convertidos em compostos orgânicos, melhorando os parâmetros de qualidade da água (2), e; (c) o aporte de nutrientes essenciais que funcionam como fonte alimentar indireta para os camarões cultivados (3).

Apesar de estudos que abordem o fitoplâncton e/ou variáveis abióticas em viveiros de carcinicultura marinha estarem sendo desenvolvidos no Brasil (4-10) existe uma escassez de dados

no estado do Pará, visto que os trabalhos desenvolvidos em águas estuarinas foram restritos à ambientes naturais (11-17) e não em ambientes de cultivo. Entretanto, sabe-se que conhecer a comunidade fitoplanctônica é imprescindível para o desenvolvimento da carcinicultura, já que é necessária sua caracterização e controle populacional, visando obter estabilidade e um bom desenvolvimento no manejo do sistema, e ao maximizar o uso do alimento natural presente nos viveiros, diminuir os custos com ração.

Desta forma, objetiva-se avaliar os parâmetros abióticos e caracterizar a comunidade fitoplanctônica em termos de riqueza, abundância, frequência de ocorrência e biomassa durante um ciclo de cultivo (97 dias) de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) no município de Curuçá – Pará.

## MATERIAL E MÉTODOS

O empreendimento estudado está instalado no município de Curuçá (00° 37' 30"S e 47° 52' 30"O) que pertence à Mesorregião do Nordeste Paraense e à Microrregião do salgado – Estado do Pará. O município tem precipitações abundantes que ultrapassam os 2.000 mm anuais, sendo os meses mais chuvosos de janeiro a junho e menos chuvosos de julho a dezembro. Apresenta clima equatorial Amazônico tipo Am da classificação de Köppen caracterizado pelas temperaturas elevadas e pequena amplitude térmica, com média de 27° C (18).

Antes de iniciar o cultivo, o viveiro recebeu 2.000 kg de calcário e quatro carotes de 6 kg de cloro para desinfecção. O sistema de cultivo adotado foi semi-intensivo, com troca zero de água, havendo apenas complementação quando necessário. Não foi utilizado nenhum sistema de aeração artificial e também não foram realizados procedimentos de fertilização e calagens de manutenção durante o cultivo. A quantidade estocada foi de 953.000 Pós-Larvas com 20 dias de vida (PL20), correspondendo a uma densidade de 21,8 camarões/m<sup>2</sup>.

Até o 25° dia de cultivo, foi utilizada uma ração comercial farelada com 45% de proteína, sendo administrada à lanço e somente uma vez ao dia. A partir daí até o final do cultivo, uma ração extrusada com 35% de proteína bruta passou a ser utilizada, sendo administrada à lanço e na bandeja de alimentação tanto pela manhã quanto pela tarde. A fazenda adotou um sistema de despesca parcelada, sendo realizada ao todo, quatro: 02/12; 10/12; 16/12; e no dia 22 de dezembro de 2008 foi realizada a última despesca, finalizando o ciclo de cultivo, que teve 97 dias.

O viveiro amostrado é o que possui maior área, 3,5 ha e cerca de 1,5 metro de profundidade média. Para sua amostragem, foram determinadas duas estações de coleta - E1 - próximo à saída de água (S 00°41'56,6" W 47°50'15,0") e E2 – no meio do viveiro (S 00°41'57,9" W 47°50'16,9") (Figura 1). A amostragem teve periodicidade quinzenal durante um ciclo de cultivo, de 20/09/08 a 05/12/08.

Foram coletadas amostras de água com o auxílio de uma garrafa de Van Dorn na superfície e próximo ao fundo para realizar medição *in situ* de: Oxigênio Dissolvido – OD (através de um oxímetro Instrutherm modelo MO-890); Temperatura (leitura de um termistor acoplado à sonda do oxímetro); pH (através de leitura em um peagômetro Instrutherm modelo 1800); Salinidade (uso de refratômetro Instrutherm modelo RTS-101ATC). A transparência da água foi medida entre 10 e 14 h (19) através do desaparecimento visual do Disco de Secchi com 30 cm de diâmetro.

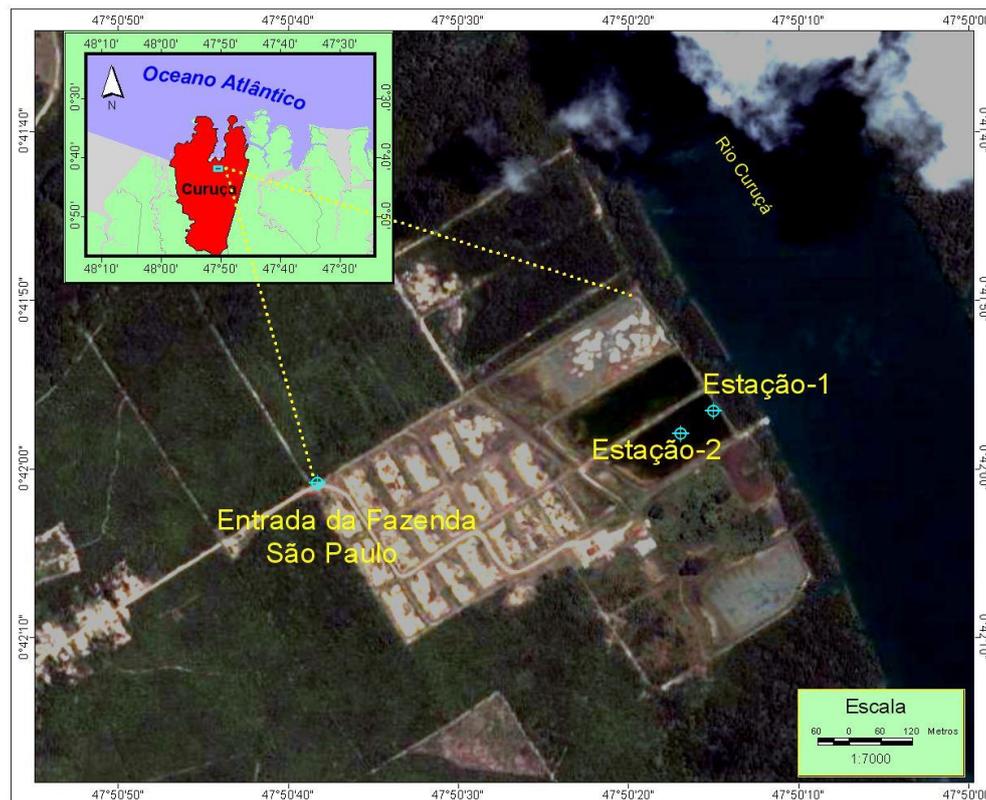


Figura 1. Mapa de localização da fazenda São Paulo, Município de Curuçá - PA, mostrando as duas estações de coleta no viveiro amostrado (Fonte: Insumo de Satélite TerraMetrics - Imagem Google Earth – julho de 2008).

As amostras para a determinação da biomassa fitoplanctônica (clorofila-a) foram obtidas através de coleta direta na subsuperfície da água e fixadas em gelo, com tratamento das amostras segundo recomendação da Unesco (20) e leitura através do espectrofotômetro marca Biospectro SP-22, seguindo o método de Parsons e Strickland (21).

A amostragem qualitativa do fitoplâncton ocorreu com arrasto horizontalmente à subsuperfície com rede cilindro-cônica de 64  $\mu\text{m}$  e o material filtrado foi acondicionado em frascos de polietileno (devidamente etiquetados) e fixado com formol neutralizado com tetraborato de sódio até uma concentração final de 4%. Para determinação da densidade foram coletados 100 mL de amostra, acondicionadas e fixadas da mesma forma.

Para determinação da composição fitoplanctônica foram analisadas no mínimo, cinco lâminas não permanentes sob objetiva de 40 X e 100 X, esta com óleo de imersão, A sinopse taxonômica foi baseada, principalmente, na classificação apresentada por Round et al. (22) para as diatomáceas, Steindinger e Tangen (23) para os dinoflagelados, Desikachary (24) para as cianofíceas e Bicudo e Menezes (25) para as clorofíceas e euglenofíceas. A riqueza (R) total do fitoplâncton foi considerada como o número total de táxons encontrados em cada unidade amostral.

A determinação da densidade fitoplanctônica foi feita de acordo com o método de sedimentação de Utermöhl (26). Organismos unicelulares, filamentos e colônias foram considerados como indivíduos e a contagem cobriu toda a área da câmara com os resultados expressos em organismos por litro (org/L).

A abundância relativa foi obtida com a contagem dos 100 primeiros organismos presentes em uma alíquota retirada da amostra qualitativa, sendo expressa em percentagem (%) e para sua interpretação foi utilizada a escala segundo Lobo e Leighton (27). O critério adotado para calcular a frequência de ocorrência foi o mesmo utilizado por Mateucci e Colma (28).

Os índices de diversidade específica foram determinados utilizando-se a matriz de dados da densidade de cada táxon. Os índices foram calculados na mesma base logarítmica (base 2) para que

pudessem ser comparados, sendo a diversidade determinada segundo Shannon e Weaver (29) e a equitabilidade segundo Pielou (30). Após determinação da diversidade, os valores obtidos foram enquadrados na classificação de Valentin et al. (31)

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para verificar se existe diferença significativa entre os parâmetros abióticos (pH, OD, Salinidade e Temperatura) coletados na superfície e próximo ao fundo e para mostrar se parâmetros abióticos (pH, OD, Salinidade, Temperatura, Transparência) diferiram entre estações de amostragem (E1 e E2). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi executado para verificar se os parâmetros abióticos diferiram significativamente ao longo do cultivo. Foi feita uma associação entre as variáveis abióticas e entre as variáveis abióticas e os grupos do microfitoplâncton, considerando que esta comunidade responde muito rapidamente às alterações físicas e químicas do meio aquático. Uma associação entre as variáveis abióticas e a clorofila "a" também foi realizada. Estas associações foram feitas por meio de correlação linear simples com coeficiente de Pearson (r) considerando o  $p \leq 0,05$  para que as correlações fossem consideradas significativas. As análises descritas foram realizadas através do programa BioStat 5.0.

## RESULTADOS

O pH teve mínima de 8,1 e máxima de 9,4 na Estação 02, com discreta variação ao longo do cultivo. O oxigênio dissolvido teve um comportamento bastante irregular ao longo do cultivo, sendo o menor valor registrado 4,2 mg/L na Estação 01 e o maior, 15,5 mg/L na Estação 02. Nas estações de coleta, a salinidade se manteve estável (30 ppm) até a 3ª data de coleta, sofrendo um declínio e em seguida, voltando a subir. A menor temperatura registrada na Estação 01 foi de 31,5 °C no primeiro dia de coleta e a maior, 35,0 °C na Estação 02 (última coleta). A transparência apresentou máxima de 55 cm na primeira coleta, diminuindo para 17 cm no fim do ciclo de cultivo. A Tabela 1 apresenta as médias das variáveis físico-químicas estudadas.

Tabela 1. Médias obtidas entre superfície e fundo das variáveis físico-químicas mensuradas em viveiro de criação de *L. vannamei* durante um ciclo de cultivo

Coleta/ Estação	pH		OD (mg/L)		TE (°C)		S (ppm)		TR (cm)	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
20/set	8,1	8,1	9,6	8,5	31,7	33,0	30,0	30,0	55	45
07/out	8,1	8,3	4,2	4,9	31,7	32,3	30,0	30,0	33	37
22/out	9,2	9,4	13,5	15,6	32,6	32,7	30,0	30,0	17	20
05/nov	9,1	9,1	14,7	13,6	33,5	33,5	26,5	27,0	18	20
20/nov	8,3	8,1	5,2	5,3	31,5	33,5	27,5	27,5	25	25
05/dez	9,0	8,9	9,8	9,6	33,0	35,0	30,0	28,5	20	20

OD – Oxigênio Dissolvido; TE – Temperatura; TR – Transparência

Durante o estudo, a precipitação mínima foi de 0,0 mm em novembro e a máxima de 122,8 mm em dezembro (Quadro 1), ressaltando que o período amostrado trata-se da estação seca no município.

Quadro I. Precipitação Pluviométrica (mm) no município de Curuçá no ano de 2008.

PP (mm) / Meses	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
	471,7	279,1	820,7	490,3	311,7	0,0	0,0	26,9	17,1	17,5	0,0	122,8

PP – Precipitação Pluviométrica. Fonte: Agência Nacional das Águas, 2009

A comunidade fitoplanctônica esteve representada por 95 táxons infraespecíficos e específicos, distribuídos entre as Divisões: Bacillariophyta (69 táxons), Chlorophyta com 14 táxons,

Pyrrophycophyta (5 táxons), Cyanophyta (6 táxons) e Euglenophyta (1 táxon), como observado na Figura 2.

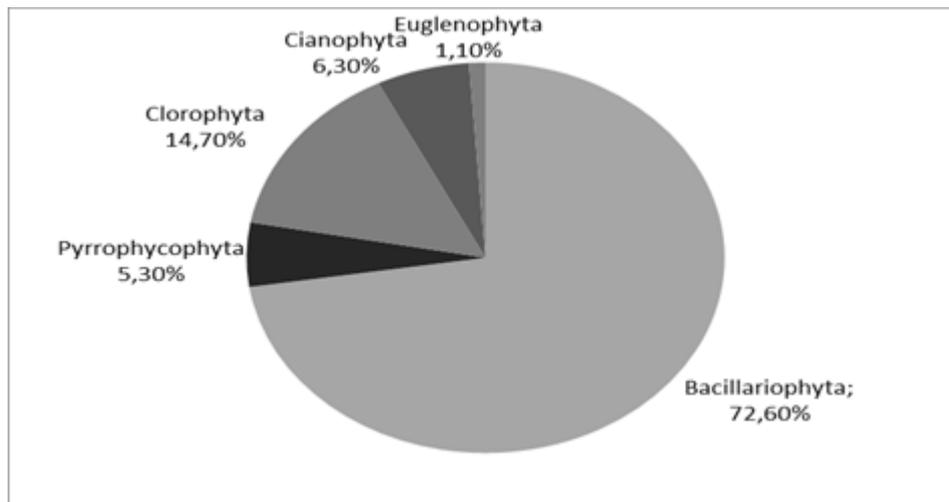
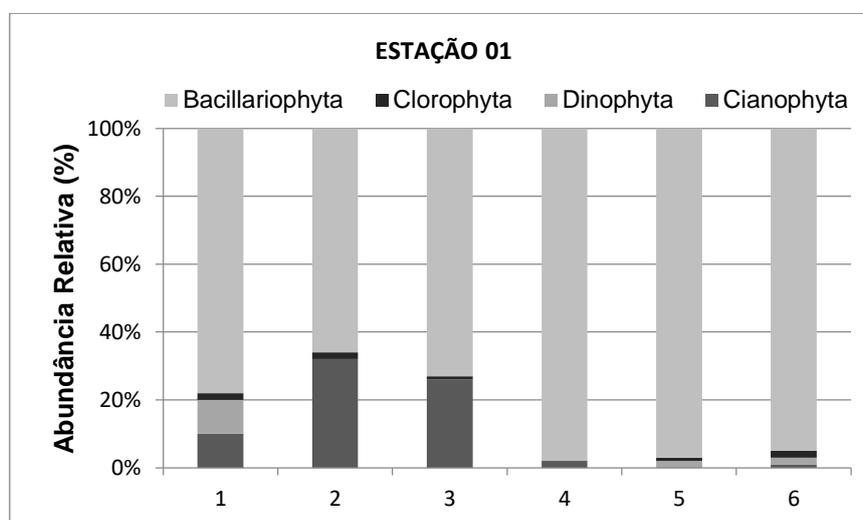


Figura 2. Distribuição percentual das divisões na composição do microfitoplâncton em viveiro de criação de *L. vannamei* durante um ciclo de cultivo.

Na estação 01, a clorofila *a* aumentou ao longo do cultivo, atingindo um máximo de 471,34 mg/m<sup>3</sup> dia 20/11 e em seguida, sofreu uma queda, 387,64 mg/m<sup>3</sup>. Na estação 02, o comportamento desta variável foi semelhante, mas os valores registrados foram menores, sendo o máximo de 250,8 mg/m<sup>3</sup> na 4<sup>o</sup> coleta (dia 05/11). A amostra do dia 05/Nov da Estação 01 foi perdida, devido um pequeno acidente de carro.

Em termos de densidade total, não houve uma tendência uniforme de aumento ou decréscimo nos seus valores ao longo do ciclo investigado, sendo o menor valor registrado de 3.600 org/L na Estação 01 e o maior de 104.400 org/L na Estação 02. Em relação à densidade específica, observou-se que *Navicula*, *Pleurosigma* e *Nitzschia* foram os gêneros mais abundantes, sendo os principais responsáveis pela dominância da divisão Bacillariophyta nas duas estações de coleta. Quanto à abundância relativa, a divisão Bacillariophyta foi um grupo que variou de abundante a dominante (Figura 3), com porcentagem muito acima dos demais grupos. A divisão Pyrrophycophyta teve maior importância no início do cultivo (2<sup>o</sup> coleta), atingindo 32% de abundância relativa na Estação 01 e 27% na 1<sup>o</sup> coleta da Estação 02.



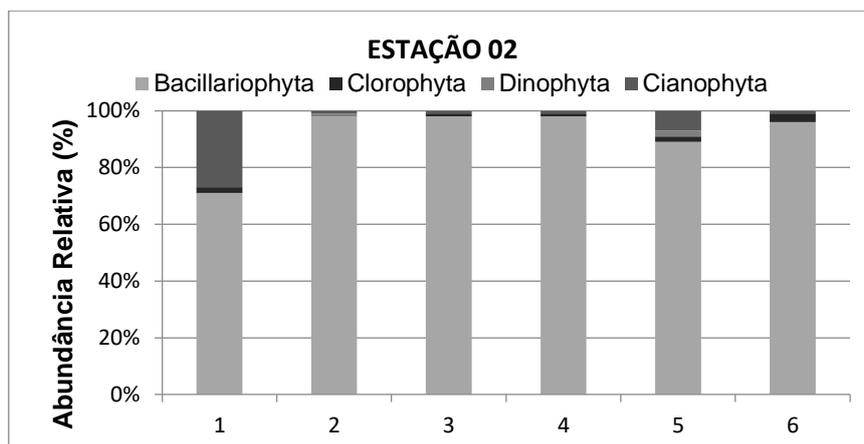


Figura 3. Abundância relativa microfitoplâncton em viveiro de criação de *L. vannamei* nas seis coletas realizadas durante um ciclo de cultivo.

As espécies que ocorreram em todas as amostras foram: *Amphiprora alata*, *Aulacoseira granulata*, *Coscinodiscus* spp, *Cyclotella* spp, *Fragilaria* sp, *Melosira arctica*, *Navicula* spp, *Nitzschia* spp, *Odontella mobiliensis*, *Oscillatoria* sp, *Pleurosigma* sp, *Polimyxus coronalis*, *Spyrogyra* sp e *Thalassiosira* spp. A diversidade média ( $H'$ ) nas estações de coleta teve um máximo de 2,0 bits/ind e um mínimo de 0,96 bits/ind. Em relação à equitabilidade média ( $J'$ ) nas estações estudadas, a máxima foi de 0,76 e a mínima de 0,28.

A análise de Kruskal-Wallis apresentou diferença significativa ao longo do cultivo para os seguintes parâmetros abióticos: pH ( $H = 19,36$ ;  $p = 0,0016$ ); oxigênio dissolvido ( $H = 20,63$ ;  $p = 0,0010$ ); e transparência ( $H = 21,29$ ;  $p = 0,0007$ ). Somente temperatura e salinidade não diferiram significativamente ao nível de 0,05 durante a criação de *L. vannamei*.

A Tabela 2 mostra que não houve diferença significativa em nenhuma das situações testadas, aceitando-se as hipóteses que a mensuração feita na superfície é a mesma próxima ao fundo; a média obtida é igual nas estações de coleta; a densidade total obtida é igual nas estações de coleta.

O teste de correlação linear realizado entre os parâmetros abióticos mostrou que as variáveis selecionadas pelo teste como significativas foram: transparência com o pH ( $r = -0,83$ ;  $p = 0,04$ ) e oxigênio dissolvido com o pH ( $r = 0,83$ ;  $p = 0,04$ ).

O teste de correlação linear realizado entre as variáveis abióticas (pH, OD, Salinidade, Transparência e Temperatura) e os grupos do microfitoplâncton mostrou que somente uma variável foi selecionada pelo teste como significativa: a densidade de dinoflagelados com a transparência ( $r = 0,91$ ;  $p = 0,01$ ).

O teste de correlação linear executado entre os parâmetros abióticos e a clorofila "a" mostrou que somente uma variável foi selecionada pelo teste como significativa: a transparência, que se correlacionou negativamente com a clorofila "a" ( $r = -0,86$ ;  $p = 0,02$ ).

Tabela 2 - Valores de p resultantes dos testes de hipóteses

Variável em teste	Teste	Estatística do teste	p valor	Análise
<b>Estação 01: Superf. x Fundo</b>	Mann-Whitney			
pH	"	0,5604	0,5752	NS
OD	"	0,6405	0,5218	NS
Salinidade	"	0,0000	1,0000	NS
Temperatura	"	1,6813	0,0927	NS
<b>Estação 02: Superf. x Fundo</b>	Mann-Whitney			
pH	"	0,1601	0,8728	NS
OD	"	0,6405	0,5218	NS

Salinidade	“	1,0408	0,2980	NS
Temperatura	“	1,3611	0,1735	NS
<b>Média Est. 01 x Est. 02</b>	Mann-Whitney			
pH	“	0,2402	0,8102	NS
OD	“	0,0000	1,0000	NS
Salinidade	“	0,2402	0,8102	NS
Temperatura	“	1,6013	0,1093	NS
Transparência	“	0,4804	0,6310	NS
<b>Dens. Fito Est. 01 x Est. 02</b>	Mann-Whitney	1,1219	0,2623	NS

NS – Não Significativo

## DISCUSSÃO

De acordo com Nunes (32), no cultivo de camarões marinhos a temperatura da água está intimamente associada à temperatura do ar, oscilando para cima e para baixo de forma proporcional. O autor afirma que a faixa ideal de temperatura para a espécie *L. vannamei* é entre 26 e 33 °C. Martins (4) estudando um ciclo semi-intensivo de cultivo de *L. vannamei* no Ceará registrou máxima de 25,9 °C e Chelappa et al. (9) em estudo semelhante no Rio Grande do Norte registraram 30,7 °C como a temperatura mais elevada, enquanto que no presente estudo a maior temperatura amostrada foi de 35 °C, o que poderia causar estresse nos animais confinados.

Na estação seca, é comum observar altas temperaturas e altas salinidades e provavelmente elas coexistem devido à redução de água doce, através de um fluxo menor proveniente dos rios e da chuva. Neste trabalho, as temperaturas foram mais elevadas que as registradas por Pereira et al. (12) que estudando o estuário do rio Curuçá no período seco registrou temperatura máxima de 30,5 °C. Isso revelou que a temperatura no ambiente de cultivo é mais elevada que em ambiente natural, provavelmente devido à baixa profundidade do viveiro e à elevada insolação na região. A temperatura não variou significativamente ao longo do cultivo ( $p > 0,05$ ).

Em relação ao oxigênio dissolvido (OD), sabe-se que é o mais importante e crítico na qualidade da água, para o *L. vannamei*, índices superiores a 3 mg/L propiciam um melhor desenvolvimento (33). No viveiro estudado, mesmo sem sistema de aeração artificial não foi detectado nenhum valor abaixo de 4 mg/L, apresentando valores mais elevados que os registrados por Pereira et al. (12) no Estuário do rio Curuçá (máximo de 8,2 mg/l de OD), provavelmente devido a atividade fotossintética intensa durante as coletas (período da manhã) e maior concentração espacial dos organismos fitoplanctônicos. Fonseca (6) registrou a máxima concentração de 10,8 mg/l, enquanto que Martins (4) obteve valores entre 0,3 e 5,9 mg/l, ambos estudos no estado do Ceará.

Os maiores valores de OD foram observados nos dias 22/out e 05/nov, período em que a água de cultivo esteve mais turva, sendo registradas as menores transparências, o que permite inferir a relação direta entre o fitoplâncton e a produção de OD, promovendo incremento dos níveis de OD a partir de intensa atividade fotossintética. Porém, altas densidades fitoplanctônicas podem alterar o desenvolvimento do camarão devido à depleção do OD durante a noite (34), período em que o fitoplâncton realiza o processo de respiração juntamente com os demais organismos presentes no ambiente de cultivo.

O OD correlacionou-se positivamente com o pH ( $r = 0,83$ ), revelando que à medida que aumenta uma das variáveis, a outra também aumenta. Noriega et al. (35) estudando o estuário de Barra das Jangadas (PE) também observaram uma correlação positiva entre pH e oxigênio dissolvido.

Quanto ao pH, apesar de existirem poucas informações sobre os efeitos do pH no desenvolvimento dos camarões (1), algumas mensurações estiveram acima de 9,0, que estaria acima da faixa ideal para o cultivo da espécie segundo Hernandez e Nunes (36), que é entre 8,1 e 9,0. Chelappa et al. (9) estudando durante um ciclo de cultivo viveiros de engorda de *L. vannamei* no Rio Grande do Norte obtiveram dados de pH variando de 8,1 a 8,2. Pereira et al. (12) registrou os

valores de pH sempre na faixa caracteristicamente alcalina, variando de 7,2 a 8,0 no estuário do rio Curuçá.

Foi detectada diferença significativa ao longo do cultivo para o pH e OD ( $p < 0,05$ ), o que pode estar ligado à maior atividade fotossintética, que ao promover a assimilação de  $\text{CO}_2$  pelo processo, acarreta a elevação do pH (37) que está correlacionado positivamente ao OD.

O comportamento da salinidade neste estudo foi semelhante ao observado por Cavalcanti (5) em um ciclo de cultivo semi-intensivo de *L. vannamei* na Paraíba. Os altos valores de salinidade registrados são justificados pelo período de estudo estar compreendido na época menos chuvosa na região, que vai de julho a dezembro (18), na qual a cunha salina de água do mar aproxima-se do continente, penetrando no estuário e aumentando os teores de salinidade do rio. A salinidade não variou significativamente ao longo do cultivo ( $p > 0,05$ ). Na pesquisa, a máxima salinidade observada foi de 30 ppm, estando dentro do recomendado por Boyd (33), que é de 0 a 40 ppm.

Em relação à transparência da água, Boyd (33) indica como uma faixa adequada entre 0,30 e 0,45 m. Foi possível observar que a transparência diminuiu ao longo do cultivo, semelhantemente aos resultados encontrados por Cavalcanti (5) em dois ciclos de cultivo em viveiros na Paraíba e por Fonseca (6) em um viveiro no Ceará. A média de transparência registrada para as estações de coleta 01 e 02 foram 28 e 27,8 cm, respectivamente, sendo inferiores à média obtida por Martins (4), que foi de 50 cm em viveiros de cultivo semi-intensivo localizados no Estado do Ceará.

A transparência correlacionou-se negativamente com o pH ( $r = - 0,83$ ), isto porque em geral a medida da transparência permite inferir que quanto mais turva e escura a água estiver, mais rica em fitoplâncton estará. Essa comunidade ao promover maior atividade fotossintética, vai assimilar durante processo  $\text{CO}_2$ , o que acarreta elevação do pH. A transparência variou significativamente ao longo do tempo ( $p < 0,05$ ), revelando a influência do cultivo nesta variável, seja pelo maior aporte de ração, maior incremento do volume de dejetos excretados pelos animais e/ou ressuspensão do sedimento em dias mais ventilados.

Não foi detectada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para nenhum parâmetro abiótico entre superfície e próximo ao fundo e nem entre as estações de amostragem, revelando um ambiente saudável, homogêneo e sem o fenômeno da estratificação.

Sendo a clorofila um dos principais pigmentos responsáveis pela fotossíntese, o conhecimento de sua concentração pode dar indicações da biomassa do fitoplâncton. Nos últimos anos, tem se tornado cada vez mais frequente a utilização da concentração de clorofila para expressar a biomassa fitoplanctônica (37).

As concentrações de clorofila *a* foram sofrendo aumento ao longo do cultivo, assim como o observado por Fernandes (8) que registrou a máxima concentração de 381 mg/m<sup>3</sup>, no período de seca, coincidindo com o período estudado neste trabalho. Considerando que não foi realizado nenhum procedimento de fertilização de manutenção durante o cultivo, os valores de clorofila *a* deveriam estar abaixo do que foi registrado. Provavelmente a não renovação de água no sistema de cultivo adotado, favoreceu concentrações muito elevadas de clorofila *a*.

Quanto à riqueza, neste estudo foram identificados 95 taxa, número superior ao observado por Melo et al. (10) com 28 taxa e Casé et al. (38) com 51 espécies, porém inferior ao inventariado por Fonseca (6), que foi de 225.

Em relação à diversidade média, Valentin et al. (31) classifica as estações de coleta variando de baixa a muito baixa, o que pode ser um indicativo de um sistema desequilibrado com diminuição da qualidade da água ou apenas uma característica de ambientes voltados à aquicultura. Quanto à equitabilidade, a classificação de Valetin et al. (31) revela que as amostras se encontraram melhor distribuídas no início e no fim do cultivo, já que os maiores valores ocorreram nesse período (mais próximos de um). Portanto, apesar de o sistema estudado ter baixa diversidade de espécies, elas estavam bem distribuídas.

Quanto à representatividade de cada Divisão, Bacillariophyta respondeu a 73%, bem próximo ao registrado por Melo et al. (10) que foi de 71,4%, enquanto que Fonseca (6) registrou predominância de diatomáceas (aproximadamente 100%), mas somente no início do ciclo de cultivo, pois depois houve um maior predomínio de cianofíceas. Neste estudo a divisão Bacillariophyta foi o

Silva RS, Souza ASL, Palheta GDA, Costa MSM, Melo NFAC. Diversidade e biomassa fitoplanctônica em viveiro de carcinicultura marinha no estado do Pará. Vet. e Zootec. 2018 jun.; 25(2): 142-154.

grupo dominante, confirmando a alta diversidade de diatomáceas em águas estuarinas. Segundo Patil e Gislerod (39), as diatomáceas são um importante recurso alimentar para camarões, tendo uma composição química rica em vitaminas e ácidos graxos. Já na pesquisa de Melo et al. (10), a Classe Cianoficeae foi predominante.

Neste trabalho *Nitzschia*, *Navicula* e *Pleurosigma* foram os principais gêneros responsáveis para a dominância das diatomáceas. Chelappa et al. (9) e Casé et al. (38) também identificaram as diatomáceas como dominantes em viveiros de carcinicultura marinha. Na região de Curuçá, a ação dos ventos é contínua e a profundidade do viveiro é pequena, permitindo uma ressuspensão do sedimento através do revolvimento do fundo, o que explicaria a maior abundância das diatomáceas bentônicas *Pleurosigma*, *Navicula* e *Nitzschia* neste estudo. Dam et al. (40) citam *Nitzschia* e *Navicula* como gêneros de grande representatividade, indicadores de águas ricas em nutrientes.

Segundo Smayda (41), as diatomáceas destacam-se como os principais organismos do microfitoplâncton estuarino e, na maioria dos casos, elas constituem a maior percentagem das microalgas presentes. Em estuários, a ocorrência e distribuição dos vários grupos de algas fitoplanctônicas são influenciadas pela salinidade, sendo as clorofíceas, cianofíceas e euglenofíceas relativamente mais importantes em locais com baixos teores salinos, tornando-se bem mais adaptadas em ambientes de água doce. Isso explica a menor representatividade desses grupos no estudo (41). O domínio de diatomáceas em viveiros de carcinicultura marinha é uma condição satisfatória, pois comparando com outros tipos de algas, as bacillariophytas são um melhor alimento para o camarão (1,7).

As densidades fitoplanctônicas não apresentaram uma tendência uniforme de aumento ou decréscimo nos seus valores ao longo do ciclo investigado nas estações de coleta, assim como o observado por Pereira Neto (7) e Fonseca (6). A densidade de dinoflagelados correlacionou-se positivamente com a transparência ( $r = 0,91$ ), revelando que esse grupo do microfitoplâncton não é bem adaptado em ambientes turvos, se desenvolvendo melhor em ambientes mais transparentes. Isto é confirmado por Pollinger (42) que afirma que a classe Dinophyceae tem seu desenvolvimento favorecido por grande disponibilidade de luz e elevadas temperaturas. Em carcinicultura, os dinoflagelados são muitas vezes prejudiciais aos camarões cultivados, assim é o caso das “marés vermelhas” de algumas espécies de *Peridinium*, o qual pode resultar na perda da produção (7).

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que fertilizações de manutenção não se mostraram necessárias, pois os restos de ração e fezes dos animais foram suficientes na liberação de nutrientes para o desenvolvimento da comunidade fitoplanctônica, fato observado a partir das concentrações de clorofila *a* e densidades ao longo do cultivo; A divisão Bacillariophyta que foi o grupo mais importante tanto em termos de riqueza quanto de densidade, podendo representar uma excelente alternativa como alimento natural no cultivo; O pH, oxigênio dissolvido e transparência devem ser constantemente monitorados, devido variação que obtiveram ao longo do cultivo; O fenômeno da estratificação não foi detectado, o que torna a profundidade de 1,5m uma recomendação em viveiros de carcinicultura do nordeste paraense.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa de mestrado da primeira autora. Aos estagiários do Laboratório de Ecologia Aquática e Aqüicultura Tropical da Universidade Federal Rural da Amazônia e ao proprietário e funcionários da Fazenda São Paulo.

## REFERÊNCIAS

1. Boyd CE. Water quality in ponds for aquaculture. Alabama: Agricultural Experimental Station, Arlburn University; 1990.

2. Boyd CE. Potencial of sodium nitrate to improve environmental conditions in aquaculture ponds. *World Aquac.* 1995;26:38-40.
3. Allan GL, Moriarty DJW, Maguire GB. Effects of pond preparation and feeding rate on production of *Peanaeus monodon* Fabricius, water quality, bacteria and benthos in model farming. *Aquaculture.* 1995;130:329-49.
4. Martins PCC. Influência das condições ambientais e técnicas de produção sobre a incidência de enfermidades no cultivo de camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, no Estado do Ceará [tese]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2003.
5. Cavalcanti LB. Variações das condições hidrológicas e da clorofila a associadas ao cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), na região estuarina do rio Paraíba do Norte (Paraíba – Brasil) [tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2003.
6. Fonseca RS. Dinâmica da comunidade fitoplanctônica em um viveiro de engorda de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) no estado do Ceará [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2006.
7. Pereira Neto JB, Dantas DMM, Gálvez AO, Brito LO. Avaliação das comunidades planctônica e bentônica de microalgas em viveiros de camarão (*Litopenaeus vannamei*). *Bol Inst Pesca.* 2008;34(4):543-51.
8. Fernandes D, Oliveira L, Pereira L, Gomes G, Freire G. Caracterização de amônia, nitrato, nitrito, fosfato (orto) dissolvido e clorofila “a” em uma fazenda de cultivo de camarão. *Rev Geol.* 2007;20(1):99-117.
9. Chelappa NT, Lima AKA, Câmara FRA. Riqueza de microalgas em viveiros de cultivo orgânico de camarão em Tibau do Sul, Rio Grande do Norte. *Rev Bras Biocienc.* 2007;5(2):120-2.
10. Melo MP, Carvalheiro JMO, Cordeiro TA, Queiroz AR, Prado JP, Borges IF. Phytoplanktonic composition of three cultivation systems used in *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) marine shrimp farms. *Acta Sci Biol Sci.* 2010;32(3):223-8.
11. Santana DS, Paiva RS, Melo NFAC. Diatomáceas cêntricas da região entre-marés da Praia de Ajuruteua (Bragança-Pará). *Bol Mus Para Emílio Goeldi.* 2006;1(3):149-56.
12. Pereira CTC, Giarrizzo T, Jesus AJS, Martinelli JM. Caracterização do efluente de cultivo de *Litopenaeus vannamei* no estuário do Rio Curuçá (PA). In: Barroso GF, Poersch LHS, Cavalli RO. *Sistemas de cultivos aquícolas na zona costeira do Brasil: recursos, tecnologias e aspectos ambientais e sócio-econômicos.* 1a ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional; 2007. p.291-302.
13. Sousa EB, Costa VB, Pereira LCC, Costa RAAM. Microfitoplâncton de águas costeiras amazônicas: Ilha Canela (Bragança, PA, Brasil). *Acta Bot Bras.* 2008;22:626-36.
14. Sousa EB, Costa VB, Pereira LCC, Costa RAAM. Variação temporal do fitoplâncton e dos parâmetros hidrológicos da zona de arrebentação da Ilha Canela (Bragança-Pará-Brasil). *Acta Bot Bras.* 2009;23:1084-95.
15. Santana DS, Paiva RS, Pereira LCC, Costa RM. Microphytoplankton of the Marapanim Estuary (Pará, Northern Brazil). *Trop Oceanogr.* 2010;38(2):152-63.

16. Costa VB, Sousa EB, Pinheiro SCC, Pereira LCC, Costa RAAM. Effects of high energy coastal environment on the structure and dynamics of phytoplankton communities (Brazilian Amazon littoral). *J Coast Res.* 2011;64:354-8.
17. Matos JB, Silva NIS, Pereira LCC, Costa RM. Caracterização quali-quantitativa do fitoplâncton da zona de arrebitação de uma praia amazônica. *Acta Bot Bras.* 2012;26:979-90.
18. Instituto de Desenvolvimento Economico, Social e Ambiental do Pará. Estatística Municipal – Curuçá. Belém: IDESP; 2014.
19. Melo JSC. Água e construção de viveiros na piscicultura. Lavras: UFLA/FAEPE; 1999.
20. United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization. Determination of photosynthetic pigments in sea water. *Monographs on Oceanography Methodology*, 1. Paris: Unesco; 1966.
21. Parsons TR, Strickland JDH. Discussion of spectrophotometric determination of marine plankton pigments, with revised equations of absorbance of chlorophyll a and carotenoids. *J Mar Res.* 1963;21(3):155-63.
22. Round FE, Crawford RM, Mann DG. *The diatoms biology and morphology of the genera.* Cambridge: Cambridge University; 1990.
23. Steindinger KA, Tangen K. Dinoflagelates. In: Tomas CR. *Identifying marine diatoms and dinoflagelates.* San Diego: Academic Press; 1997. p.387-584.
24. Desikachary TS. *Cyanophyta.* New Delhi: Council of Agricultural Research; 1959.
25. Bicudo EM, Menezes M. *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil.* São Carlos: Rima; 2005. (Chave para identificação e descrições).
26. Utermöhl H. *Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik.* 9a ed. **Stuttgart: Schweizerbart;** 1958. p.1-38.
27. Lobo E, Leighton G. Estructuras comunitárias de las fitocenosis planctónicas de los sistemas de desembocaduras de rios y esteros de la zona central de Chile. *Rev Biol Mar.* 1986;22:1-29.
28. Matteucci SD, Colma A. *Metodologia para el estudio de la vegetacion.* Washington: Secretaria General de La Organización de los Estados Americanos; 1982.
29. Shannon CE, Weaver W. *The mathematical theory of communication.* Urbana: University Illinois Press; 1949.
30. Pielou EC. The measurement of diversity in different types of biological collection. *J Theoret Biol.* 1966;13:131-44.
31. Valentin JL, Macedo-Saidah FE, Tenenbaum DR, Silva NML. A diversidade específica para a análise das sucessões fitoplanctônicas. Aplicação ao ecossistema da ressurgência de Cabo Frio (RJ). *Nerítica.* 1991;6(1-2):7-26.

32. Nunes AJP. O impacto da temperatura no cultivo de camarões marinhos. Rev ABCC. 2002;4(1):43-8.
33. Boyd CE. Manejo da qualidade da água na aquicultura e no cultivo de camarão marinho. 1a ed. Recife: Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC; 2000.
34. Alonso-Rodriguez R, Páez-Osuna, F. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. Aquaculture. 2003;219(1-4):317-36.
35. Noriega CD, Muniz K, Feitosa FAN, Flores-Montes MJ, Grego CKS, Soares GSS, et al. Distribuição espacial da biomassa fitoplanctônica e sua relação com os sais nutrientes, no sistema estuarino de Barra das Jangadas (Pernambuco - Brasil). Arq Cienc Mar. 2005;38:5-18.
36. Hernández JZ, Nunes AJP. Biossegurança no cultivo de camarão marinho: qualidade da água e fatores ambientais. Rev ABCC. 2003;3(2):55-9.
37. Esteves FA. Fundamentos de Limnologia. 2a ed. Rio de Janeiro: Interciências/ FINEP; 1998.
38. Casé M, Leça EE, Leitão S, Moraes Júnior AT. Plankton community as an indicator of water quality in tropical shrimp culture ponds. Mar Pollut Bull. 2008;56(7):1343-52.
39. Patil V, Gislerød HR. The importance of omega-3 fatty acids in diet. Curr Sci. 2006;90(7):908-9.
40. Dam H, Mertens A, Sinkeldam JA. Coded checklist and ecological indicator values of freshwaters diatoms from the Netherlands. Neth J Aquat Ecol. 1994;28(1):117-33.
41. Smayda TJ. The phytoplankton of estuaries. In: Ketchum BH. Estuaries and enclosed seas. Ecosystems of the World, 26. Amsterdam: Elsevier; 1983. p.65-102.
42. Pollinger U. Freshwater armored dinoflagellates: growth, reproduction strategies and population dynamics. In: Sandgreen CD. Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge: Cambridge University Press; 1988. p.134-74.

**Recebido em: 09/06/2016**

**Aceito em: 21/02/2018**

## CHARACTERIZATION OF RABIES EXPOSURE IN COLOMBIA, 2007-2011

Daniel Alejandro Buitrago Medina<sup>1</sup>  
Claudia Patricia Roncancio  
Hugo Grisales  
Noél Barengo<sup>2</sup>

### ABSTRACT

The objective of this study using secondary data from the national health surveillance system was to describe the characteristics of the cases exposed to rabies in the Colombian population during 2007-2011. The cases exposed to rabies were categorized into no-risk exposure, low-risk exposure and high-risk exposure. An increase in cases exposed to rabies was observed during 2007 (8.7%) and 2011 (31.5%). In Casanare, 31.4% of the cases exposed to rabies were classified as no-risk exposure, whereas in Arauca 86.7% of the cases corresponded to low-risk exposure cases. Vaupes reported 88.5% high-risk exposure cases. Rabies exposure was most prevalent in men (56.3 %) and the population belonging to the subsidized health insurance scheme (42.2%). The most common way of transmission was animal bites (88%). The observed increase in the number of cases exposed to rabies indicates a need to develop interventions targeting people in high risk exposure regions.

**Keywords:** bites; surveillance; rabies; control and prevention; transmission; Colombia.

## CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO À RAIVA NA COLÔMBIA, 2007-2011

### RESUMO

Foi realizado um estudo descritivo tipo série de casos utilizando dados secundários do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica. Foram descritas as características das exposições a raiva na população colombiana durante 2007-2011. Os casos da exposição a raiva observados foram categorizados em a exposição sem risco, a exposição de baixo risco e a exposição de alto risco. Observou-se um aumento dos casos da exposição a raiva de 2007 (8,7%) a 2011 (31,5%). Em departamento Casanare, 31,4% dos casos expostos à raiva foram classificados como exposição sem risco; Arauca 86,7% dos casos corresponderam a casos de exposição de baixo risco, enquanto Vaupes 88,5% de casos tiveram exposição de alto risco. A exposição à raiva foi mais prevalente em homens (56,3%) e em pessoas pertencentes ao regime de seguro de saúde subsidiado (42,2%). A forma mais comum de exposição foi a mordida de animais (88%). O aumento no número de surtos de raiva ocorridos entre 2007-2011 indica a necessidade de desenvolver intervenções orientadas em especial para as pessoas nas regiões de alto risco, que visem melhorar as condições de vigilância e controle da raiva (ou da doença).

**Palavras-chave:** mordidas, vigilância, raiva, controle e prevenção, transmissão, Colômbia

<sup>1</sup> Universidad de Antioquia, Grupo de demografía y salud, Colombia.

<sup>2</sup> Florida International University.

## CARACTERIZACIÓN DE LAS EXPOSICIONES RÁBICAS EN COLOMBIA, 2007-2011

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue describir las exposiciones rábicas en Colombia y sus perfiles poblacionales, usando como fuente de información secundaria los datos reportados al Sistema de Vigilancia - Sivigila durante el periodo 2007-2011. Los casos de exposición rábica están categorizados en no exposición, exposición leve y exposición grave. Se observó incremento del evento durante 2007 (8.7%) a 2011 (31.5%). En Casanare el 31,4% de los casos fueron clasificados como no exposición, en Arauca 86,7% fueron exposiciones leves y Vaupés reporto el 88,5% de exposiciones graves. El evento fue más frecuente en hombres (56,3%) y en régimen subsidiado (42,2%). La mordedura fue la agresión más reportada (88%). El aumento en el número de casos hace necesaria la evaluación de las actividades realizadas enfocándolas a los grupos con mayor riesgo y vulnerabilidad a las exposiciones rábicas, en aras de mejorar impacto y efectividad.

**Palabras clave:** Mordeduras de animales, vigilancia, rabia, control y prevención, transmisión, Colombia

### INTRODUCTION

In most countries of the world where rabies is endemic, surveillance of rabies infections in humans is carried out using different strategies such as detection of people in close contact with potential transmitters of the disease (1-6). Especially, as rabies is spread through close contact with infectious material, usually saliva, bites or scratches of infected animals (7).

Rabies is considered as one of the most frequently reported events in surveillance systems of infectious diseases (5,8,9). With about 40,000 people exposed to rabies in the United States in 1998, it became one of the most important public health concerns in Northern America (10). In Olinda, Brazil, 7,062 exposures were reported to rabies between 2002 and 2006 showing an annual increase of events alerting health authorities as the disease became endemic most likely due to insufficient treatment (11). Guatemala reported 13,262 bites by animals exposed to rabies with 8% of the cases leading to death (12). Close to 7000 rabies consultations were made in the first half of 2005 in Santiago de Chile by victims of animal bites (13). Generally, those reports are a underestimation of the actual numbers as many victims of animal bites do not seek health-care services and treat their injuries according to their best knowledge at home.

Whereas some countries in the Americas such as the above mentioned ones have well-established surveillance system providing information on rabies events, little has been published about the characteristics of rabies exposure in Colombia. In order to provide relevant scientific information for political decision-makers in health-care, it is important to study the burden of rabies exposures and its most important underlying risk factors to protect the local population and to implement preventive measures.

The aim of this study was to describe the characteristics of the cases exposed to rabies in the Colombian population during 2007-2011.

### MATERIALS AND METHODS

#### Material

This descriptive study used secondary data available on cases exposed to rabies notified to the national surveillance system (SIVIGILA) during 2007-2011. All in all, 217.478 cases were reported during the study period. As the structure of SIVIGILA has been changed during the study period, the data used in this study was manually revised to unify the information of the old and new data collecting system. Thus, the available information was combined into a single database. Cases with missing information on one or more variables used in this analysis were excluded. In addition,

people with reported age of more than 44 years above the average life-expectancy of the Colombian population were excluded.

### Methods

An event of rabies exposure collected by SIVIGILA is defined as a contact between a potentially infected animal and a human being (7). The cases of rabies exposure are categorized in the surveillance system according to no-risk exposure, low-risk exposure and high-risk exposure. In addition to the geographical site of the potential rabies contact, SIVIGILA collects information on characterization of the exposure, applied treatment and monitoring of potential rabies victims.

### Data analysis

The data was analyzed using Excel software PASW statistics 18®, 7 and Epi Info XLSTAT. Continuous variables are presented using measures of central tendency (mean, standard deviation) whereas frequencies are used for categorical variables. The overall prevalence of rabies exposure cases per 1,000 populations was calculated for the total number of cases and for no-risk, low-risk and high-risk exposure notified events. In the geographical maps of reported rabies cases relative frequencies and percentiles are presented.

### Ethical considerations

As this study did not contain information identifying the individuals of the reported cases and used only secondary data, no permission of an ethical committee was needed according to the Colombian regulation.

## **RESULTS**

The mean age of people exposed to rabies was 26 years (SD = 24.2 years). The prevalence of no-risk exposure (54.8%; 95% CI 54.3-55.2%), low-risk exposures (56.6; 95% CI % 56.3-56.8) and high-risk exposure (57.6; 95% CI 56.9-58.2%) was higher in men compared to women. The average age of the notified cases in the high-risk exposure group (25.4 years, 95% CI 25.2-25.8) was statistically significantly lower than the one observed in the low-risk exposure (26.5 years; 95% CI 26.3-26.6) and no-risk exposure groups (26.7 years; 95% CI 26.5-26.9).

During the five years of this analysis, 217 618 cases of exposure to rabies were reported (Table 1). There was an increase in notified events of rabies exposure from 8.7% in 2007 to 31.5% in 2011. The majority of rabies exposure cases were male (56%; 95% CI 55.9-56.7%) and three out of four cases were registered in the major cities of the provinces (75.5%; 95% CI 75.3-75.6%). However, there was no difference in the rate of notified rabies exposure events between the urban (4.8/1,000) and rural (4.8/1,000) areas. The percentage of notified cases involving people belonging to the state-subsidized health-insurance scheme was (42.2%; 95% CI 41.9-42.5%), whereas the frequency of cases of individuals who pay a monthly fee for their health-care coverage (contributive system) was 41.3% (95% CI 41.0-41.6). This prevalence was rather stable during the period of data analysis with the exception of the year 2008 when the frequency of reported cases was higher in the contributive health-care regime.

**Table 1.** Sociodemographic characteristics of rabies exposure events in Colombia during 2007-2011.

Variable	2007		2008		2009		2010		2011		Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Reporting year	19,012		41,215		41,044		47,737		68,610		217,618		
Sex	Male	10798	56.8	23288	56.5	23393	57.0	26761	56.1	38308	55.9	122548	56.3
Area of residence	Urban	13038	68.6	32315	78.4	31547	76.9	36093	75.6	51250	74.8	164243	75.5
	Semi-urban	3670	19.3	3718	9.0	3507	8.5	3859	8.1	5796	8.5	20550	9.4
Health insurance	Rural	2304	12.1	5182	12.6	5990	14.6	7767	16.3	11512	16.8	32755	15.1
	Contributory	7171	37.7	16979	41.2	16646	40.6	19833	41.6	29204	42.6	89833	41.3
Ethnicity	Subsidized	7325	38.5	15933	38.7	16956	41.3	20719	43.4	30861	45.1	91794	42.2
	Indigenous	429	2.3	769	1.9	1070	2.6	896	1.9	1211	1.8	4375	2.0
Population group	Afro-Colombian	2403	12.6	3290	8.0	2967	7.2	2385	5.0	2807	4.1	13852	6.4
	Other	16048	84.4	36419	88.4	36392	88.7	43877	92.0	64171	93.7	196907	90.5
Case Type	Other population groups	18851	99.2	40982	99.4	40813	99.4	47502	99.6	68210	99.7	216358	99.5
	Displaced people	92	0.5	149	0.4	170	0.4	140	0.3	170	0.2	721	0.3
Hospitalization	Confirmed by clinical diagnostics	15201	80.0	30756	74.6	41044	100	47699	99.9	68474	99.8	203174	93.4
	No hospitalization	18547	97.6	40264	97.7	40102	97.7	46500	97.4	66979	97.7	212392	97.6

Figure 1 shows the number of cases identified per 1000 population in each of the provinces of Colombia according to percentile. The largest percentage of notifications received by SIVIGILA was from the district of Bogotá (17%) followed by the provinces of Valle del Cauca (14%), Cundinamarca (7.5%), Antioquia (6.2%), Santander (5.7%) and Huila (4.8%). The average reporting rate of rabies exposure for entire Colombia was 4.8 per 1,000 inhabitants. The provinces with the highest reported events of rabies exposure per 1000 people were Vaupés (12.3), Arauca (11.4) and Huila (9.8). The highest rate of no-risk exposure was recorded in the provinces of Casanare (31.4), Sucre (26.3) and Tolima (25.9). Whereas the highest rate of low-risk exposure was 86.7/1000 in Arauca, the province of Vaupés in the Amazon region reported the highest rate of high-risk exposure cases (88.5/1000).

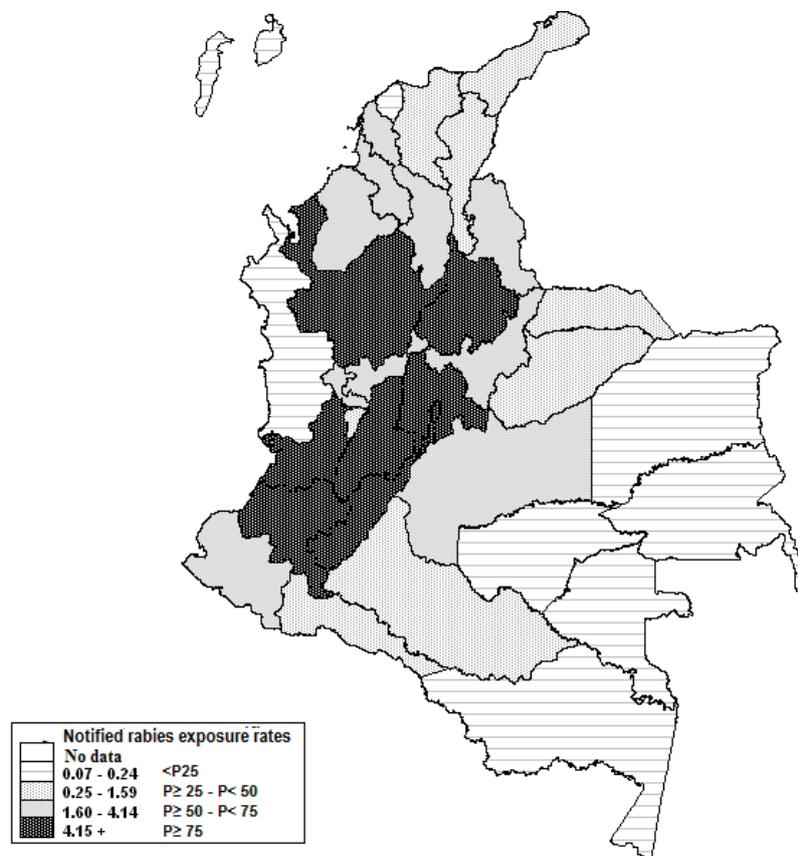
**Figure 1.** Rates of high-risk rabies exposure according to province in Colombia during 2007-2011.

Table 2 presents the characteristics of the rabies exposure cases reported to SIVIGILA. About 98% of cases did not require hospitalization and the victims were attended in outpatient clinics. Less than 1% of the cases in rabies exposure victims resulted in death (n=8) during the study period. Animal bites were the most common type of rabies exposure contact accounting for 88% of all reported cases. In addition, half of the bite injury occurred in the lower legs (51.5%), whereas wounds in upper extremities were registered in one out of five cases (20.2%). The most prevalent animal responsible for the rabies exposure incident was the dog (84.8%). Most of the animals showed no signs of rabies infection at the time of exposure and were left alive after an observation period. Most of the cases (71%) recorded were classified as low-risk. The corresponding prevalence of no-risk and high-risk exposure were 19.5% and 9.5%, respectively.

**Table 2.** Characteristics of rabies exposure wounds in Colombia during 2007-2011.

Variable		2007		2008		2009		2010		2011		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Type of lesion	Bite	16830	89.4	35362	86.8	36117	88.8	42230	88.7	61074	89.3	191613	88.6
	Scratch	1742	9.3	4825	11.8	3986	9.8	4645	9.8	6702	9.8	21900	10.1
	Lick	73	0.4	113	0.3	99	0.2	141	0.3	155	0.2	581	0.3
	Saliva contact with open skin or mucosa	97	0.5	241	0.6	281	0.7	369	0.8	229	0.3	1217	0.6
Injury type	Unique	12482	66.3	27430	67.4	26962	66.3	31747	66.7	45469	66.5	144090	66.6
Depth of wound	Superficial	15514	82.4	34007	83.7	33332	81.9	38941	81.8	56488	82.6	178282	82.5
	Deep	3317	17.6	6613	16.3	7344	18.1	8668	18.2	11864	17.4	37806	17.5
Anatomic site of injury	Head, face or neck	2666	14.2	5135	12.6	5305	13.0	5977	12.6	8773	12.9	27856	12.9
	Hand, finger	3374	17.9	8881	21.8	8457	20.8	9782	20.5	13236	19.4	43730	20.2
	Trunk	1072	5.7	2385	5.9	2552	6.3	2751	5.8	4067	6.0	12827	5.9
	Superior member	3327	17.7	7305	17.9	7717	19.0	9023	19.0	12622	18.5	39994	18.5
	Lower member	9901	52.6	20571	50.5	20837	51.2	24537	51.5	35401	51.8	111247	51.5
Information on animal contact													
Species aggressor	Dog	17170	90.3	33027	80.1	33695	82.1	40583	85.0	60116	87.6	184591	84.8
	Cat	834	4.4	5318	12.9	4011	9.8	4862	10.2	6674	9.7	21699	10.0
	Pork	585	3.1	202	0.5	97	0.2	101	0.2	116	0.2	1101	0.5
Presence of rabies symptoms	With rabies symptoms	763	4.1	1275	3.2	1225	3.1	972	twenty	650	1.0	4885	2.3
	No rabies symptoms	10630	56.5	24583	60.8	25194	63.2	32105	67.6	51896	76.4	144408	67.3
	Unknown	7437	39.5	14548	36.0	13437	33.7	14424	30.4	15405	22.7	65251	30.4
Exposure Type	Low-risk	0	0.0	0	0.0	0	0.0	10257	21.7	31736	46.9	41993	19.5
	Moderate risk	16613	88.2	36546	89.6	36368	89.4	32351	68.3	30819	45.6	152697	70.9
	High-risk	2217	11.8	4207	10.3	4265	10.5	4738	10.0	5098	7.5	20525	9.5

Most of the rabies exposure victims were advised to wash the wound immediately with soap and water (Table 3). Anti-rabies serum (immunoglobulin) was administered in 8.1% of cases and a 28% of bite victims were vaccinated after the event. Only a small percent of the treated individuals reported adverse reactions to the treatment (5.3%). It was found that 8,504 of the cases classified as high-risk exposure (41.4%) was applied with an anti-rabies serum. The corresponding frequency of anti-rabies serum application in the low-risk group and no-risk group were 1.3% (n=1941) and 0.3% (n=119), respectively. Furthermore, a rabies vaccination was given in 55.4% (n=11.370) of the high-risk exposure cases, 31.1% (n=47.484) of the low-risk events and in 2.5% (n=1.057) of the no-risk exposure cases. The majority of animals possible infected with rabies were alive after the observation period (94.7%). In most of the cases the animal's health was monitored at home (96.5%).

**Table 3.** Characteristics of anti-rabies treatment posterior to exposure in Colombia during 2007-2011.

Variable	2007		2008		2009		2010		2011		Total		
	n	%	n	%	n	%	N	%	%	n	%	n	
<b>Pat history of immunization</b>													
Anti-rabies serum	Not applied	17144	91.0	34661	85.0	35028	86.2	41854	88.0	61900	90.7	190587	88.2
Rabies vaccine	Not applied	16425	87.2	33225	82.1	33864	84.5	40603	85.4	60397	88.5	184514	85.7
<b>Current treatment</b>													
Wound care using water and soap	if	17510	93.0	37950	93.9	37459	94.0	45129	94.8	65581	96.0	203629	94.7
Wound suturing	Not applied	17137	91.0	37868	93.1	37229	92.1	43843	92.1	63352	92.7	199429	92.4
Anti-rabies serum	Not applied	18544	99.1	8615	91.6	4230	70.6	24977	88.6	63382	93.1	119748	91.9
Vaccination	Not applied	17460	92.7	36055	89.2	32220	80.8	28799	60.6	40227	58.9	154761	72.0
<b>Case tracking</b>													
Type of adverse reactions to application of anti-rabies serum	None	2	5'clock	350	92.8	1526	96.6	2018	94.0	2069	94.3	5965	94.7
	Local	2	5'clock	24	6.4	51	3.2	119	5.5	111	5.1	307	4.9
Adverse reactions to the application of the vaccine or serum	None	1237	95.0	2716	85.4	4954	85.1	9395	94.9	11406	93.5	29708	91.7
	Local	56	4.3	448	14.1	854	14.7	477	4.8	749	6.1	2584	8.0
	Systemic	9	0.7	18	0.6	10	0.2	28	0.3	48	0.4	113	0.3
Suspension of treatment	Not suspended	1070	82.8	2093	71.3	4135	81.0	6874	67.6	8158	66.6	22330	70.3
	Due to medical order	222	17.2	683	23.3	792	15.5	1414	13.9	2023	16.5	5134	16.2
Place of patient monitoring	Home	11543	98.0	19557	97.5	15800	96.6	17704	96.4	21236	94.7	85840	96.5
Condition of the animal after observation	Healthy	11503	98.0	19590	93.9	15959	92.5	17897	94.2	21315	95.9	86264	94.7
	Sick	204	1.7	365	1.7	313	1.8	365	1.9	577	2.6	1824	twenty
	Dead	36	0.3	914	4.4	979	5.7	736	3.9	341	fifteen	3006	3.3

## DISCUSSION

This study found an annual increase in reported cases of rabies exposure with a high number of cases in urban centers as expected due to the higher population density. However, the highest prevalence of high-risk exposure was observed in Vaupes whereas Casanare reported the highest moderate-risk rabies exposure prevalence. The prevalence of rabies exposure notifications did not differ between urban and rural sites or health-insurance regime even though the subsidized scheme had a slightly higher prevalence.

In line with other studies, most notified rabies exposures cases occur in young people, with a higher proportion of notified cases in children (13-15). This may be due to the fact that children are more affected by their smaller body size and may be more exposed to animal bites due to their behavior or reactions in situations involving animal attacks (13). Consistent with a previous study, notified rabies exposure events were most prevalent in men in younger age-groups (9).

In line with previous studies, in Colombia, the most common reason of rabies exposure were dog bites (13,16-19).

Every second application of anti-rabies treatment was handled incorrectly, especially in cases of high-risk or moderate risk exposure. This may be due to lack of training in using the national rabies exposure protocol (7) and clinical management guidelines. In disagreement with the national rabies treatment protocol, in many cases of low-risk exposure an anti-rabies serum was given to the exposed individuals leading to unnecessary additional costs for the surveillance and national health-care system.

Another possibility is that only some of the rabies treatment procedures were registered in the surveillance system, thus, providing a sub estimation of the real treatment applied (7,20,21).

The majority of notified rabies exposure cases were subsequently clinically tested by laboratory tests to rule out a possible infection according to the national rabies protocol. Despite the national guideline implying that the results of the clinical rabies tests have to be received within four week after the exposure, the clinical information sent to the register was often delayed or not received at all resulting in incomplete information of the follow-up rabies exposure cases in the surveillance system (7). Therefore, some cases are classified in the data base as confirmed by laboratory tests, suspected cases or probable rabies infection cases.

Similar to the findings of Beltran et al. (22) reporting that the official rabies treatment protocol provided by WHO is rarely followed, it is of concern that bites injuries caused by wild

animals that are generally classified as high-risk exposure cases, were not immediately treated by vaccination or anti rabies serum as indicated in the Colombian clinical guidelines. This is also reflected in the low percentages of hospitalization following rabies exposure.

In general, little information was available on the follow-up of the patients treated after the rabies exposure. It is important to improve the Colombian surveillance system and to track patients that have received anti rabies serum or vaccination in order to explore the treatment outcome or whether any complications of the treatment were reported. A similar concern has been observed in other studies as well (22,23). In the USA, for instance, there was no evidence of any anti-rabies treatment initiated after exposure during 1980 and 1998 (24). Furthermore, in our study, the multiple correspondence analyses showed misclassification of several cases of rabies exposure. While high-risk exposures were classified in the majority of cases correctly according to the established indicators, several problems were observed in the exposure cases classified as moderate-risk or low-risk exposures where the labeling of cases was not done according to the official indicators of the surveillance guidelines. This misclassification of rabies exposure cases shows the need to thoroughly evaluate all components of the surveillance system to improve the accuracy of its information on each level and to guarantee that the information of the system is entered correctly by the people feeding the register.

Naturally, our study had some limitations. The notifying system for cases of rabies exposure has changed during the reporting period of our study. Thus, the number of cases notified in the earlier years may be underestimated. Moreover, it has been estimated that only 20% of the rabies exposure cases may be notified (24). Furthermore, some cases may be registered more than once in the system as it was not possible to exclude those cases from the data analysis. Due to ethical reasons, all the information on personal identity of the patients was removed before the study group was given the permission to analysis the data. However, this may only affect a very small percentage of the cases and, thus, only has a minor impact on the results of this study.

In conclusion, there is a need to implement educational intervention to reduce exposure to rabies especially in the provinces with a high prevalence of high-risk rabies exposure events. Ideally, these interventions may be led by local and national health-authorities. Successful interventions may reduce the costs of the management of people exposed to rabies. In addition, we recommend to study in more details why certain ethnic groups show a higher exposure to rabies than other population groups. Moreover, in-depth analysis should be carried out on all levels to assess the flaws of the surveillance system in regard lack of monitoring of patients treated after rabies exposure and how to reduce the misclassification of rabies cases in order to strengthen the rabies surveillance system in Colombia.

## REFERENCES

1. Organización Panamericana de la Salud. Ministerio de Salud. Manual de normas y procedimientos para la vigilancia prevención y control de la rabia [Internet]. Buenos Aires: OPAS; 2007 [cited 22 Oct 2013]. Available from: <http://www.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/cdmanualRabia/comite.html>.
2. Secretaría de Salud. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la rabia en humano [Internet]. Cidade do Mexico: Secretaría de Salud; 2012 [cited 2013 Jan 11]. Available from: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig\\_epid\\_manuales/23\\_2012\\_Manual\\_RabiaHumano\\_4dic12.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/23_2012_Manual_RabiaHumano_4dic12.pdf).
3. Townsend SE, Lembo T, Cleaveland S, Meslin FX, Miranda ME, AAG Putra et al. Surveillance guidelines for disease elimination: a case study of canine rabies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013;36(3):249-61.

4. Johnson N, Aréchiga-Ceballos N, Aguilar-Setien A. Vampire bat rabies: ecology, epidemiology and control. *Viruses*. 2014;6(5):1911-28.
5. Vigilato MAN, Clavijo A, Knobl T, Silva HMT, Cosivi O, Schneider MC, et al. Progress towards eliminating canine rabies: policies and perspectives from Latin America and the Caribbean. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013;368(1623):20120143.
6. Oviedo-Pastrana ME, Oliveira CSF, Capanema RO, Nicolino RR, Oviedo-Socarras TJ, Haddad JPA. Trends in animal rabies surveillance in the endemic state of Minas Gerais, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):e0003591.
7. Instituto Nacional de Salud (CO). Sistema nacional de vigilancia en salud pública sivigila - protocolo de vigilancia de rabia [CD -ROM]. Bogotá: El Instituto; 2012.
8. Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Atylan M, et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4):e0003709.
9. Yao H-W, Yang Y, Liu K, Li X-L, Zuo S-Q, Sun R-X, et al. The spatiotemporal expansion of human rabies and its probable explanation in Mainland China, 2004-2013. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):e0003502.
10. Blanton JD, Manangan A, Manangan J, Hanlon CA, Slate D, Rupprecht CE. Development of a GIS-based, real-time Internet mapping tool for rabies surveillance. *Int J Health Geogr*. 2006;5:47.
11. Dantas-Torres F, Oliveira-Filho E. Human exposure to potential rabies virus transmitters in Olinda, State of Pernambuco, between 2002 and 2006. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40:617-21.
12. Forde T. Rabies surveillance and control in Guatemala [Internet]. 2009 [cited 2013 Jan 11]. Available from: [http://www.medvet.umontreal.ca/infoGen/international/giv/wordpress/wp-content/uploads/2011/01/rapport\\_guatemala\\_2009.pdf](http://www.medvet.umontreal.ca/infoGen/international/giv/wordpress/wp-content/uploads/2011/01/rapport_guatemala_2009.pdf).
13. Jofré ML, Perret PC, Abarca VK, Solari GV, Olivares CR, López PJ. Recomendaciones para el manejo de mordeduras ocasionadas por animales Rev Chil Infectol [Internet]. 2006 [cited 2013 Oct 22];23(1):20-34. Available from: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v23n1/art02.pdf>.
14. Instituto Nacional de Salud (CO). Sistema nacional de vigilancia en salud pública sivigila - protocolo de vigilancia de rabia [CD -ROM]. Bogotá; El Instituto; 2009.
15. Bourhy H, Dautry-Varsat A, Hotez PJ, Salomon J. Rabies, still neglected after 125 years of vaccination. *Plos Negl Trop Dis*. 2010;4:839.
16. Presutti RJ. Prevention and treatment of dog bites. *Am Fam Physician*. 2001;15:1567-72.
17. Bregman B, Slavinski S. Using emergency department data to conduct dog and animal bite surveillance in New York City, 2003-2006. *Public Health Rep*. 2012;127:195-201.
18. Takayama N. Rabies: a preventable but incurable disease. *J Infect Chemother*. 2008;14:8-14.
19. Morgan M, Palmer J. Dog bites. *BMJ*. 2007;334:413-7.

20. Chang Y, McMahon J, Hennon D, LaPorte R, Coben J. Dog bite incidence in the city of Pittsburgh: a capture-recapture approach. *Am J Public Health*. 1997;87:1703-5.
21. Dias R, Rangel D, Oliveira L, Bittencourt C, Sangiovanni J. Motivos de abandono do tratamento antirrábico humano pós-exposição em Porto Alegre (RS, Brasil). *Cienc Saude Colect*. 2011;16:537-46.
22. Saad C, Toro G, Martinez M, Diaz A. Rabia: guia practica para la atencion integral de personas agredidas por un animal potencialmente transmisor de Rabia. 1a ed. Bogotá: Editorial Vasa; 2009.
23. Beltran C, Muñoz M, Sierra Z, Rueda J, Ulloa A. Análisis de situación del sistema de vigilancia en salud pública de exposición rábica 2008. *Inf Quinc Epidemiol Nac*. 2011;16:31-4.
24. Noah DL, Drenzek CL, Smith JS, Krebs JW, Orciari L, ShaddockJ, et al. Epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996. *Ann Intern Med*. 1998;128:922-30.

**Recebido em: 03/05/2016**  
**Aceito em: 19/02/2018**

## ANÁLISE AMBIENTAL, SANITÁRIA E ECONÔMICA DE UM SISTEMA DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS SÓLIDOS E EFLUENTES EM UMA GRANJA DE SUÍNOS

Evelyne Cazarotto Farezin<sup>1</sup>

Juliana Sarubbi<sup>2</sup>

Jean Louis Rabello de Moraes<sup>3</sup>

Waldemar Hazoff Junior<sup>2</sup>

Francisco Rafael Martins Soto<sup>2</sup>

### RESUMO

Os dejetos suínos apresentam potencial poluidor do ponto de vista ambiental e sanitário devido à alta carga de matéria orgânica. Entretanto, quando devidamente tratados, podem apresentar potencial para a geração de produtos de valor agregado. Objetivou-se realizar uma análise ambiental, sanitária e econômica de um sistema de tratamento de resíduos sólidos e efluentes (STRSE) em uma granja tecnificada de suínos de ciclo completo. O STRSE foi constituído basicamente por compostagem, biodigestão anaeróbica e retenção e desidratação do lodo. Foram realizados testes laboratoriais, onde foram avaliados parâmetros físico-químicos e microbiológicos. A análise de viabilidade econômica do STRSE foi amparada na técnica de orçamento de capital. O STRSE foi capaz de tratar os resíduos orgânicos e os efluentes tornando-os incapazes de causarem danos ambientais e sanitários. Houve também ganho social e redução de passivos ambientais. Na análise econômica, o STRSE levará cerca de nove anos para amortizar o capital investido.

**Palavras-chave:** compostagem, biodigestão anaeróbica, biogas, biofertilizante, coliformes.

### ENVIRONMENTAL, SANITARY AND ECONOMIC ANALYSIS OF A SYSTEM OF TREATMENT OF SOLID WASTE AND EFFLUENTS IN A SWINE FARM

### ABSTRACT

The swine manure have pollution potential of environmental and sanitary point of view due to the high organic matter content. However, when properly treated, may present potential for generating value-added products. This study aimed to carry out an environmental analysis, health and economic of a solid waste treatment system and wastewater (WTSW) in a technified swine farm full cycle. The WTSW was formed basically by composting, anaerobic digestion and retention and sludge dehydration. Laboratory tests were evaluated in chemical and microbiological physical parameters were performed. The economic viability of WTSW analysis was supported in capital budgeting technique. The WTSW was able to treat organic waste effluents and rendering them unable to cause environmental and health damage. There was also gain social and reduction of environmental liabilities. In the economic analysis, WTSW will take about nine years to amortize the capital invested.

**Keywords:** composting, anaerobic biodigestion, biogas, biofertilizers, coliforms.

<sup>1</sup> Acadêmica de Zootecnia – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Campus Palmeira das Missões-RS.

<sup>2</sup> Professora Adjunta do Departamento de Zootecnia e Ciência Biológicas - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Campus Palmeira das Missões-RS.

<sup>3</sup> Técnico em Gestão Ambiental.

# ANÁLISIS AMBIENTAL, SANITÁRIA Y ECONÓMICA DE UN SISTEMA DE TRATAMIENTO DE RESIDUOS SÓLIDOS Y EFLUENTES EN UNA GRANJA DE CERDOS

## RESUMEN

El estiércol de cerdo tiene un potencial de contaminación desde un punto de vista del medio ambiente y la sanidad, debido al alto contenido de materia orgánica. Sin embargo, cuando se trata adecuadamente, puede presentar potencial para generar productos de valor añadido. Este estudio tuvo como objetivo llevar a cabo un análisis del medio ambiente, la sanidad y económica de un sistema de tratamiento de residuos sólidos y aguas residuales (STRSAR) en una granja tecnificada ciclo completo de cerdos. El STRSAR fue formada básicamente por compostaje, digestión anaerobia y la retención y deshidratación de lodos. las pruebas de laboratorio fueron evaluados en parámetros físicos químicos y microbiológicos se llevaron a cabo. La viabilidad económica de análisis STRSAR fue apoyado en la técnica de presupuesto de capital. El STRSAR era capaz de tratar los efluentes de residuos orgánicos y haciéndolos incapaces de causar daños al medio ambiente y la sanidad. También hubo reducción de ganancia social y de los pasivos ambientales. En el análisis económico, STRSAR tomará unos nueve años para amortizar el capital invertido.

**Palabras clave:** compostaje, biodigestión anaeróbica, biogás, biofertilizante, coliformes.

## INTRODUÇÃO

A carne suína está ganhando cada vez mais espaço no mercado mundial e nacional, onde o consumo desta proteína está em expansão (1). Para atender a demanda que é crescente, a atividade suinícola vem aumentando sua produção nos últimos anos (2) e a expectativa é de crescimento acentuado nos anos vindouros (3). O Brasil encontra-se entre os dez maiores produtores mundiais da carne, estando na quarta posição no ranking de produtores e também nesta colocação no quesito exportação (4). A busca pela maior produção e a criação intensiva contribuem para o aumento da produção de efluentes e de resíduos, que se manejados de forma errônea podem causar diversos desequilíbrios ambientais, sanitários, econômicos e sociais (1,5,6,7).

Os dejetos suínos apresentam potencial poluidor devido à alta carga de matéria orgânica e a eventual presença de patógenos (8,9). Quando estes dejetos e/ou efluentes são lançados no meio ambiente sem tratamento adequado, podem atingir o lençol freático e causar poluição dos recursos hídricos, do ar e a destruição da camada de ozônio, esta última ocasionada pela emissão majoritária de gás metano e óxido nitroso (6).

Os resíduos de serviço de saúde animal (RSSA) também podem gerar sérios impactos ambientais quando descartados inadequadamente (10). Estes RSSA possuem capacidade de infectar e contaminar o meio ambiente e à saúde humana (11). Isso ocorre devido à presença de agentes infecciosos, substâncias químicas, tóxicas, radioativas e objetos perfurocortantes contaminados (12). Além disso, os RSSA podem apresentar diversos micro-organismos que podem sobreviver por tempo considerável nos materiais, tornando-se agentes de disseminação de patógenos para os seres humanos e animais (13,14).

Em relação aos danos sanitários, quando ocorre a decomposição não controlada dos dejetos ou a destinação inadequada dos RSSA, como placentas e animais mortos, há geração de odores e a proliferação de insetos que podem ser reservatórios e/ou vetores de doenças, representando assim um dos principais problemas sanitários (15).

Os dejetos sólidos e os RSSA orgânicos podem ser tratados por meio da compostagem. Este processo é um dos mais utilizados, pois vem obtendo resultados satisfatórios (16,17). Além disso, gera um composto que pode ser utilizado como adubo apresentando assim valor econômico agregado (18). Já para os demais RSSA, o destino final mais comum em 2013 foi à incineração (44%), autoclave (20,5%), micro-ondas (2,4%) e outros (33,1%) (19).

Para o tratamento dos dejetos líquidos um importante método é a biodigestão anaeróbica (20). Neste procedimento micro-organismos anaeróbicos degradam a matéria orgânica transformando-a, principalmente, em biogás e em um efluente na qual ainda existe cerca de 1% de sólidos totais, que deve ser tratado para a produção de biofertilizante e reciclagem de fósforo (21,22). O biogás pode ser empregado na geração de energia elétrica ou térmica e o biofertilizante como adubo orgânico, sendo principalmente fonte de fósforo na agricultura (23). Desta forma, tem-se a geração de produtos de valor agregado, que possibilitam uma maior geração de renda na atividade suinícola e a produção sustentável, contemplando assim o aspecto ambiental, sanitário, econômico e social (24).

Diante deste cenário, objetivou-se realizar uma análise ambiental, sanitária e econômica de um sistema de tratamento de resíduos sólidos e efluentes (STRSE) em uma granja de suínos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em uma granja de suínos tecnificada de ciclo completo com 300 matrizes alojadas, localizada no município de Ibiúna (SP). O período de avaliação foi compreendido entre 02 de Janeiro a 30 de Dezembro de 2015.

Em relação ao STRSE, especificamente na geração de resíduos sólidos orgânicos (RSO) e efluentes na granja, no setor de maternidade e gestação, todos os dias ocorria à limpeza a seco, gerando desta forma RSO (dejetos e cama de serragem) passíveis de serem tratados por vermicompostagem. Os efluentes (dejetos líquidos, urina e água de consumo e de limpeza) eram produzidos em menor quantidade nestas instalações, pois a higienização com água era menos frequente. Já nos setores de creche e crescimento e terminação a limpeza era efetuada com água sob pressão todos os dias (figura 1, etapa 1). A granja apresentava telhado térmico que cobria a canaleta condutora (figura 1, etapa 2) para evitar a mistura de água pluvial com o efluente.

Os RSSA orgânicos (placentas, natimortos e animais mortos) eram tratados pelo processo de vermicompostagem. Estes RSSA juntamente com os RSO eram coletados pelos funcionários da granja todos os dias e transportados até a usina de biofertilizante (figura 1, etapa 4), onde eram armazenados em caixas de alvenaria (figura 1, etapa 4b) e piso de concreto para evitar a contaminação do lençol freático. O RSSA orgânico era misturado com o RSO em uma relação de 6:1 (25). Após 70 dias, tempo necessário para estabilização térmica do material ocorria à colocação de minhocas da espécie *Eudrilus eugeniae* e após 60 dias, todo o RSO e o RSSA orgânico estavam transformados em húmus, pronto para comercialização (26).

Os RSSA inorgânicos (seringas, agulhas, frascos de vacinas, antibióticos, ampolas de inseminação, entre outros) eram gerados em maior quantidade na maternidade e na gestação, principalmente nos dias que ocorriam os partos e as inseminações (segunda, terça e quarta-feira). Eles eram segregados semanalmente e os que apresentavam necessidade de tratamento eram submetidos a tríplice lavagem e posterior fervura, o que os tornava passíveis de serem reciclados de forma comum. Após isso, o material apto para reciclagem era conduzido para o armazenamento (figura 1, etapa 1a), para posterior encaminhamento para a cooperativa de reciclagem do município de Ibiúna-SP. O efluente originário deste procedimento era tratado pelo sistema de biodigestão anaeróbica.

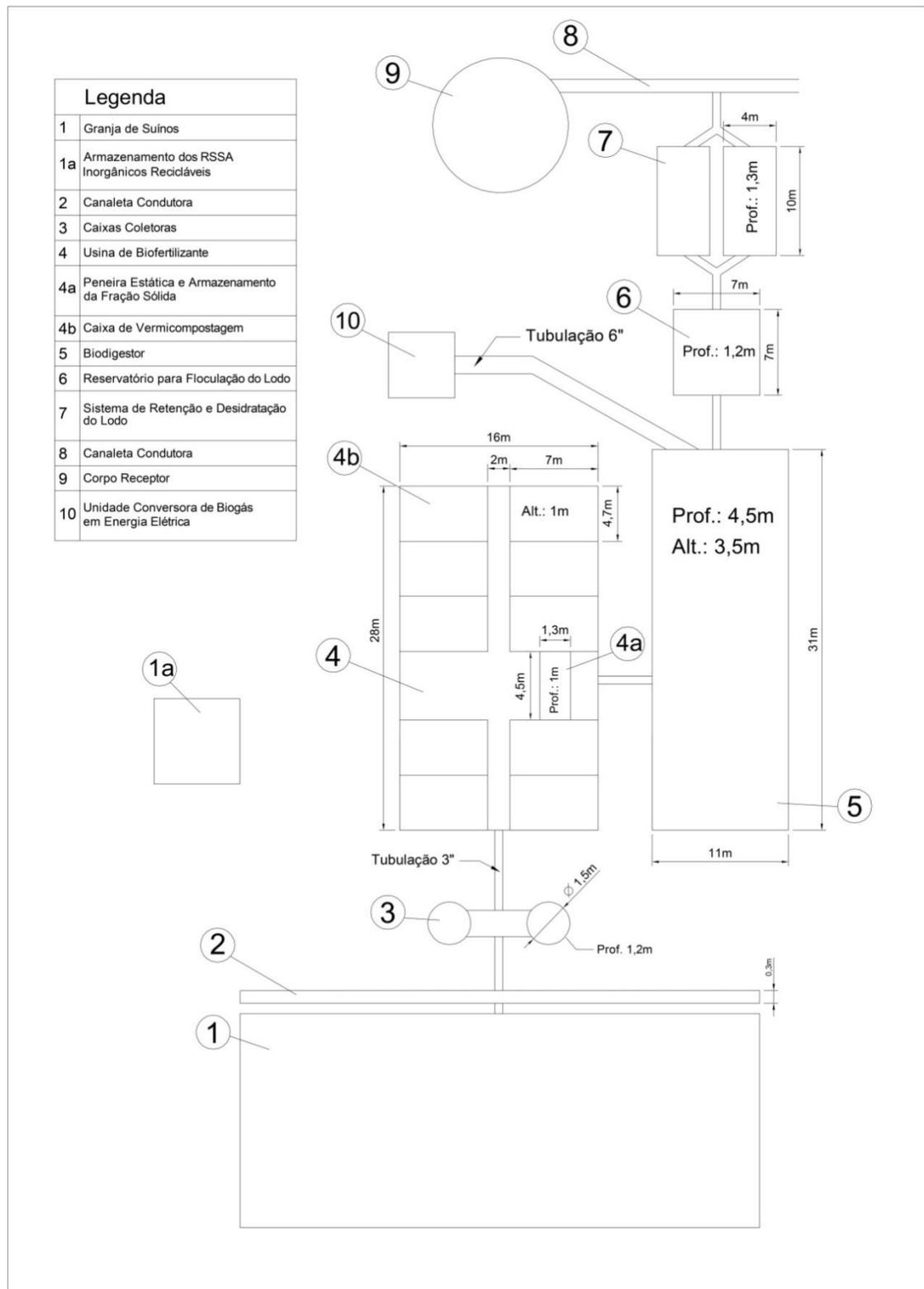


Figura 1. Representação esquemática do sistema de tratamento de resíduos sólidos e efluentes em uma granja de suínos

Os efluentes produzidos nos setores de creche, crescimento e terminação e esporadicamente da maternidade, eram tratados inicialmente pela separação da fração sólida e líquida e posteriormente por biodigestão anaeróbica. Estes eram transportados por uma canaleta condutora (figura 1, etapa 2) até as caixas coletoras (figura 1, etapa 3). Na etapa 3, os efluentes eram transportados por meio de uma bomba hidráulica autoescorvante até a usina de biofertilizante (figura 1, etapa 4). Na usina, ocorria a separação da fração sólida e líquida do efluente, em uma

peneira estática e de armazenamento da fração sólida (figura 1, etapa 4a). A fração líquida era encaminhada para o biodigestor (figura 1, etapa 5), para a produção diária e armazenamento de 700 m<sup>3</sup> de biogás. A fração sólida era encaminhada para caixas de alvenaria e submetida também ao tratamento por vermicompostagem para a produção de húmus de minhoca (figura 1, etapa 4b). O biogás era conduzido para a unidade conversora de biogás em energia elétrica (figura 1, etapa 10) e abastecia a propriedade por cerca de 10 a 12 horas/dia. O efluente originário do biodigestor era encaminhado para um reservatório com o uso de misturadores elétricos e utilização de polímeros para a floculação do lodo (figura 1, etapa 6) e após esta fase, para o sistema de retenção e desidratação do lodo constituído por *bags* de material geotêxtil (figura 1, etapa 7) e posterior produção de biofertilizante (figura 1, etapa 4b). Na fase 7, o efluente era transformado em água de reuso que era lançada em uma canaletta (figura 1, etapa 8) e posteriormente no corpo receptor (figura 1, etapa 9), onde a mesma era reutilizada para a higienização das instalações da granja.

A usina de biofertilizante era totalmente coberta com telha de fibrocimento e apresentava proteção em todo seu entorno com paredes de alvenaria e tela metálica para evitar a entrada de animais sinantrópicos e outros possíveis vetores de doenças. Este tipo de construção evitava o risco de produção de lixiviado e amplas variações de umidade do resíduo que estava sendo tratado por vermicompostagem. Ademais tal estrutura permitia conforto laboral para os funcionários.

Para a análise ambiental foram realizados testes laboratoriais, onde se avaliou parâmetros como: pH, sólidos totais, nitrogênio, fósforo e demanda química e biológica de oxigênio. Para a análise sanitária investigou-se a presença de coliformes termotolerantes.

A análise de viabilidade econômica do STRSE foi amparada na técnica de orçamento de capital (*Payback*) que quantificou o tempo em que o produtor levará para recuperar o capital investido (27). Para esta análise foi determinado o montante de capital investido no STRSE e quanto de produtos de valor agregado foram gerados no ano de 2015. Estes produtos foram: biogás convertido em energia elétrica (kWh), húmus de minhoca (tonelada) e biofertilizante (tonelada).

Para efetuar os cálculos de conversão em reais (R\$) do biogás transformado em energia elétrica, foi utilizado o valor médio cobrado por kWh/dia da concessionária do Município de Ibiúna- SP, referente ao ano de 2015, que foi de R\$ 0,25 (28). Entretanto, antes foi necessário efetuar o cálculo da quantidade de biogás que cada matriz em média, gerava por dia, posteriormente foi realizado um balanço energético, por m<sup>3</sup>, em seguida o balanço foi atualizado para tarifa de energia atual da concessionária.

O húmus de minhoca e o biofertilizante foram calculados a partir do preço médio de venda do mercado regional em 2015, que foi de R\$ 300,00 a tonelada para ambos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a análise ambiental do STRSE, os parâmetros avaliados: pH, sólidos totais, nitrogênio, fósforo e demanda química e biológica de oxigênio foram fortemente influenciados pelo STRSE, principalmente no aspecto da sua redução, o que tornou o efluente ao ser lançado no corpo receptor, incapaz de causar qualquer tipo de dano ambiental e atendeu a legislação vigente (29). O STRSE foi eficiente para sequestrar majoritariamente o gás metano, considerado cerca de 21 vezes mais poluidor que o gás carbônico (30), impedindo assim seu lançamento para a atmosfera, proporcionando a redução de lançamento de gases de efeito estufa. A transformação do RSO e RSSA (orgânico) em húmus de minhoca e do lodo em biofertilizante permitiu a produção de dois produtos com uma relação carbono nitrogênio de aproximadamente 18:1, matéria orgânica estabilizada e mineralizada e com uma elevada porcentagem de micro-organismos altamente benéficos para o solo. Tais atributos proporcionaram elevada capacidade fertilizante e de utilização pelas plantas para o seu crescimento (31) com alto valor ambiental e agrônomico.

A segregação e o tratamento dos RSSA inorgânicos no STRSE tornando-os passíveis de serem reciclados de forma comum, apesar de não ter gerado diretamente renda ao produtor, com a sua comercialização, permitiu ganhos sociais e ambientais, com o encaminhamento deste resíduo

para a cooperativa de catadores do município e eliminação do seu destino para aterro sanitário e ou incineração, reduzindo a geração de passivos ambientais (32).

Em relação à análise sanitária do STRSE, tanto o efluente que foi lançado no corpo receptor, como o húmus de minhoca e o biofertilizante apresentaram reduções superiores a 98% de coliformes termotolerantes. Duda e Oliveira (33) em uma pesquisa com reatores em batelada abastecidos com efluente suíno obtiveram valores de redução de 98,88% de coliformes termotolerantes, resultados praticamente iguais com os encontrados na presente investigação. Esta elevada capacidade de reduzir coliformes termotolerantes no STRSE assume importância ambiental e sanitária, e elege tal método como protagonista no seu tratamento satisfatório com a capacidade de mitigar impactos na saúde pública (34).

A partir da análise econômica foi possível constatar que o STRSE levará cerca de nove anos para recuperar o capital investido, o que corrobora com Westrup et al. (35) que constataram que seriam necessários 8,81 anos para recuperar o capital investido em um sistema semelhante com a geração de energia elétrica a partir do biogás proveniente dos dejetos suínos.

Embora seja um tempo significativo, o STRSE além de atingir os objetivos sanitários e ambientais, gerará continuamente produtos de valor agregado, permitindo assim a geração de renda adicional ao produtor a partir do décimo ano (16,24). Existem outros sistemas de tratamento com custos de implantação mais baixos, como é o caso das lagoas de estabilização, mas estas geram contaminação principalmente do ar, devido à produção e emissão de gases que contribuem para o efeito estufa e não geram produtos de valor agregado (36,37,38).

Outro produto gerado pelo STRSE foi a água de reuso, que para o cálculo de orçamento de capital (*Payback*) não foi quantificada em valor monetário. Entretanto, há relevância ambiental e econômica para a água de reuso, haja visto, os constantes períodos de seca e de racionamento hídrico na qual o Brasil tem passado nos últimos anos tanto na zona urbana como rural do país. A partir do tratamento do efluente após a biodigestão anaeróbica no STRSE, ainda há a possibilidade de geração de outros produtos de valor agregado, como o fósforo orgânico (39). A longo prazo, a possibilidade de geração de créditos de carbono, pode ser também viável no STRSE. Outra vantagem econômica que o STRSE proporcionou foi a melhora da imagem do empreendimento perante aos compradores, fornecedores e entidades públicas, visto que ainda a maioria dos STRSE em granjas de suínos, muitas vezes não contempla nem a etapa da biodigestão anaeróbica, o que torna o suinocultor que não investiu em sistemas de gestão ambiental, ainda mais vulnerável a oscilação de mercado da atividade suinícola. Granjas de suínos com STRSE que produzem biogás e transformam em energia elétrica para consumo próprio acabam ficando menos sensíveis as variações dos preços da energia elétrica e as possíveis faltas desta, o que invariavelmente acaba sendo mais uma vantagem econômica do STRSE avaliado.

Ressalte-se que o tempo de retorno do capital poderá variar entre granjas de tamanhos diferentes, devido ao valor investido por matriz instalada, à capacidade do STRSE e a quantidade de produtos de valor agregado produzidos.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode se concluir que o STRSE foi capaz de tratar os resíduos orgânicos e os efluentes tornando-os incapazes de causarem danos ambientais e sanitários. Em relação aos RSSA inorgânicos o STRSE, permitiu ganhos sociais e redução de passivos ambientais. No aspecto econômico, o STRSE levará cerca de nove anos para recuperar o capital investido.

## REFERÊNCIAS

1. Carvalho BV, Souza APM, Soto FRM. Avaliação de sistemas de gestão ambiental em granjas de suínos. Rev Ambiente Agua. 2015;10(1):164-71.

2. Bonamigo A, Melz MJ, Sehnem S, Wink CA. Manejo dos dejetos de suínos através do sistema de compostagem. *Rev Agronegocio Meio Ambiente*. 2014;7(3):659-81.
3. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Suínos. Brasília: MAPA; 2016.
4. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2015. São Paulo: ABPA; 2015.
5. Williams CMM. Technologies to mitigate environmental impact of swine production. *Rev Bras Zootec*. 2008;37:253-9.
6. Barbosa G, Langer M. Uso de biodigestores em propriedades rurais: uma alternativa à sustentabilidade ambiental. *Unoesc Ciencia ACSA*. 2011;2(1):87-96.
7. Meng J, Wang L, Liu X, Wu J, Brookes PC, Xu J. Physicochemical properties of biochar produced from aerobically composted swine manure and its potential use as an environmental amendment. *Bioresour Technol*. 2013;142:641-6.
8. Palhares JCP, Miranda CR. Gestão ambiental na suinocultura: gestão ambiental da propriedade suinícola. Brasília: Embrapa suínos e aves; 2007.
9. Sá MF, Aita C, Doneda A, Pujol SB, Cantú RR, Jacques IVC, et al. Dinâmica da população de coliformes durante a compostagem automatizada de dejetos líquidos de suínos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2014;66(4):1197-206.
10. Giusti L. A review of waste management practices and their impact on human health. *Waste Manag*. 2009;29(8):2227-39.
11. Silva CE, Hoppe AE. Diagnóstico dos resíduos de serviços de saúde no interior do Rio Grande do Sul. *Eng Sanit Ambient*. 2005;10(2):146-51.
12. Stefanini M, Moi PCP, Costa PX, Elias RM, Galvão ND, Silva AMC, et al. Responsabilidade sócio-ambiental do cirurgião dentista no gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde. *Rev Eletronica Connection Line*. 2013;10:2-15.
13. Silva ACN, Bernardes RS, Moraes LRS, Reis JDP. Critérios adotados para seleção de indicadores de contaminação ambiental relacionados aos resíduos sólidos de serviços de saúde: uma proposta de avaliação. *Cad Saude Publica*. 2002;18(5):1401-9.
14. Nascimento TC, Januzzi WA, Leonel M, Silva VL, Diniz CG. Ocorrência de bactérias clinicamente relevantes nos resíduos de serviços de saúde em um aterro sanitário brasileiro e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(4):415-9.
15. Marinho RC, Oliveira RMS. Avaliação da qualidade do aterro sanitário de Palmas (TO), utilizando a ferramenta índice da qualidade de aterros de resíduos – IQA. *Rev Nac Gerenc Cidades*. 2013;1(2):123-41.
16. Soto FRM, Coelho CP, Benites NR, Bonamin LV, Melville PA. Elimination of *E. coli* from piglet carcasses using an on-farm composting system. *Vet Rec*. 2010;166(18):564-5.
17. Sunada NS, Orrico ACA, Orrico Júnior MAP, Centurion SR, Oliveira ABM, Fernandes ARM, et al. Compostagem de resíduo sólido de abatedouro avícola. *Cienc Rural*. 2014;45(1):178-83.

18. Abreu PG, Pedroso-de-Paiva D, Abreu VMN, Coldebella A, Cestonaro T. Casca de arroz e palhada de soja na compostagem de carcaças de frango de corte. *Acta Sci Anim Sci*. 2011;33(1):51-7.
19. Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. Panorama dos resíduos sólidos no Brasil 2013. Abrelpe; 2013.
20. Machado NS, Silva JN, Oliveira MVM, Costa JM, Borges AC. Remoção do sulfeto de hidrogênio do biogás da fermentação anaeróbia de dejetos de suínos utilizando óxido de ferro, hidróxido de cálcio e carvão vegetal. *Rev Energ Agric*. 2015;30(4):344-56.
21. Souza CF, Santos CR, Campos JA, Mogami CA, Bressan WS. Potencial de dejetos suínos como substrato na biodigestão anaeróbia sob efeito de diferentes temperaturas e tempos de retenção hidráulica. *Rev Ceres*. 2005;52(300):255-65.
22. Suárez AG, Nielsen K, Köhler S, Morencio DO, Reyes IP. Enhancement of anaerobic digestion of microcrystalline cellulose (MCC) using natural micronutrient sources. *Braz J Chem Eng*. 2014;31(2):393-401.
23. Pereira MS, Godoy TP, Godoy LP, Bueno WP, Wegner RS. Energias renováveis: biogás e energia elétrica provenientes de resíduos de suinocultura e bovinocultura na UFSM. *Rev Eletronica Gest Educ Tecnol Ambiental*. 2015;19(3):239-47.
24. Manning DT, Hadrich JC. An evaluation of the social and private efficiency of adoption: Anaerobic digesters and greenhouse gas mitigation. *J Environ Manag*. 2015;154:70-7.
25. Maragno ES, Trombin DF, Viana E. O uso da serragem no processo de minicompostagem. *Eng Sanit Ambient*. 2007;12(4):355-60.
26. Soto FRM, Bernardi F, Camargo SR. Avaliação econômica e ambiental de sistema de tratamento de dejetos e carcaças em uma granja comercial de suínos. *Vet Zootec*. 2007;14(2):246-51.
27. Gitman LJ. Princípios de administração financeira. 10a ed. São Paulo: Pearson Education; 2004.
28. Cooperativa de Eletrificação de Ibiúna. Ibiúna: CETRIL; 2016.
29. Conselho Nacional do Meio Ambiente (BR). Resolução nº 430, de 13 de Maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente- CONAMA. Diário Oficial da União. 16 Maio 2011.
30. Whitehead DC. Grassland nitrogen. Wallingford: CAB International; 1995.
31. Montoro SB, Santos DFL, Junior JL. Análise econômica de investimentos que visam à produção de biogás e biofertilizante por meio de biodigestão anaeróbia na bovinocultura de corte. *RAUnP*. 2013;5(2):23-34.
32. Gessner R, Piosiadlo LCM, Fonseca RMGS, Larocca LM. O manejo dos resíduos dos serviços de saúde: um problema a ser enfrentado. *Cogitare Enferm*. 2013;18(1):117-23.

33. Duda RM, Oliveira RA. Reatores anaeróbios operados em batelada sequencial seguidos de lagoas de polimento para o tratamento de águas residuárias de suinocultura. Parte II: remoção de nutrientes e coliformes. *Eng Agric.* 2009;29(1):135-47.
34. Orrico Junior MAP, Orrico ACA, Lucas Junior J, Sampaio AAM, Fernandes ARM, Oliveira EA. Biodigestão anaeróbia dos dejetos da bovinocultura de corte: influência do período, do genótipo e da dieta. *Rev Bras Zootec.* 2012;41(6):1533-8.
35. Westrup G, Duarte GW, Alberton J, Niehues RC, Rocha DA, Vandresen S. Estudo da viabilidade econômica de geração de energia elétrica a partir de biogás proveniente de dejetos de suínos de uma propriedade rural em Forquilha/SC. *Revista Ciência e Cidadania.* 2015;1(1):19-37.
36. Silva PC, Amaral AA. Tratamento de dejetos suínos com biorreator UASB. *Rev Verde Agroecologia Desenvol Sustent.* 2013;8(5):141-7.
37. Santos LD, Mayerle SF, Campos LMS. Tecnologias e sistemas de tratamento para os dejetos da suinocultura. *Rev Verde Agroecologia Desenvol Sustent.* 2014;9(5):12-8.
38. Cardoso BF, Oyamada GC, Silva CM. Produção, tratamento e uso dos dejetos suínos no Brasil. *Desenvol Quest.* 2015;13(32):127-45.
39. Miele M, Silva MLB, Nicoloso RS, Corrêa JC, Higarashi MM, Kunz A, et al. Tratamento dos efluentes de usinas de biogás. *Rev Polit Agric.* 2015;24(1):31-46.

**Recebido em: 06/09/2017**

**Aceito em: 15/02/2018**

## ETIOLOGIA DAS MASTITES: PESQUISA DE MICRO-ORGANISMOS DA CLASSE *MOLLICUTES*

Bruna Churocof Lopes<sup>1</sup>  
Marcela de Pinho Manzi<sup>2</sup>  
Helio Langoni<sup>3</sup>

### RESUMO

A mastite é a principal afecção do gado destinado à produção leiteira, que onera o produtor e a indústria de laticínios. No primeiro caso pela perda quanto a produção, e no segundo pelo menor rendimento industrial dos derivados lácteos. É uma enfermidade multifatorial, de múltipla etiologia, incluindo micro-organismos como bactérias, vírus, fungos, leveduras e algas. Entre os micro-organismos bacterianos ganham destaque os estafilococos coagulase-positivos (SCP) e negativa (SCN), sendo o principal *Staphylococcus aureus* e várias espécies de SCN, todas caracterizadas como contagiosas, além de *Corynebacterium bovis*. Com elevada contagiosidade tem-se *Mycoplasma* spp., com destaque para *M. bovis* importante patógeno em outros países, entretanto, menos estudado no Brasil. O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de bactérias da classe *Mollicutes*, em amostras de leite bovino com mastite clínica, a partir de técnicas moleculares. Das 170 amostras de leite avaliadas, procedentes de quatro propriedades leiteiras de pequeno porte da região de Botucatu, não foi possível detectar a presença de *Mollicutes*.

**Palavras-chave:** mastite bovina, *Mollicutes*, PCR

## ETIOLOGY OF MASTITIS: PARTICIPATION OF MICROORGANISMS OF THE CLASS *Mollicutes*

### ABSTRACT

Mastitis is the main disease of livestock destined for dairy production, which affects the dairy producer and the dairy industry. In the first case the loss of production, and the second because of the lower industrial yield of dairy products. It is a multifactorial, multiple etiology, including microorganisms such as bacteria, viruses, fungi, yeasts and algae. *Staphylococcus aureus* and several species of SCN, all characterized as contagious, in addition to *Corynebacterium bovis*, are prominent among bacterial microorganisms (SCP) and negative (SCN) staphylococci. *Mycoplasma* spp. Is highly contagious, with *M. bovis* being an important pathogen in other countries, but less studied in Brazil. The objective of the present study was to evaluate the presence of bacteria of the class *Mollicutes* in samples of bovine milk with clinical mastitis, based on molecular techniques. Of the 170 milk samples evaluated, from four small dairy farms in the Botucatu region, it was not possible to detect the presence of *Mollicutes*.

**Key words:** bovine mastitis, *Mollicutes*, PCR

## ETIOLOGIA DE LAS MASTITIS: PARTICIPACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA CLASE *Mollicutes*

### RESUMEN

<sup>1</sup> Bolsista de IC FAPESP. Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública, FMVZ UNESP Botucatu. Contato principal para correspondência.

<sup>2</sup> Pós Graduanda - Mestrado. Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública, FMVZ UNESP Botucatu.

<sup>3</sup> Professor Titular. Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública, FMVZ UNESP Botucatu. hlangoni@fmvz.unesp.br

La mastitis es la principal afección del ganado destinado a la producción lechera, que pesa el productor y la industria láctea. En el primer caso por la pérdida en cuanto a la producción, y en el segundo por el menor rendimiento industrial de los derivados lácteos. Es una enfermedad multifactorial, de múltiple etiología, incluyendo microorganismos como bacterias, virus, hongos, levaduras y algas. Entre los microorganismos bacterianos se destacan los estafilococos coagulosa-positivos (SCP) y la negativa (SCN), siendo el principal *Staphylococcus aureus* y varias especies de SCN, todas caracterizadas como contagiosas, además de *Corynebacterium bovis*. Con una elevada contagiosidad se tiene *Mycoplasma* spp., Con destaque para *M. bovis* importante patógeno en otros países, sin embargo, menos estudiado en Brasil. El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de bacterias de la clase *Mollicutes*, en muestras de leche bovina con mastitis clínica, a partir de técnicas moleculares. De las 170 muestras de leche evaluadas, procedentes de cuatro propiedades lecheras de pequeño porte de la región de Botucatu, no fue posible detectar la presencia de *Mollicutes*.

**Palabras clave:** bovina mastitis, *Mollicutes*, PCR

## INTRODUÇÃO

A mastite é um dos principais obstáculos enfrentados na bovinocultura leiteira, pelos prejuízos econômicos levando a queda na produção de leite, e de sua qualidade, aumento do custo com tratamentos, e pelo descarte precoce de vacas que apresentam mastite crônica. Trata-se de um processo inflamatório da glândula mamária de origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica e principalmente infecciosa. É uma doença complexa, e multifatorial causada por fatores, que envolvem o ambiente, diversos patógenos e também fatores relacionados ao próprio animal (1).

Além das perdas econômicas, na produção e qualidade e do leite, é importante ressaltar a importância na saúde pública, principalmente no caso de patógenos que são fatores de risco para a infecção de humanos, tanto pela sua eliminação, bem como pela produção de toxinas pelo leite (2,3).

Além das alterações físico-químicas do leite, a mastite também altera o parênquima da glândula mamária. A inflamação apresenta-se sob duas formas: clínica e subclínica. No primeiro caso é possível observar alterações da glândula mamária, como edema, aumento de temperatura local, hiperemia, sensibilidade e enrijecimento da glândula mamária (fibrose), bem como o aparecimento de grumos, pus, sangue ou qualquer outra alteração nas características do leite. A mastite clínica ocasiona perdas elevadas pelo descarte do leite, gastos com medicamentos, perda funcional de glândulas até por morte do animal. Seu diagnóstico é possível pela avaliação das características do leite, pela prova do Tamis (4).

A mastite subclínica caracteriza-se por alterações na composição do leite, pois, este tem suas características normais. Por outro lado ocorrem alterações relacionadas ao aumento no número de células somáticas e dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura (5).

Entre os *Mollicutes* estão os micoplasmas que são as formas mais simples de organismos auto replicantes. Eles não têm a típica parede celular bacteriana e atacam diretamente a célula hospedeira para obter nutrientes essenciais (6). Hale et al. (7) relataram o primeiro caso de mastite bovina por *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*, posteriormente denominado por Aska e Erno (8) de *Mycoplasma bovis*. No Brasil, a primeira citação de mastite por *Mollicutes*, especificamente *M. bovis* foi de Mettifogo et al. (9) na região de Londrina, Estado do Paraná.

A partir do cultivo microbiológico em meio de Hayflick suplementado e adicionado de acetato de tálio a 0,01% de acordo com Whitford (10), como fator seletivo (11), Junqueira (12) trabalhando com 561 amostras de leite provenientes de casos de mastite clínica oriundas de sete estados, bem como por biologia molecular pela técnica de PCR, encontram 17 (3,03%) amostras positivas para *Mollicutes* na PCR. Com a utilização de primers específicos para *Mycoplasma bovis* todas as amostras foram positivas sendo 35,2% (n=6) provenientes do estado do Pará, 29,4% (n=5)

do estado de São Paulo, 17,6% (n=3) e 17,69% (n=3) dos estados de Minas Gerais e Goiás, respectivamente. Das 17 amostras, 11 delas foram positivas no exame microbiológico.

Salina et al. (13) examinaram 337 amostras de leite provenientes de tetos com mastite subclínica da região de Castro – PR, por PCR utilizando o método de fervura para extração do DNA de acordo com Fan et al. (14), obtiveram 130 (38,6%) de positividade para *Mollicutes*. Esses resultados tanto de casos de mastite clínica como subclínica afirmam a dispersão de micro-organismos da classe *Mollicutes*, incluindo-se *Mycoplasma bovis* na etiologia das mastites bovinas no país.

A mastite por micoplasmas caracteriza-se por aparecimento súbito, formação de secreção purulenta nos quartos afetados, rápida transmissão para o rebanho, redução significativa na produção de leite e resistência ao tratamento com antibióticos convencionais. Embora existam numerosas espécies desta classe, a mais frequente é *Mycoplasma bovis* (15), responsável por surtos esporádicos de alta contagiosidade (16). *M. bovis* pode ser introduzido em rebanhos livres da doença pela aquisição de animais portadores. No rebanho o micro-organismo dissemina-se durante a ordenha por aerossóis e secreções de animais com distúrbios respiratórios e genitais. As vias hematogena e linfática são responsáveis pela disseminação do agente de um órgão afetado para outro (17).

*M. bovis* é bem adaptado para a colonização de superfícies mucosas, onde pode persistir sem causar doença clínica. A mucosa do trato respiratório superior é o principal local de colonização do agente (17). Relatório de custos estimados nos EUA indicaram perdas de 108 milhões de dólares por ano para a indústria de laticínios (18).

A principal medida de controle das mastites por *M. bovis* é a detecção de animais infectados e o seu descarte precoce. Paralelamente, são recomendadas as medidas preventivas para as mastites contagiosas como a higiene de ordenha, imersão dos tetos em solução antisséptica antes e após a ordenha, desinfecção e manutenção dos equipamentos de ordenha (19), além da manutenção do ambiente de ordenha, e locais onde os animais são estabulados sempre limpos e higienizados, com retirada manual de fezes, lavagem e desinfecção (4).

Considerando-se a relevância desses micro-organismos na etiologia das mastites, investigou-se a presença de bactérias da classe *Mollicutes* em amostras de leite de vacas com mastite clínica, enviadas para análise microbiológica no Núcleo de Pesquisas em Mastites – NUPEMAS, no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, UNESP– Campus de Botucatu (SP), por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

## MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de leite foram coletadas, de quatro propriedades de pequeno porte (menos de 100 animais) da região de Botucatu/SP, após o processo de limpeza e desinfecção dos tetos (20) e encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites – NUPEMAS, no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, UNESP– Campus de Botucatu (SP), mantidas em temperatura de refrigeração. Foram alíquotadas em microtubos de 1,5 mL e mantidas congeladas a -20°C até o momento da extração do DNA sendo descongeladas em temperatura ambiente, até atingirem aproximadamente 20°C. Foram examinadas 170 amostras de leite provenientes de casos de mastite clínica, utilizando-se o kit comercial de extração *Blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante, e o material foi mantido congelado a -20°C até o momento da realização da PCR.

A amplificação do DNA para a classe *Mollicutes* foi feita utilizando-se os *Primers* MGSO (5' TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC 3') e GPO-3 (5' GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC 3'), com 270 pares de base (21) com perfil de ciclagem: cinco minutos a 94°C, trinta e cinco ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 min.

A visualização do material amplificado foi avaliada pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% adicionado de 0,025µL/mL de Brometo de Etídeo. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) e a voltagem empregada foi de 65V. Após o término da corrida o gel foi visualizado em transluminador de luz UV (22) e a imagem capturada pelo sistema de documentação digital.

Foram utilizados 8µL do material amplificado e como marcador de peso molecular 4 µL de 100pb ladder (invitrogen). Para todas as amostras foram acrescidos 2 µL do tampão de corrida (0,25% azul de bromophenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água Milli-Q).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizada triagem para a detecção de micro-organismos pertencentes à classe *Mollicutes*, entretanto, todas as amostras foram negativas. Em caso de positividade seria pesquisada a participação de *Mycoplasma bovis* com a utilização de primers específicos.

Nos E.U.A., a partir da cultura do leite do tanque, estima-se que 8-10% das explorações tenham pelo menos um animal com mastite causada por micoplasma (6,23,24). Esses resultados devem estar relacionados ao numero de animais dos rebanhos avaliados, pois sabe-se que a ocorrência de mastite por micoplasma é 15 vezes maior em rebanhos maiores, de alta produção (25), diferente do presente estudo, que analisou amostras de leite de casos clínicos de mastite em animais de rebanhos de pequeno porte.

Apesar dos surtos de mastite por *Mycoplasma* spp. serem provocados principalmente pela introdução de novos animais infectados nas explorações (11,24,26,27,28), alguns autores referem a possibilidade de outras vias de transmissão a partir de outros animais da propriedade, inclusive assintomáticos ou a partir de outros locais de infecção no mesmo animal, como vias respiratórias, articulações ou ouvido médio (24,29,30).

Os surtos de mastite por *Mycoplasma* spp. e *Mycoplasma bovis*, são iniciados por animais com glândulas mamárias infectadas, recém introduzidos, pertencentes ao próprio rebanho, assintomáticos. A infecção da glândula mamária poderá então ter origem na transmissão interna do agente, por via linfematogênica ou na transmissão durante a ordenha (31). Neste sentido, o controle de *Mycoplasma* spp. como agente contagioso de mastite por meio de medidas de biossegurança não é tão eficiente como para outros agentes patogênicos, existindo dados indicadores do aumento da sua incidência, preferivelmente em grandes rebanhos bovinos, com mais de 350 animais (25).

Trabalhando com amostras de leite provenientes de rebanhos de alta produção, com numero maior de animais, Junqueira (12) e Salina et al. (13) obtiveram resultados expressivos da participação de *Mollicutes* como *M. bovis*, fato que chama a atenção para a importância do diagnóstico quer seja microbiológico ou molecular, para melhorar a sensibilidade do diagnóstico de mastite.

## CONCLUSÕES

Apesar dos resultados negativos com relação a participação de *Mollicutes* nas amostras de leite avaliadas, provavelmente por tratar-se de amostras de leite de casos de mastite clínica de propriedades leiteiras de pequeno porte, novos estudos devem ser realizados considerando-se a importância desse grupo de micro-organismos, especificamente do gênero *Mycoplasma*.

## REFERÊNCIAS

1. Bressan M. Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite. Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL; 2000.
  2. Santos MC. Curso sobre manejo de ordenha e qualidade do leite. Vila Velha: UVV; 2001.
- 
- Lopes BC, Manzi MP, Langoni H. Etiologia das mastites: pesquisa de micro-organismos da classe *Mollicutes*. Vet. e Zootec. 2018 jun.; 25(2): 173-178.

3. Guimarães FF, Nobrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, De Figueiredo Pantoja JC, Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci.* 2013;96(5):2866-72.
4. Langoni H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33(5):620-6.
5. Santos MV, Fonseca LFL. Estratégias de controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri: Manole, Pirassununga: Ed Dos Autores; 2007.
6. Kirk JH, Mellenberger R. Mycoplasma Mastitis in dairy cows. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1994;16:541-58.
7. Hale HH, Helmboldt CF, Plastringe WN, Stula EF. Bovine mastitis caused by a Mycoplasma species. *Cornell Vet.* 1962;52:582-91.
8. Aska G, Erno H. Evaluation of Mycoplasma agalactiae subs. bovis to species rank Mycoplasma bovis (Hale et al.) comb nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1976;26(3):323-5.
9. Mettifogo E, Nascimento ER, Muller EE, Nascimento MGF, Freitas JC. Mastite bovina por Mycoplasma bovis. *Rev Bras Med Vet.* 1996;18(1):22-5.
10. Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH. Mycoplasmosis in animals. Ames: Iowa State University Press; 1994. p.56-61.
11. Gonzalez RN, Wilson DJ. Mycoplasma mastitis in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2003;19(1):199-221.
12. Junqueira NB. Mastite bovina por Mycoplasma spp.: dinâmica da infecção em propriedades de vacas leiteiras de alta produção [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2017.
13. Salina A, Guimarães FF, Dalanezi FM, Joaquim SF, Menozzi BD, Langoni H. Micoplasmose mamária, uma realidade nos rebanhos leiteiros: resultados preliminares. In: Anais do 7o Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite; 2017; Curitiba. Curitiba: CBQL; 2017.
14. Fan HH, Kleven SH, Jackwood MW. Application of polymerase chain reaction with arbitrary to strain identification of Mycoplasma gallisepticum. *Avian Dis.* 1995;39(4):729-35.
15. Philpot WN, Nickerson SC. Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Editora Milkbuzz; 2002.
16. Boughton E. Mycoplasma bovis mastitis. *Vet Bull.* 1979; 49:377-89.
17. Bennet RH, Jasper DE. Immunosuppression of humoral and cell mediated responses in calves associated with inoculation of Mycoplasma bovis. *Am J Vet Res.* 1977;38(11):1731-8.
18. Rosengarten R, Citti CO. Papel de Micoplasmas em ruminantes em infecção sistêmica. In: Stipkovits L, Rosengarten R, Frey J. Micoplasmas de ruminantes: patogenicidade, diagnóstico, epidemiologia e genética molecular. Bruxelas: Comissão Europeia; 1999. p.14 -7.
19. Gunning RF, Shepherd PA. Outbreak of bovine Mycoplasma bovis mastitis. *Vet Rec.* 1996;139:23-4.

20. Bramley AJ, Cullor JS, Erskine RJ, Fox LK, Harmon, RJ, Hogan JS, Nickerson SC, Oliver SP, Smith KL, Sordillo LM. Current concepts of bovine mastitis. In: Anais do 37o National Mastitis Council; 1996; Madison. Madison: NMC; 1996. p.64.
21. van Kuppveld FJM, van der Logt JTM, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:2606-15.
22. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
23. Kunkel JR. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bulk milk. *Cornell Vet.* 1985;75:398-400.
24. Fox LK, Hancock DD, Michelson A, Britten A. Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of *Mycoplasma* sp. in milk. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003;50(5):235-240.
25. Thomas CB, Willeberg P, Jasper DE. Case-control study of bovine mycoplasmal mastitis in California. *Am J Vet Res.* 1981;42:511-5.
26. Pretto LG, Müller EE, Freitas JC, Mettifogo E, Buzinhani M, Yamaguti M, et al. Mastite bovina por por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesqui Vet Bras.* 2001;21(4):143-5.
27. Bushnell RB. *Mycoplasma mastitis.* *Vet Clin North Am Large Anim Pract.* 1984;6(2):301-12.
28. Kirk JH, Lauerman LH. *Mycoplasma mastitis in dairy cows.* *Compendium.* 1994;16:541-58.
29. Mackie DP, Finlay D, Brice N, Ball HJ. Mixed *Mycoplasma mastitis* outbreak in a dairy herd. *Vet Rec.* 2000;147:335-6.
30. Lamm CG, Munson L, Thurmond MC, Barr BC, George LW. *Mycoplasma otitis in California calves.* *J Vet Diagn Invest.* 2004;16:397-402.
31. Fox LK, Kirk JH, Britten A. *Mycoplasma mastitis: a review of transmission and control.* *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005;52:153-60.

**Recebido em: 02/02/2018**

**Aceito em: 21/02/2018**

## Comitê de Avaliadores

Adelina Maria da Silva  
 Adriana Evangelista-Rodrigues  
 Ailton Vitor Pereira  
 Alan Maia Borges  
 Alessandro F. T. Amarante  
 Alexander Welker Biondo  
 Alexandre Oba  
 Alexandre Vaz Pires  
 Alice Maria M. P. Della Libera  
 Alice Fernandes Alfieri  
 Alda Lúcia Gomes Monteiro  
 Altivo José de Castro  
 Alvimar José da Costa  
 Américo G. da Silva Sobrinho  
 Ana Carolina B. C. Fonseca Pinto  
 Ana Liz Garcia Alves  
 Ana Paula F. R. L. Bracarense  
 Ana Sílvia A. M. T. Moura  
 Ana Terezinha Tavechio  
 Andrey Pereira Lage  
 Andriago Barboza de Nardi  
 Annelise de Souza Traldi  
 Antonio Carlos C. Lacrete Júnior  
 Antônio Carlos Paes  
 Antonio João Scandolera  
 Antônio Sérgio Ferraudo  
 Antonio Waldir Cunha da Silva  
 Áureo Evangelista Santana  
 Bernardete Miranda dos Santos  
 Bruna P. A. da Fonseca  
 Bruno Watanabe Minto  
 Caris Maroni Nunes  
 Carla Forte Maiolino Molento  
 Carla Lopes de Mendonça  
 Carlos Augusto A. Valadão  
 Carlos Roberto Conti Naumann  
 Carolina Madeira Lucci  
 Cassiano Victória  
 Cecílio Soares Filho  
 Célia Regina Orlandelli Carrer  
 Celso A. Rodrigues  
 Cezinande de Meira  
 Ciniro Costa  
 Cláudia Valéria S. Brandão  
 Cláudio Dias Timm  
 Cláudio Scapinello  
 Daisy Pontes Netto  
 Daniel Augusto Barroso Lessa  
 Delphim da Graça Macoris  
 Denise Botelho de O. Braga  
 Dilermando Miranda da Fonseca  
 Dirlei Antônio Berto  
 Domingos da Silva Leite  
 Edson Ramos de Siqueira  
 Eduardo Arruda T. Lanna  
 Eduardo Bagagli  
 Eduardo Francisquine Delgado  
 Eduardo Furtado Flores  
 Eduardo Harry Birgel Júnior  
 Eduardo Paulino da Costa  
 Edviges Maristela Pituco  
 Eliana Curvelo  
 Peterson Triches Dornbusch  
 Priscilla Anne Melville  
 Raimundo Souza Lopes

Eliana Roxo  
 Eunice Oba  
 Evelise Oliveira Telles  
 Fabiano Montiani Ferreira  
 Felipe Masiero Salvani  
 Fernanda da Cruz L. e Alvarenga  
 Fernando Antônio de Avila  
 Fernando Ferreira  
 Fernando Pandolfo Bortolozzo  
 Flávia de Rezende Eugênio  
 Francisco Carlos Faria Lobato  
 Francisco Leydson Formiga  
 Feitosa  
 Frederico Ozanam Papa  
 Geder Paulo Herrmann  
 Gilson Helio Toniollo  
 Gustavo Ferrer Carneiro  
 Helenice de Lima González  
 Helenice de Souza Spinosa  
 Humberto Tonhati  
 Iolanda Aparecida Nunes  
 Ivan Roque de Barros Filho  
 Ivo Wentz  
 Jackson Victor de Araújo  
 Jane Megid  
 Jean Carlos Ramos da Silva  
 Jean Guilherme F. Joaquim  
 Jener Alexandre S. Zuanon  
 João Carlos Pinheiro Ferreira  
 João Guilherme P. Filho  
 João Luiz Horácio Faccini  
 João Pessoa Araújo Júnior  
 João Ricardo Dittrich  
 José Antônio Viana  
 José Augusto B. Afonso  
 José Carlos de Andrade Moura  
 José Dantas Ribeiro Filho  
 José Domingos Guimarães  
 José Fernando Machado Menten  
 José Juradir Fagliari  
 José Laerte Nörnberg  
 José Nicolau Prospero Puoli Filho  
 José Paes de A. N. Pinto  
 José Paes de Oliveira Filho  
 José Roberto Kfoury Júnior  
 José Roberto Sartori  
 José Vasconcelos Lima Oliveira  
 Joselito Nunes Costa  
 Jovanir I. Müller Fernandes  
 Juliany Gomes Quitzan  
 Julieta Rodini Engrácia de Moraes  
 Júlio César de Freitas  
 Kátia Denise Saraiva Bresciani  
 Laerte Ferreira  
 Lara Borges Keid  
 Leandro Rodello  
 Lflían Gregory  
 Lisiane de A. Martins  
 Lissandro Gonçalves Conceição  
 Luciana Morganti Ferreira Maselli  
 Luciano José da Costa Figueiredo  
 Luiz Carlos Vulcano  
 Raphael Lúcio Andreatti Filho  
 Raquel Y. A. Baccarim  
 Raul Franzolin Neto

Luís Gustavo Corbellini  
 Luiz Alberto do Lago  
 Luiz Augusto do Amaral  
 Luiz Celso Hygino da Cruz  
 Luiz Ernani Henkes  
 Luiz Francisco Zafalon  
 Luiz Henrique de Araújo Machado  
 Magda Alves de Medeiros  
 Marcelo Beltrão Molento  
 Marcelo George Mungai Chacur  
 Marcelo Resende de Souza  
 Marcelo Vasconcelos Meireles  
 Márcia C. da Sena Oliveira  
 Márcia Marinho  
 Márcia Valéria Rizzo S. Szabó  
 Marcia Oliveira Lopes  
 Márcio Machado Ladeira  
 Marco A. F. Lopes  
 Marco Antonio Alvarenga  
 Marco Antonio Lemos de Oliveira  
 Marconi Rodrigues de Farias  
 Marcos Amaku  
 Marcos Chalhoub Coelho Lima  
 Marcos Jun Watanabe  
 Marcos Veiga dos Santos  
 Margaret Elide Genovez  
 Maria Angélica Miglino  
 Maria Cecília Rui Luvizotto  
 Maria de Lourdes R. S. da Cunha  
 Maria Denise Lopes  
 Maria Jaqueline Manprim  
 Maria Lucia Gomes Lorenço  
 Maria Lúcia Zaidan Dagli  
 Maria Luiza Delavechia  
 Maria Madalena Pessoa Guerra  
 Maria Terezinha S. Peraçoli  
 Márcia Valéria Rizzo S. Szabó  
 Maria Verônica de Souza  
 Marília Martins Melo  
 Mary Marcondes  
 Mauricio Costa Alves da Silva  
 Mayra Elena O. D'Avila  
 Assumpção  
 Milton Hissashi Yamamura  
 Mônica Vicky Bahr Arias  
 Nei Moreira  
 Nelson Carneiro Baião  
 Nelson Moraes  
 Nereu Carlos Preste  
 Nilson Roberto Benites  
 Noeme Sousa Rocha  
 Pacífico Antônio Diniz Belém  
 Paulo Alberto Lovatto  
 Paulo César Ciarlini  
 Paulo Fernando Machado  
 Paulo Francisco Domingues  
 Paulo Henrique Franceschini  
 Paulo Henrique Jorge da Cunha  
 Paulo Michel Roehe  
 Paulo Roberto Brandão  
 Paulo Roberto de Lima Meirelles  
 Paulo Roberto Rodrigues Ramos  
 Regina Kiomi Takahira  
 Renato Cesar Sacchetto Tôrres  
 Renato Silva de Sousa

Renée Laufer Amorim  
Ricardo Augusto Mendonça Vieira  
Ricardo de Oliveira Orsi  
Ricardo J. Del Carlo  
Roberta Lemos Freire  
Roberto Calderón Gonçalves  
Roberto de Oliveira Roça  
Roberto Sartori Filho  
Roberto Soares de Castro  
Rodrigo Martins Soares  
Rodrigo Otávio Silveira Silva  
Rogério de Paula Lana  
Rogério Giufrida  
Rogério Martins Amorim  
Ronaldo Lopes Oliveira  
Rosana M. O. Clark

Rosângela Zacarias Machado  
Rosangela Locatelli Dittrich  
Rubens Antônio Carneiro  
Sandra de Moraes Gimenes Bosco  
Sandra Mara Araújo Crispim  
Sebastião de Campos Valadares  
Filho  
Sergio Borges Mano  
Sheila Canavese Rahal  
Silvia M. Nishida  
Simone Baldini Lucheis  
Simone de Carvalho Balian  
Simone Tostes de Oliveira  
Sony Dimas Bicudo  
Stefano Hagen  
Stélio Pacca Loureiro Luna

Tereza Cristina C. da Silva  
Tilde Rodrigues Froes  
Valéria Marçal Félix de Lima  
Valéria Nobre L. S. Oliva  
Vamilton Alvares Santarém  
Vanerli Beloti  
Vania Maria de V. Machado  
Venício José de Andrade  
Vera Lúcia M. Hall  
Victor Cruz Rodrigues  
Virgínia Bodelão Richini Pereira  
Wagner dos Reis  
Wagner Luis Ferreira  
William Koury Filho

**REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”**  
**NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS**  
**INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

## ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

### 1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, do lado direito da página. Digitá-los, separados um por linha, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores, seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

### 2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaçamento simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen, devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

### 3. A estrutura do artigo deverá conter:

**Introdução:** Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

**Material e Métodos:** Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

**Resultados:** Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. **Fotografias** podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de **desenhos originais**, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade.

**Discussão:** Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

**Conclusões:** É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

**Referências:** Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

**Deverão** ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da

folha de identificação. Deverão também apresentar **numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página**. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

## ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, considerações finais e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

## RELATOS DE CASO

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

## COMUNICAÇÕES CURTAS

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

## REFERÊNCIAS E CITAÇÕES

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

### Exemplos

#### *Citações*

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5). Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

#### *Referências*

Indique até seis autores seguidos de et al.

### 1 Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

## **2 Organização como autor**

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

## **3 Livro**

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

## **4 Capítulo de livro**

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

## **5 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc**

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3<sup>o</sup> Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

## **6 Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos**

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

## **7 Publicações disponíveis na Internet**

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.

**JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE AND ANIMAL SCIENCE****RULES FOR PRESENTATION OF PAPERS**

The **Journal of Veterinary Medicine and Animal Science**, from School of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP, Botucatu, publishes original scientific and review papers, case reports and short communications related to Veterinary Medicine and Animal Science with semestral periodicity. The journal is open to national and/or foreign contributions (in English or Spanish) under the author's full responsibility.

Publication is conditioned to preliminary evaluation by the president of the editorial board, that analyses the merit and formal aspects of the work, according to the category of submitted paper and established editorial rules. If adequate, the article is subjected to review by two experts in the field. Opinion of reviewers are kept undisclosed. There are no possibility of identification of authors and reviewers. The articles not accepted will be returned to the authors.

Manuscripts must be submitted at the journal website <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>.

**Prof. Helio Langoni**

**Revista "Veterinária e Zootecnia"**

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu**

**18618-000 – Dist. Rubião Junior – SP – Brasil**

**INSTRUCTIONS TO AUTHORS  
SCIENTIFIC PAPERS**

Must be prepared according to the following items:

**1. Title page:**

- Title of the manuscript in Portuguese, English and Spanish, using Times New Roman font 12, simple spacing, bold and centered, with the words in upper case. When necessary, indicate the financial support as first footnote;

- Full authors names, where only the first letter of each name must be in upper case at the right side of the page. The authors' names must be typed separated by line, with numbered superscript **footnotes, which will indicate** the position and author's professional address, followed by the name of the institution where the work was done or to where it is linked;

- Name, address, telephone number, fax and e-mail address for correspondence;

- In case of involvement of human or experimental animals include the Ethics Committee approval or equivalent, and type before the bibliographic references with date of approval.

**2. Abstract in Portuguese, English, and Spanish**

- The "resumo", abstract and "resumen" must be followed by the title in the respective language and should not exceed 400 words each, with information regarding introduction, methods, results and conclusions. Text must be justified and in a single paragraph, simple spacing, beginning with the "RESUMO". Independent of the paper language, the abstract must be submitted in English, Portuguese and Spanish.

- Must include a maximum of five "palavras-chave", keywords, and palabras claves that identify the text content.

**3. The structure of the paper must include:**

**Introduction:** Clearly state the objective of the study with brief overview of the investigated problem and literature review.

**Material and Methods:** Provide a concise description of the experimental methods, variables, population in study, equipment, as well as the statistics, in sufficient detail to allow other researches to reproduce the results.

**Results:** The results should be described without interpretation and comparisons. The results may include **tables**, which should come in a separate sheet (maximum of 5 tables) and numbered consecutively in Arabic numerals, with the title on the top, according to the rules of table presentation by ABNT/WBR 6023/2000

from Associação Brasileira de Normas Técnicas, and identified in the text as Table; **figures**, in case of graphs, photographs, drawings, maps, etc, numbered consecutively in Arabic numerals (maximum of six), cited in the text as Figure. **Photographs** may be black and white or color, identified with the author's name in the back. **Original drawings** must be printed in high quality paper.

**Discussion:** Should be the interpretation of the results, relative to other relevant studies, presented in the introduction. If convenient, the results and discussion may be presented together.

**Conclusions:** The final synthesis, based on the results and discussion.

**References:** Should be presented according to Vancouver rules (<http://www.icmje.org/>), and arranged in alphabetical order, by author's last name (examples in the end of the instructions).

Manuscripts **should** be edited in Microsoft Word for Windows, for text, Excel (any version) for graphs, JPEG or GIF format (images) for photographs, drawings and maps, A4 format paper (21,0 x 29,7 cm), double spaced, leaving at least 2,5 cm margins, (lateral, top and bottom of page), Times New Roman font, size 12 and numbered in Arabic numerals, beginning in the identification page. The authors will have to present numeration in the lines, restarting the counting to each new page. Illustrations and legends must be presented on separate sheets.

Reprints will not be offered. The articles will be available in PDF format at the journal website. The same rules apply for all the other sections of the journal. The manuscripts should not exceed 15 pages. Unusual abbreviations should be used only after first time citation.

## REVIEW ARTICLES

The review articles will be published in Portuguese, English or Spanish, if it provides scientific contribution that is relevant in the area, when invited by the editors. The review articles must include: Title (Portuguese, English and Spanish), resumo with palavras-chave, abstract with key words and resúmen with palabras-claves, introduction, subject overview, conclusion e references. Must contain a maximum of 20 pages and 60 references.

## CASE REPORTS

Should not be prepared with the same structure as the articles. The case reports must present the title in Portuguese, English and Spanish, resumo with palavras-chave, abstract with keywords and resúmen with palabras claves and references. Must contain a maximum of five pages, three tables or figures and 15 references.

## SHORT COMMUNICATIONS

These are reports with new and relevant data of original studies, as preliminary results of a research. Must be presented with a maximum of five pages, one table and ten references. The structure should follow the same rules for case reports.

## REFERENCES AND CITATIONS

References should be numbered consecutively in order in which they are first mentioned in the text, tables, and legends by Arabic numbers in parentheses in same sequence. The titles of journals should be abbreviated according to the style *List of Journals Indexed in Index Medicus* available from: <http://www.nlm.nih.gov>.

### Examples:

#### *Citations*

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5). Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

#### *References*

List the first six authors followed by et al.

### 1 Journal article

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. *Vet Not.* 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. *Pesq Vet Bras.* 2008;28:597-9.

### 2 Organization as author

Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis.* 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

### 3 Book

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

### 4 Chapter in a book

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.* 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. *Produção de frangos de corte.* Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

### 5 Conference paper

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: *Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande.* Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

### 6 Dissertation

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

### 7 Electronic material on Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.

## REVISTA “VETERINARIA Y ZOOTECNIA”

### NORMAS PARA PRESENTACIÓN DE TRABAJOS

La Revista **Veterinaria y Zootecnia**, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, publica artículos científicos originales, artículos de revisión de bibliografía, estudios de caso y comunicaciones cortas, relacionadas con las áreas de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, con periodicidad semestral, en las lenguas Portugués, Español o Inglés, siendo los conceptos y opiniones emitidas, de exclusiva responsabilidad de los autores.

La publicación depende de la evaluación preliminar del Presidente del Consejo Editorial, que analiza la relevancia, y los aspectos formales, de acuerdo con la categoría del artículo sometido y las normas editoriales establecidas. Si es aprobado, se adopta el mérito de la evaluación por pares, se envía para dos Revisores, de acuerdo con el área. Los conceptos además de la imparcialidad, serán mantenidos bajo estricta reserva, sin que exista la posibilidad de identificación entre autores y evaluadores. Los artículos no publicados serán devueltos.

Los trabajos deben ser enviados pela página WEB de la revista <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>

**Prof. Helio Langoni**

**Revista “Veterinaria y Zootecnia”**

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu**

**18618-000 – Dist. Rubião Junior – SP – Brasil**

### INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

#### ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Deben ser estructurados de acuerdo con los siguientes puntos:

##### 1. Página principal, con:

- Título del trabajo en portugués, inglés y en español, tipo de letra Times New Roman, número 12, con espacio entre líneas sencillo, en negrilla y centrado, en letra mayúscula. Cuando sea necesario, indicar la entidad que financia la investigación, como primer pié de página;
- Nombres completos de los autores, en los cuales solamente la primera letra de cada nombre debe ser mayúscula, en lado derecho de la página. Digitalarlos separados un por línea, con **notas de pié** de página numeradas y en sobrescrito, **que indicarán** el cargo y la dirección profesional de los autores, seguidos de la institución donde el trabajo fue realizado o en las cuales están vinculados;
  - Nombre, dirección, teléfono, fax y correo electrónico para correspondencia.
  - En el caso de involucrar seres humanos o animales de experimentación, enviar el concepto de la Comisión de Ética o equivalente, destacando en el trabajo antes de las referencias y fecha de aprobación, así como el envío de la copia del concepto.

##### 2. Página con resumen en Portugués, Inglés y Español.

- Tanto el “resumen”, como el “abstract”, así como el resumen, deben estar seguidos del título del trabajo, en el idioma respectivo y contener, como máximo 400 palabras cada uno, con informaciones referentes a la introducción, metodología, resultados y conclusiones. El texto debe estar ajustado (justificado) y digitado en un solo párrafo y con espacio entre líneas sencillo iniciando por el “RESUMO”. El “Abstract”, y el Resumen, deben ser fiel traducción del “Resumo”. Independiente da la lengua que el artículo fue presentado deberá contener el resumen en portugués, inglés y español.
  - Deben contener como máximo, cinco “palavras-chave” “keywords”, y palabras clave que identifiquen el contenido del texto.

### 3. La estructura del artículo deberá contener:

**Introducción:** debe ser clara, objetiva y relacionada al problema investigado, y a la literatura pertinente, así como con los objetivos de la investigación. La introducción establece los objetivos del trabajo.

**Materiales y Métodos:** debe ofrecer informaciones de reproductibilidad de la investigación, de forma clara y concisa, como variables, población, muestra, equipos, o métodos utilizados, inclusive los estadísticos.

**Resultados:** Presentación de los resultados obtenidos, que deben ser descritos, sin interpretaciones y comparaciones. Podrá ser bajo la **forma de tablas**, en hojas separadas, con máximo de cinco, ordenadas en algarismos arábigos, y encabezadas por el título, de acuerdo con las normas de presentación tabular de las normas ABNT/WBR 6023/2000 de la Asociación Brasileña de Normas Técnicas, ABNT, identificadas en el texto como Tabla; bajo la **forma de figuras** en los casos de gráficos, fotografías, dibujos, mapas, etc., ordenadas en algarismos arábigos hasta un máximo de seis, y citadas en el texto como Figura. **Fotografías** pueden ser en blanco y negro o a colores; identificadas con el nombre del autor o autores al lado opuesto. En el caso de **dibujos originales**, la impresión debe ser en papel adecuado, de calidad.

**Discusión:** Debe ser entendida como la interpretación de los resultados, confrontando la literatura pertinente, descrita en la introducción. De ser conveniente los resultados y discusión podrán ser presentados conjuntamente.

**Conclusiones:** Es la síntesis final, fundamentada en los resultados y en la discusión.

**Referencias:** Deben ser presentadas de acuerdo con las normas de Vancouver (<http://www.icmje.org/>), y el arreglo organización debe ser en orden alfabético por apellido del autor (modelos anexos al final).

**Deberán** ser editados en Microsoft Word for Windows, para edición de textos, Excel (cualquier versión) para gráficos, formato JPEG o GIF (imagen) para fotografías, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), a doble espacio, manteniendo márgenes de 2,5 cm, en las laterales, parte superior e inferior de cada página, fuente Times New Roman, número 12 y numeración consecutiva de las páginas en números arábigos, a partir de la hoja de identificación. Deverán presentar también la numeración en las líneas, recomenzando la cuenta a cada página nueva. Ilustraciones y leyendas deben ser presentadas en hojas separadas.

No se ofrecerán separatas. Los artículos estarán disponibles en el formato PDF en la página WEB de la revista. Para las demás secciones de la revista son válidas las normas anteriores. No deben exceder las 15 páginas. Abreviaturas no usuales, deben ser empleadas después de haber sido escritas por extenso en la primera utilización.

## ARTÍCULOS DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los artículos de la revisión bibliográfica serán publicados en los idiomas portugués, inglés y español, cuando el autor presente contribución científica, importante en el área específica del asunto abordado, y por invitación de los editores.

Deberán contener: Título (portugués, inglés y español), resumen con palavras-chave, abstract con keywords e resumen con palabras claves, introducción, desarrollo del tema, conclusión y referencias. Deberán contener como máximo 20 páginas y 60 referencias (citas bibliográficas).

## ESTUDIOS DE CASO

No deben ser subdivididos, como para los artículos. Deben presentar el título en portugués, en inglés y español, resumen con palavras-chave, abstract con key words e resumen con palabras-claves y referencias. Deben contener como máximo cinco páginas, tres tablas o figuras y 15 referencias bibliográficas.

## COMUNICACIONES CORTAS

Son relatos con datos inéditos y relevantes de estudios originales, como por ejemplo resultados preliminares de una investigación. Deben ser presentados como máximo en cinco páginas, una tabla y 10 referencias bibliográficas. La estructuración debe respetar las normas para estudios de caso.

## REFERENCIAS E CITACIONES

Numerar las referencias consecutivamente según el orden en que se mencionen por primera vez en el texto. En éste, en los cuadros y leyendas, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Abreviar los títulos de las revistas según *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponible en: <http://www.nlm.nih.gov>.

### Ejemplos

#### *Citations*

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

#### *Referencias*

Mencionan los seis primeros autores seguidos de la abreviatura et al.

### 1 Artículo de periódico

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

### 2 Organización como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

### 3 Libro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

### 4 Capítulo en libro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

### 5 Ponencias o conferencias en simposio, congreso, reuniones, etc .

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3<sup>o</sup> Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

## 6 Tesis

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

## 7 Medios electrónicos en Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.