

Veterinária e Zootecnia

Vet e Zootec.

2017 março; 24(1): 001-237

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
18618-970 – Dist. Rubião Jr. – Botucatu – SP – Brasil
Portal: <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>
E-mail: vetzootecnia@fmvz.unesp.br
Tel. +55 14 3880 2094

Publicação trimestral
Solicita-se permuta / *Exchange desired*
Biblioteca do Campus de Botucatu
18618-970 – Distrito de Rubião Júnior – 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. 24, n.1, mar. (2017)
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

Prof^ª. Dr^ª. Gladis Massini-Cagliari

Pró-Reitor de Extensão Universitária

Prof^ª. Dr^ª. 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
2017

EXPEDIENTE**Comissão Editorial**

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

Assessoria Técnica

Editoração Eletrônica: José Luis Barbosa de Souza, Wellington Ricardo Guerra

Normalização Bibliográfica: Rinaldo José Ortiz

Revisor – Espanhol: Selene Daniela Babboni (FMVZ – UNESP/Botucatu)

Secretaria: Apoio: Wellington Ricardo Guerra

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”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

18618-970 - Dist. Rubião Junior, s/n – 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	
DIAGNOSTIC METHODS FOR THE DETECTION OF LEPTOSPIRA SPP. IN BIOLOGICAL SAMPLES / MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A DETECÇÃO DE LEPTOSPIRA SPP. EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS / MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DE LEPTOSPIRA SPP. EN MUESTRAS BIOLÓGICAS. Helio Langoni, Leila Sabrina Ullmann, Virgínia Bodelão Richini-Pereira, Luciana da Silva Ruiz, Gabriela Pacheco Sánchez, Simone Baldini Lucheis	11
SOME NOTES OF MULLET (<i>Mugil liza</i>, Valenciennes, 1836) FISHING IN BRAZIL: HISTORY AND TRADITION / ALGUMAS NOTAS SOBRE A PESCA DA TAINHA (<i>Mugil liza</i>, Valenciennes, 1836) NO BRASIL: HISTÓRIA E TRADIÇÃO / ALGUNAS NOTAS SOBRE LA PESCA DE LA TAINHA (<i>Mugil liza</i>, Valenciennes, 1836) EN BRASIL: HISTORIA Y TRADICIÓN. Simone de Carvalho Balian, Werner Souza Martins, Naassom Almeida Souza Ribeiro.....	21
CRIOCIRURGIA: EFEITOS E COMPLICAÇÕES PÓS-TRATAMENTO / CRYOSURGERY: EFFECTS AND POST TREATMENT COMPLICATIONS / CRIOCIRURÍA: EFECTOS Y COMPLICACIONES DESPUÉS DEL TRATAMIENTO. Carolina Malburg, Vinicius Gonzalez Peres Albernaz, Jorge Luiz Costa Castro.....	35
PROCESSO CARCINOGENÉTICO DAS PRÓSTATAS CANINAS: VIA WNT CANÔNICA E SEU ESTUDO COMPARADO / CARCINOGENIC PROCESS OF CANINE PROSTATE: WNT CANONICAL PATHWAY AND ITS COMPARATIVE STUDY / PROCESO CARCINOGENICO DE LAS PRÓSTATAS CANINAS: VIA WNT CANÓNICA Y SU ESTUDIO COMPARADO. Priscila Emiko Kobayashi, Carlos Eduardo Fonseca-Alves, Luis Gabriel Rivera-Calderón, Renée Laufer-Amorim	49
VESÍCULAS EXTRACELULARES: UMA FORMA DE COMUNICAÇÃO INTRAFOLICULAR / EXTRACELLULAR VESICLES: A FORM OF INTRAFOLLICULAR COMMUNICATION / VESÍCULAS EXTRACELULAR: UNA FORMA DE COMUNICACIÓN INTRAFOLLICULAR. Felipe Morales Dalanezi, Fernanda Fagali Franchi, Patrícia Kubo Fontes, Anthony César de Souza Castilho, João Carlos Pinheiro Ferreira.....	60
AÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NOS ESPERMATOZOÍDES / ACTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ON SPERMATOOA / ACCIÓN DE OXÍGENO EN ESPECIES REACTIVAS ESPERMATOZOÍDES. Priscila Emiko Kobayashi, Carlos Eduardo Fonseca-Alves, Luis Gabriel Rivera-Calderón, Renée Laufer-Amorim.....	70
PRINCIPAIS ZONÓSES EM PEQUENOS ANIMAIS: BREVE REVISÃO / PRINCIPAL ZONÓSES IN SMALL ANIMALS: A BRIEF REVIEW / ZONÓSIS PRINCIPALES EN PEQUEÑOS ANIMALES: UNA BREVE REVISIÓN. Mayra de Castro Ferreira Lima, Joyce Cappa Mittestainer, Paula Barreto da Rocha, Elisabeth Regina de Carvalho, Barbara do Prado Verotti, Patricia Rosa Pellicciari, Cassiano Victoria, Helio Langoni	84
RELATOS DE CASO/CASE REPORTS/ESTUDIOS DE CASO	
AGENESIA EM FELINOS DOMÉSTICOS: ESTUDO RETROSPECTIVO DE DIAGNÓSTICO NO HCV-UFPEL / AGENESIS IN DOMESTIC CATS: DIAGNOSTIC RETROSPECTIVE STUDY IN HCV-UFPEL / AGENESIA EN GATOS DOMÉSTICOS: ESTUDIO RETROSPECTIVO DIAGNÓSTICO EN EL HCV-UFPEL. Gabriela de Almeida Capella, Stella Falkenberg Rausch, Taiane Rita Carnevali, Claudia Giordani, Luiz Paiva Carapeto, Marlete Brum Cleff.....	107

DOENÇA DE VON WILLEBRAND TIPO 1 GRAVE EM CÃO DA RAÇA SÃO BERNARDO – APRESENTAÇÃO CLÍNICA E PERFIL DE HEMOSTASIA / TYPE 1 VON WILLEBRAND DISEASE IN ST. BERNARD DOG - CLINICAL PRESENTATION AND HEMOSTASIS PROFILE / ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND DE TIPO 1 EN UN PERRO DE LA RAZA DE SAN BERNARDO - PRESENTACIÓN CLÍNICA Y EL PERFIL DE LA HEMOSTASIA. Magnus Larruscaim Dalmolin, Camila Serina Lasta, Luciana de Almeida Lacerda, Vanessa Camargo, Mariana Loner Coutinho, Itabajara da Silva Vaz Junior114

PRIMARY RENAL LYMPHOMA IN DOMESTIC CAT (*Felis catus*): CASE REPORT / LINFOMA RENAL PRIMÁRIO EM GATO DOMÉSTICO (*FELIS CATUS*): RELATO DE CASO / LINFOMA RENAL PRIMARIO EN GATO DOMÉSTICO (*FELIS CATUS*): REPORTE DE CASO. Igor Mansur Muniz, Evelyn Rabelo Andrade, Patricia Regina Voigt.....120

FIBROMA VAGINAL EM CADELA (*Canis familiaris*) - RELATO DE CASO / VAGINAL FIBROMA IN BITCH (*Canis familiaris*) - CASE REPORT / FIBROMA VAGINAL EN PERRA (*Canis familiaris*) – REPORTE DE CASO. Igor Mansur Muniz, Evelyn Rabelo Andrade.....125

ATROPHY OF THE SUPRA AND INFRASPINATUS MUSCLES DUE TO INJURY OF THE SUPRASCAPULAR NERVE IN HORSE (SWEENY) / ATROFIA DOS MÚSCULOS SUPRA E INFRA ESPINHOSO POR LESÃO DO NERVO SUPRAESCAPULAR EM EQUINO (SWEENY) / ATROFIA DE LOS MÚSCULOS SUPRA Y INFRAESPINOSO DEBIDO LESIONES EN EL NERVO SUPRAESCAPULAR EN EQUINO (SWEENY). Joandes Henrique Fontequê, Anderson Fernando de Souza, Thiago Rinaldi Muller, Jackson Schade, Paulo Eduardo Ferian.....130

COMUNICAÇÃO CURTA/ SHORT COMMUNICATION/ COMUNICACIÓN CURTA

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DE TEMPERATURA COMO MÉTODO DE ESTUDO DA MICROBIOTA CECAL DE FRANGOS DE CORTE / EVALUATION OF THE TEMPERATURE GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS AS STUDY METHOD OF THE BROILER CHICKEN CECAL MICROBIOTA / EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DE TEMPERATURA COMO UN MÉTODO DE ESTUDIO DE LA MICROBIOTA CECAL DE POLLOS DE ENGORDE. João Carlos Zamae Rodrigues, Adriano Sakai Okamoto, Josias Rodrigues, Tarcísio Macedo, Raphael Lúcio Andreatti Filho.....135

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE EQUINOS DA RAÇA PANTANEIRA SUBMETIDOS A CAVALGADA TURÍSTICA / EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF PANTANEIRO HORSES UNDERGOING TOURIST RIDE / EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE CABALLOS PANTANEIROS SOMETIDOS A CABALGADA TURÍSTICA. Denise Senna, Michele Angelo Luiz, Felipe Gomes Ferreira Padilha, Ana Beatriz M Fonseca, Regina de Cássia Veronezi, Ana Maria Reis Ferreira140

ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS

COLINA PROTEGIDA DA DEGRADAÇÃO RUMINAL E SEU EFEITO NA PREVENÇÃO DA TOXEMIA DA GESTAÇÃO EM OVELHAS LEITEIRAS / RUMEN PROTECTED CHOLINE AND ITS EFFECT ON THE PREVENTION OF PREGNANCY TOXEMIA IN DAIRY EWES / COLINA PROTEGIDA DE LA DEGRADACIÓN RUMINAL Y SU EFECTO EN LA PREVENCIÓN DE LA TOXEMIA DE LA GESTACIÓN EN OVEJAS LECHERAS. Andressa Elaine Michailoff, Dom Diego Dall Agnol, Anderson Elias Bianchi, Fabiano Samuel Balistieri, Eliana Lucia Fiorentin, Ricardo Xavier Rocha, Jose Francisco Manta Bragança144

- SOROPREVALÊNCIA PARA ANTICORPOS ANTI-TOXOPLASMA GONDII (NICOLLE & MANCEAUX, 1909) EM OVINOS PERTENCENTES À MICRORREGIÃO DE UMUARAMA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL / SEROPREVALENCE FOR ANTIBODIES AGAINST TOXOPLASMA GONDII (NICOLLE AND MANCEAUX, 1909) IN OVINE FROM THE MICROREGION OF UMUARAMA, STATE OF PARANÁ, BRAZIL / SUEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA TOXOPLASMA GONDII (NICOLLE Y MANCEAUX, 1909) EN OVINOS PERTENECIENTES A LA MICROREGIÓN DE UMUARAMA, ESTADO DE PARANÁ, BRASIL.** Wellington Augusto Senhorini, Daniela Barbosa Silva, Hélio Langoni, Gisela Cristiano Ferraro, Raquel Reis Martins, Welber Daniel Zanetti Lopes.....151
- PROTEINOGRAMA DE OVELHAS ACOMETIDAS POR CASOS NATURAIS DE TOXEMIA DA PREENHEZ / PROTEIN PROFILE IN EWES AFFECTED BY NATURAL PREGNANCY TOXEMIA / PROTEINOGRAMA DE OVEJAS AFECTADAS POR CASOS NATURALES DE TOXEMIA DE LA PREENHEZ.** Alexandre Tadeu Mota Macedo, Rodolfo José Cavalcanti Souto, Carla Lopes de Mendonça, José Jurandir Fagliari, Paulo César Silva, Pierre Castro Soares, José Augusto Bastos Afonso.....159
- LEVANTAMENTO DA FAUNA DE MORCEGOS COM PESQUISA DO VÍRUS RÁBICO DOS MUNICÍPIOS DA 10ª REGIÃO ADMINISTRATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO, NO ANO DE 2013 / STUDY OF THE BAT FAUNA AND RABIES VIRUS RESEARCH OF CITIES OF ADMINISTRATIVE REGION OF THE 10th SÃO PAULO STATE, IN 2013 YEAR / ESTUDIO DE LA FAUNA DE MURCIÉLAGOS CON PESQUISA DEL VIRUS DE LA RABIA DE LOS MUNICIPIOS DE LA 10ª REGIÓN ADMINISTRATIVA EN EL ESTADO DE SAO PAULO, EN EL AÑO 2013.** Avelino Albas, Luiza C. S. Rodenas, Cristiano de Carvalho, Wagner A. Pedro, Rogério Giuffrida, Hermann B. Neto.....174
- ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE FÍGADOS BOVINOS CRIADOS NA ILHA DE MARAJÓ, ESTADO DO PARÁ, CONDENADOS PELO SERVIÇO DE INSPEÇÃO ESTADUAL / ASPECTS OF ANATOMOPATHOLOGY OF LIVER CATTLE RAISED ON MARAJO ISLAND, PARA STATE, CONDEMNED BY STATE INSPECTION SERVICE / CARACTERÍSTICAS ANATOMO PATOLOGICAS DE LOS HÍGADOS DE BOVINOS CRIADOS EN LA ISLA DE MARAJÓ, ESTADO DE PARÁ, CONDENADOS POR EL SERVICIO DE INSPECCIÓN DEL ESTADO.** Djacy Barbosa Ribeiro, Rogério Tortelly, Washington Luiz Assunção Pereira, Suellen da Gama Barbosa Monger, Ana Sílvia Sardinha Ribeiro.....184
- PERFIL PARASITOLÓGICO DE MAMÍFEROS SILVESTRES CATIVOS / PARASITOLOGICAL PROFILE OF CAPTIVE WILD MAMMALS / PERFIL PARASITOLÓGICO DE LOS MAMÍFEROS SILVESTRES CAUTIVOS.** Alessandra Snak, Kira Maria Agostini, Paola Fernanda Lenzi, Cleuza Rocha Montanucci, Luis Eduardo Delgado, Marivone Valentim Zabott193
- BLOOD VARIABLES OF HYBRID TAMBACU FARMED IN AMAPÁ STATE, NORTHERN BRAZIL / VARIÁVEIS SANGUÍNEAS DO HÍBRIDO TAMBACU CULTIVADO NO ESTADO DO AMAPÁ, NORTE DO BRASIL / VARIABLES DE LA SANGRE EN HYBRIDO TAMBACU CULTIVADO EN EL ESTADO DE AMAPÁ, NORTE DE BRASIL.** Eliane Tie Oba-Yoshioka, Rafaella Costa, Moacir Borges, Marcos Tavares-Dias.....201
- IMPORTÂNCIA DA DIFERENCIAÇÃO DOS STREPTOCOCCUS AGALACTIAE E NÃO AGALACTIAE NAS MASTITES / IMPORTANCE OF DIFFERENTIATION OF STREPTOCOCCUS AGALACTIAE AND NOT AGALACTIAE IN THE MASTITIS / IMPORTANCIA DE LA DIFERENCIACIÓN DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE Y NO AGALACTIAE EN LA MASTITIS.** Anelise Salina, Nathália Brancato Junqueira, Giulia Soares Latosinski, Gabriela Capriogli Oliveira, Sâmea Fernandes Joaquim, Renata Bonini Pardo, Helio Langoni209

Leishmania infantum (syn. chagasi) INFECTION IN CATS FROM A BRAZILIAN SOUTHEASTERN ENDEMIC AREA FOR CANINE AND HUMAN LEISHMANIASIS / INFEÇÃO POR *Leishmania infantum* (syn. chagasi) EM GATOS PROVENIENTES DE UMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE CANINA E HUMANA, NA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL / LA INFECCIÓN POR *Leishmania infantum* (syn. chagasi) EN LOS GATOS DE UNA ZONA ENDÉMICA PARA LEISHMANIASIS CANINA Y HUMANA EN EL SURESTE DE BRASIL. Luciana C Baldini-Peruca, Simone Baldini Lucheis, Rozeani O Tome, Virgínia Bodelão Richini-Pereira, Ana Paula F. L. Correa, Marcella Z Troncarelli, Rodrigo Costa da Silva, Helio Langoni216

EDITORIAL

A CORRIDA PARA A VISIBILIDADE INTERNACIONAL

A preocupação para que a pesquisa brasileira alcance ampla visibilidade internacional vem sendo pauta das agências de fomento, das Universidades e da CAPES. Para tanto, os pesquisadores brasileiros têm tentado publicar resultados de suas pesquisas em revistas de impacto no exterior o que garante a internacionalização, indiscutivelmente relevante para as Instituições de Pesquisa e Universidades brasileiras. Temos melhorado muito, avançado, mas ainda estamos aquém do ideal. Não adianta somente querer, há necessidade de recurso financeiro, pois publicar no exterior e mesmo no Brasil em boas revistas tem ficado cada vez mais caro. Os recursos são escassos e temos que nos quotizar entre os autores e dividir os custos. Quando se publica menos fica mais fácil, entretanto, quando se lidera um grande grupo, o número de publicações claro que é maior e as coisas ficam difíceis.

Publicar na base de dados da empresa Thomson Reuters, facilitando a citação em outras publicações é o que todo pesquisador deseja, entretanto, nem sempre é o que ocorre, pois, a originalidade de um artigo não é suficiente para gerar citações. O que ajuda muito é quando o artigo envolve assunto em efervescência. Há artigos que revelam a contribuição do país no desenvolvimento de novas terapias e outros que repercutem entre o público leigo. Espera-se que ocorra uma mudança nesse perfil e que resultados de pesquisas de qualidade científica possam ser publicados no exterior, entretanto, há custos com avaliação do inglês que muitas revistas exigem e que sejam utilizados profissionais que fazem parte de seus revisores e também recursos para submissão e publicação.

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: Diagnostic methods for the detection of *Leptospira* spp. in biological samples; Some notes of mullet (*Mugil liza*, valenciennes, 1836) fishing in brazil: history and tradition; Criocirurgia: efeitos e complicações pós-tratamento; Processo carcinogênico das próstatas caninas: via WNT canônica e seu estudo comparado, vesículas extracelulares: uma forma de comunicação intrafolicular; Ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides; Principais zoonoses em pequenos animais: breve revisão. Os relatos de caso: Agenesia em felinos domésticos: estudo retrospectivo de diagnóstico no HCV-UFPEL; Doença de von Willebrand tipo 1 grave em cão da raça são bernardo – apresentação clínica e perfil de hemostasia; Primary renal lymphoma in domestic cat (*Felis catus*): case report; Fibroma vaginal em cadela (*Canis familiaris*) - relato de caso; Atrophy of the supra and infraspinatus muscles due to injury of the suprascapular nerve in horse (sweeny). As comunicações curtas: Avaliação da técnica de eletroforese em gel com gradiente de temperatura como método de estudo da microbiota cecal de frangos de corte; Avaliação dos parâmetros fisiológicos de equinos da raça pantaneira submetidos a cavalgada turística. Os artigos originais: Colina protegida da degradação ruminal e seu efeito na prevenção da toxemia da gestação em ovelhas leiteiras; Soroprevalência para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) em ovinos pertencentes à microrregião de Umuarama, estado do Paraná, Brasil; Proteinograma de ovelhas acometidas por casos naturais de toxemia da prenhez; Levantamento da fauna de morcegos com pesquisa do vírus rábico dos municípios da 10ª região administrativa do estado de São Paulo, no ano de 2013; Aspectos anatomopatológicos de fígados bovinos criados na Ilha de Marajó, estado do Pará, condenados pelo serviço de inspeção estadual; Perfil parasitológico de mamíferos silvestres

cativos; Blood variables of hybrid tambacu farmed in Amapá state, northern Brazil; Importância da diferenciação dos *Streptococcus agalactiae* e não *agalactiae* nas mastites; *Leishmania infantum* (syn. chagasi) infection in cats from a brazilian southeastern endemic area for canine and human leishmaniasis.

Prof. Helio Langoni
Editor-Chefe

DIAGNOSTIC METHODS FOR THE DETECTION OF *LEPTOSPIRA* SPP. IN BIOLOGICAL SAMPLES

Helio Langoni¹
Leila Sabrina Ullmann¹
Virgínia Bodelão Richini-Pereira²
Luciana da Silva Ruiz²
Gabriela Pacheco Sánchez³
Simone Baldini Lucheis³

ABSTRACT

Leptospirosis is a bacterial zoonoses distributed worldwide. It can undertake any animal species, maintaining the agent in the nature via renal chronic infection of carriers animals, which can secrete the organism through the urine into the environment, being able to infect other animals and the human. Regarding *Leptospira* spp., diagnostic techniques have helped understand important eco-epidemiological aspects such as environmental serovar distribution and new hosts, in addition to improve the clinical diagnosis of the disease. This review focuses on present diverse techniques used in leptospirosis diagnosis to biological samples, including some studies on practical applications for the molecular detection of *Leptospira* spp., reinforcing the importance of the knowledge and the choice of the correct technique in the diagnosis of the disease.

Keywords: *Leptospira*, leptospirosis, diagnosis.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A DETECÇÃO DE *LEPTOSPIRA* SPP. EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

RESUMO

Leptospirose é uma zoonose bacteriana distribuída mundialmente. Pode acometer qualquer espécie animal, mantendo o agente na natureza via infecção crônica renal de animais carreadores, os quais excretam os organismos pela urina no meio ambiente, podendo infectar outros animais e humanos. Em relação à *Leptospira* spp., as técnicas diagnósticas têm auxiliado na compreensão de aspectos eco-epidemiológicos importantes tais como a distribuição ambiental dos sorovares e novos hospedeiros, além de aprimorar o diagnóstico na clínica da doença. A revisão tem como objetivo apresentar as diversas técnicas utilizadas no diagnóstico da leptospirose em amostras biológicas, incluindo alguns estudos sobre aplicações práticas da detecção molecular de *Leptospira* spp., reafirmando assim a importância do conhecimento e da escolha das técnicas corretas no diagnóstico da doença.

Palavras-chave: *Leptospira*, leptospirose, diagnóstico.

¹ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ-UNESP-Botucatu. Correspondência.

² Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratórios Regionais CLR Bauru II, Instituto Adolfo Lutz

³ APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DE *LEPTOSPIRA* SPP. EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

RESUMEN

Leptospirosis es una zoonosis bacteriana distribuida en todo el mundo. Puede afectar a cualquier especie animal, manteniendo el agente en la naturaleza a través de la infección renal crónica en los animales portadores, que excretan los microorganismos en el ambiente mediante la orina y pueden infectar a otros animales y el hombre mismo. Acerca de *Leptospira* spp., técnicas de diagnóstico han ayudado en la comprensión de los aspectos eco-epidemiológicos importantes como la distribución ambiental de los serotipos y nuevos huéspedes, y mejorar el diagnóstico clínico de la enfermedad. Esta revisión tiene como objetivo presentar las diferentes técnicas utilizadas en el diagnóstico de la leptospirosis en muestras biológicas, incluyendo algunos estudios sobre las aplicaciones prácticas de detección molecular de *Leptospira* spp., reafirmando la importancia del conocimiento y la elección de las técnicas adecuadas en el diagnóstico de la enfermedad.

Palabras-clave: *Leptospira*, leptospirosis, diagnóstico.

INTRODUCTION

Leptospirosis is considered a zoonosis of worldwide distribution, present in all continents, except Antarctica (1), with great importance among the diseases considered as emerging and re-emerging (2). In addition, over 853,000 cases and 48,000 deaths are estimated to occur each year (3). It occurs endemically or as outbreaks affecting humans in several developing or developed countries, especially those of tropical and subtropical climate (4). In Brazil, leptospirosis is endemic and considered a serious public health problem, with 37,035 cases notified from 1999 to 2009 (5). The mortality rate of Weil's disease (severe form) and severe pulmonary hemorrhagic syndrome is >10% and 74%, respectively (6).

Leptospirosis is caused by bacteria of the order Spirochetales, family Leptospiraceae, genus *Leptospira*, and they are classified in three groups according to their phylogenicity and pathogenicity (7). During the meeting of the Subcommittee on Taxonomy carried out in 2007 in Quito, Ecuador, the leptospire species were reclassified and divided into 13 pathogenic species (*L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. wielli* and *L. wolffii*) and six saprophytic species (*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* and *L. wolbachii*) (1).

The different species are classified into serogroups composed of over 200 pathogenic and 60 non-pathogenic serovars. These serogroups are based on antigenic features (8) by the expression of epitopes exposed at the surface as a mosaic of LPS antigens, while the specificity of epitopes depends on the composition and display of their sugars (1). Serotyping has been recognized as an essential tool in clinical and epidemiological investigations and may indicate the reservoir involved in transmission (8).

This disease can be transmitted directly by the contact with blood or urine of infected animals or indirectly by the contact with water contaminated with the urine of carrier animals (9). It affects almost all domestic and wild mammals, as well as men, leading or not to clinical manifestation. Most wild species can become carriers and contribute to the spread of *Leptospira* in nature (10-12).

Serological studies have shown different wild synanthropic species of the orders Didelphimorphia and Rodentia as potential disseminators of different leptospire serovars in the environment (13). Although some serovars are associated with a certain reservoir, all

animals are susceptible to infection by any of the serological variants (8). That makes early diagnosis an important tool to treat ill animals, improving prognosis, and to identify wild carrier animals and sources of infection for domestic animals and humans.

LABORATORY DIAGNOSIS

The laboratory diagnosis of leptospirosis can be made by serological tests, isolation of the agent or molecular survey of the bacterial genetic material (14).

The currently available biomolecular technologies provide powerful tools for the detection and identification of leptospire species (pathogenic or saprophytic), in addition to the early diagnosis in situations of absence of immune response. These techniques have great advantages compared to the traditional approaches of culture and serological methods, such as rapidity, practicality and sensitivity; however, the classic methods cannot be substituted since they are the only means for identifying the serovar responsible for the infection (14), which constitutes important data in epidemiological studies.

IMMUNOLOGICAL METHODS

The microscopic agglutination test (MAT) or Martin and Pettit test was developed almost one century ago at the Pasteur Institute (15). This is the standard test in the laboratory diagnosis of leptospirosis. The principle of this technique is the reaction of agglutination between antibodies present in the sera of hosts and the antigen-O of lipopolysaccharides (LPS) at the membrane of leptospire (16). It is an indirect assay which does not differentiate antibodies resultant of infection from those of vaccination (1) nor the disease phase; and the antibody levels are detectable only between seven and ten days after infection, which may impair the patient prognosis. Confirmation of a case of leptospirosis by the MAT requires two samplings made two weeks apart, with sero-conversion or significant increase of the antibody titers (7).

Immunoenzymatic assay (ELISA), developed in the 1980's has been widely used in research and some screening programs. ELISA IgM methods are available for presumptive diagnosis, but they are not sufficient to diagnose a case of leptospirosis; it must be confirmed by MAT, PCR, or culture (14).

Several other tests may be used to screen antibodies including macro-agglutination, complement fixation reaction, indirect immunofluorescence, hemagglutination, and latex bead agglutination tests (17).

Recently, immuno-chromatographic strip tests "Lateral flow assays" have been developed in various laboratories; these tests use a membrane coated with total cellular extract or with a protein used to capture antibodies targeting leptospire when a drop of sampled blood is deposited. The antibody capture is visualized by a reaction with a colorimetric detection agent (a colloidal gold conjugate of protein-A) after migration of antigen-antibody complexes by capillarity (18). More recently in Thailand, one study demonstrated the use of anti LipI-32 coupled with gold nanoparticles in an immuno-chromatographic test for detection of *Leptospira interrogans* (19). Another study performed in Japan developed this technique for antigen detection in *Leptospira* spp., which could be applied in areas where leptospirosis infection is endemic and is applicable for detecting antigen in urine samples (20).

MICROBIOLOGICAL METHODS

Culture is the definitive diagnosis of leptospirosis but is considered of low sensitivity, laborious and time consuming, and consequently is not useful for early diagnosis. The 5-

fluorouracil is frequently employed to culture leptospires, which aims to reduce contaminations risks (21).

Dark field microscopy can be used in the acute phase for total blood samples and in the chronic phase for urine samples, cavity liquids and tissues of recent dead animals. The sensitivity of darkfield microscopy is approximately 10^7 leptospires/mL. It is a direct technique of low sensitivity and low specificity, compared to molecular methods, since it is subjective (14,21).

MOLECULAR METHODS

Molecular biology tools have been important for the difficulties and limitations of serological and microbiological methods and are useful in leptospirosis diagnosis using biological samples from domestic and wild animals, which suggests that the rapid detection of leptospires by polymerase chain reaction (PCR) can proceed the detection of specific antibodies and shorten the time for the agent identification by isolation and culture.

Molecular techniques allow the detection of pathogens in several biological materials such as total blood (22), serum (23,24), urine (25), cerebrospinal fluid (26), feces, semen (27) and sputum (28).

The polymerase chain reaction (PCR) shows high specificity and sensitivity for the amplification of a certain pathogen-specific DNA fragment, presenting a great advantage for the early diagnosis of leptospirosis, and can be employed with specific primers (29,30). Those DNA fragments are universally present in bacteria as *gyrB* (31), *rrs* (16S rRNA gene) (32), *secY* (33); or restricted to pathogenic *Leptospira* spp. as *lipL32*, *lfb1* (34) *ligA*, and *ligB2* (35). Furthermore, the real-time PCR (qPCR) combines amplification and quantification of the number of microorganisms (36), i.e. the assessment of the present bacterial load in the same reaction vessel with excellent low contamination risk and can detect extremely low levels of leptospiral DNA (33).

Some molecular systems are sensitive enough to detect one copy of the leptospire genome/mL sample (23,24,35), but most systems show sensitivity of around 10 to 100 copies of leptospire genome/mL sample (36,37). In some cases, PCR is used in association with post-PCR hybridization techniques, which increases the system sensitivity (22-24).

Leptospira genome is between 3.9–4.6 Mb, composed of chromosomes containing the gene 5S, 16S and 23S rDNA (38). The genome region widely used in phylogenetic studies and population genetics is the ribosome gene (rDNA) that directly codifies the ribosomal RNA and is present at a number larger than 1000 copies which are arranged as long repeated series of the same basic unit at the same locus (39).

A genome region based on the ribosomal RNA 16S (rDNA 16S), which amplifies a 331 base-pair (bp) fragment, is widely used in the identification of the genus *Leptospira* (23).

The *lipL32* gene codifies an outer membrane lipoprotein (LipL32) which is considered a virulence factor present in pathogenic leptospires, showing a high conservation degree. Thus, real time PCR using primers specific for this gene was developed in an attempt to differentiate between pathogenic and non-pathogenic leptospires (40).

Omps are membrane proteins which have important pathogenic compounds and are highly conserved in different serogroups and serovars of pathogenic leptospires. Analysis of the homology of the region of the gene *ompL1* showed seven distinct clusters: *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira weilii*, *Leptospira noguchii*, and *Leptospira interrogans* subgroup A (*L. interrogans* Wolffi, Grippytyhosa, Autumnalis, L1-130 and RGA) and subgroup B (*L. interrogans* Australis, Canicola, Hebdomadis, Paidian, Lai, 56601 and Pyrogenes, and *L. weilii* Manhao and *L. noguchii* Pomona) (40).

Other molecular methods have been developed for the detection of *Leptospira* spp. A study made in The Netherlands suggested the application of the Check-Points assay for this purpose. The work used the ligation-mediated amplification combined with microarray analysis to detect *Leptospira* and discriminate between saprophytic intermediate and pathogenic species (41).

The main genomic regions used for the design of primers for *Leptospira* diagnosis are listed in Table 1.

Table 1. Primers used in *Leptospira* detection.

PRIMER	OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCE	GENE	AMPLICON
<i>Leptospira</i> spp. (23)			
Lep1	GGCGGCGCGTCTTAAACATG	rRNA	331bp
Lep2	TTCCCCCATTGAGCAAGATT	16S	
Species-specific (40)			
Intergroup A	CTACTGGCGGCTTGATCAAC		396 bp
Intergroup A	CTGGATCTGTTCCGCTGCGATC		
Intergroup B	CTTGATAGAACCACTGGTGGTGCC		406 bp
Intergroup B	CTGGATCGGTTCCATCGCTCAG		
Borgpeter fwd	CTTGATAGAACAACAGGCGGCATCATC	<i>ompL1</i>	389 bp
Borgpeter rev	GCTAATAAGTTTGCAATGCTCGTAAC		
Kirschner fwd	CGGTTTGATCAATGCGAGAAGCACC		389 bp
Kirschner rev	TTGGATCCGTTCCGCTGCGATT		
Santarosai fwd	CTTATCAATGCAAGATCTACCAAAGGT		408 bp
Santarosai rev	GCGGATATGTTCCCGAGTAGTAATC		
Noguchii fwd	GCGGATTTATCAATGCAAGAAGTACA		390 bp
Noguchii rev	CCGGATCGGTTCCGCTGCGATCAG		
Weilii fwd	AGGCTGATATTGCAGGCTTC		277 bp
Weilii rev	CGGAATCGAATATGTTACGAGTG		
Pathogenic leptospires (42, 43)			
LipL32-45F	AAGCATTACCGCTTGTGGTG		242 bp
LipL32-286R	GAACTCCCATTTCAGCGATT	<i>lipL32</i>	
probe			Taq Man
LipL32-189P	FAM-5'-AAAGCCAGGACAAGCGCCG-3'		System(qPCR)

New knowledge on molecular genetics has been described for studying the molecular epidemiology of *Leptospira*, including 16S rRNA sequencing and several PCR-based methods. Genotyping methods have been developed for a phylogenetic analysis of *Leptospira* species, but Multilocus Sequence Typing and High Resolution Melting (HRM) have the inability to distinguish certain isolates at the serovar level (44-46). Recently, multispacer sequence typing (MST) provides a method with a high discriminatory power to identify clinical isolates in correlation with the serovar profiles (47). The genotyping method is interesting for epidemiological applications and phylogenetic studies.

OPTIMIZATION IN THE PREPARATION AND PROCESSING OF BIOLOGICAL SAMPLES

Several factors can influence the quality of DNA extraction and inhibit PCR, yielding false-negative results.

The biological samples should be buffered and centrifuged to validate the technique since it has a large quantity of enzymatic inhibitors and must have the least possible contact with the atmosphere to prevent the oxidation of certain compounds, and consequently damaging PCR. A good option for neutralization is phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 (27).

Urine samples should be collected by cystocentesis or catheterization. The collected volume will vary according to the size of the species. The samples should be stored in sterile centrifuge tube with 15 mL capacity. Immediately after collection, the urine should be neutralized with sterile PBS 1X pH 7.2 at 1:1 proportion (500µL PBS 7.2 and 500µL urine) in microtube with 1.5 mL capacity. The samples should be kept at 4°C for up to 24 hours, then centrifuged at 11,000 g for 5 minutes (spin) to eliminate urine residues, resuspended in 500 µL sterile PBS pH 7.2 in microtube with 1.5 mL capacity free of RNase and DNase, and frozen at - 80 °C until the molecular techniques are performed (48). Tissue samples should be neutralized with sterile PBS 1X pH 7.2, then centrifuged at 13,000g for 30 minutes at 4°C (49), supernatant discarded and 50µL of sterile PBS 1X pH 7.2 added to the cellular sediment should be lysed with vortex and glass beads or maceration using liquid nitrogen (50).

A positive (DNA of the standard strain) and a negative control (sterile MilliQ water) should be included in all reactions, and the PCR detection threshold should be performed to determine the technique sensitivity.

FINAL CONSIDERATIONS

This review shows the importance of the diagnostic techniques in the research and clinic of leptospirosis. We presented several techniques used in the daily routine, as well as others that help in the investigation of the epidemiology and understanding of the disease. We also emphasize some steps for the good quality and correct diagnosis using biological samples.

REFERENCES

1. Adler B, de La Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140:287-96.
2. Bharadwaj R. Leptospirosis – a reemerging disease? *Indian J Med Res.* 2004;120:136-8.
3. Bandara M, Ananda M, Wickramage K, Berger E, Agampodi, S. Globalization of leptospirosis through travel and migration. *Global Health.* 2014;10(1):1-9.
4. Seijo AC. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37(2):131-4.
5. Ministério da Saúde (BR). Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1997 a 2009. Brasília: SINAN/SVS/MS; 2010.
6. Gouveia EL, Metcalfe J, De Carvalho ALF, Aires TSF, Villalobos-Bisneto JC, Queiroz A, et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhage syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:505-8.

7. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 2013;43(1):1-9.
8. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:736-47.
9. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(12):757-71.
10. Silva RC, Zetun CB, Bosco SMG, Bagagli E, Rosa PS, Langoni H. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. infection in free-ranging armadillos. *Vet Parasitol.* 2008;157(3-4):291-3.
11. Zetun CB, Hoffmann JL, Silva RC, Langoni H. *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu region, SP, Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2009;15(3):546-52.
12. Fornazari F, Camossi LG, Silva RC, Guazelli A, Ribeiro MG, Langoni H. Leptospiral antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) bred in Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2011;17(1):94-7.
13. Paixão MS, Alves-Martin MF, Tenório MDS, Starke-Buzetti WA, Alves ML, da Silva DT, et al. Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil. *Prev Vet Med.* 2014;115(1):69-73.
14. Faine S, Adler B, Boein C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, Austrália: MedDci; 1999.
15. Martin L, Pettit A. Sero-diagnostic de la spirochaetose icterohaemorrhagique. *Bull Mem Soc Med Hop Paris.* 1918;(42):672-5.
16. WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta; 2003.
17. McBride AJ, Athanzio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2005;18:376-86.
18. Ribeiro GS, Nabity SA, Medeiros MA, Takahashi D, Aquino AL, Damião AO, et al. Accuracy of the Dual Path Platform (DPP) assay for the rapid diagnosis of leptospirosis. *Plos Negl Trop Dis.* 2011;6(11):e1878.
19. Chiratharown C, Janwiththayanan W, Sereemasapun A, Lertpocasombat K, Rungpanich U, Ekpo P, et al. Development of an immunochromatographic test with anti-LipL32-coupled gold nanoparticles for *Leptospira* detection. *New Microbiol.* 2014;37(2):201-7.
20. Widiyanti D, Koizumi N, Fukui T, Muslich LT, Segawa T, Villanueva SYAM, et al. Development of immunochromatography-based methods for detection of leptospiral lipopolysaccharide antigen in urine. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(5):683-90.
21. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013;46(4):245-52.

22. Fonseca CA, Teixeira MMG, Romero EC, Tengan FM, Silva MV, Shikanai-Yasuda MA. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. *J Infect.* 2006;52(1):15-22.
23. Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2219-24.
24. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol.* 1993;39(8):1691-700.
25. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, Meza-Brewster JD, Korver H, Terpstra WJ. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(8):1894-8.
26. Romero EC, Billerbeck AE, Lando VS, Camargo ED, Souza CC, Yasuda PH. Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1453-5.
27. Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregori F, Higa ZMM, Vasconcellos SA, et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol.* 2000;73:261-7.
28. Steffens F, Landwehrs A, Goke MN. Leptospirosis after a stay in Thailand. *Dtsch Med Wochenschr.* 2006;131:1521-4.
29. Bowman B. A Model PCR/Probe system for the identification of fungal pathogen. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. *Diagnostic molecular microbiology-principles and applications.* Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993. p.423-30.
30. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Fungal pathogens. In: *Diagnostic molecular microbiology-principles and applications.* Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993. p.423-37.
31. lack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.* 2006;6:95.
32. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis.* 2002;2:13.
33. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS One.* 2009;4:e7093.
34. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;249:139-47.

35. Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes*. 2005;19:111-7.
36. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis*. 2002;2:13.
37. Kee SH, Kim IS, Choi MS, Chang WH. Detection of leptospiral DNA by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994;32(4):1035-9.
38. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by wholegenome sequencing. *Nature*. 2003;422:888-93.
39. Jorgensen RA, Cluster PD. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Ann Missouri Bot Gard*. 1988;75:1238-47.
40. Reitstetter RE. Development of species-specific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;264:31-9.
41. Ahmed A, Anthony RM, Hartskeel RA. A simple and rapid molecular method for *Leptospira* species identification. *Infect Genet Evol*. 2010;10(7):955-62.
42. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1992;30(9):2219-24.
43. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. though TaMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64:247-55.
44. Ahmed N, Devi SM, Valverde ML, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006;5(28):1-10.
45. Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, Sechi LA, et al. Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. *PLoS One*. 2010;5:e12637.
46. Naze F, Desvars A, Picardeau M, Bourhy P, Michault A. Use of a new high resolution melting method for genotyping pathogenic *Leptospira* spp. *PLoS One*. 2015;10(7):e0127430.
47. Zilber AL, Picardeau M, Ayrat F, Artois M, Demont P, Kodjo A, et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *J Clin Microbiol*. 2014;52(2):564-71.
48. Lucchesi PMA, Arroyo GH, Etcheverría AI, Parma AE, Seijo AC. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37:131-4.

49. Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregori F, Higa ZM, Vasconcellos SA, et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol.* 2000;73(4):261-7.
50. Barbante P, Shimabukuro FH, Langoni H, Richini-Pereira VB, Lucheis SB. *Leptospira* spp. infection in sheep herds in southeast Brazil. *J Venon Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014;20:20.

Recebido em: 11/01/2016

Aceito em: 15/12/2016

SOME NOTES OF MULLET (*Mugil liza*, Valenciennes, 1836) FISHING IN BRAZIL: HISTORY AND TRADITION

Simone de Carvalho Balian¹

Werner Souza Martins²

Naassom Almeida Souza Ribeiro³

ABSTRACT

The present study proposes to describe some peculiarities about the history and tradition of mullet *Mugil liza* Valenciennes (1836) fishing in Brazil. The present work is qualitative, descriptive and, exploratory, highlighting some historical facts relevant to the time range of 1945 to 2014. It was concluded that the mullet fishing *Mugil liza*, Valenciennes, (1836) in Brazil: 1) is based on strong Portuguese and indigenous influences; 2) is based on the tradition of a cooperative effort of art, technique, and subjective abilities; 3) has maintained over the centuries the “Mullet Festival” along coastal regions of southern and southeastern Brazil; and 4) depends on initiatives by official organizations and organized civil society to use sustainable exploitation, guaranteeing the preservation of the species and the marine ecosystem.

Keywords: mullet, *Mugil liza*, history of fishing, socio-economic aspects, fishing in Brazil.

ALGUMAS NOTAS SOBRE A PESCA DA TAINHA (*Mugil liza*, Valenciennes, 1836) NO BRASIL: HISTÓRIA E TRADIÇÃO

RESUMO

O presente estudo se propôs descrever algumas peculiaridades sobre a história e tradição da pesca da tainha *Mugil liza* Valenciennes (1836) no Brasil. Trata-se de um estudo de caráter qualitativo, descritivo e exploratório, destacando alguns fatos históricos dentro do período de 1945 a 2014. Concluiu-se que a pesca da tainha no Brasil 1) sofreu forte influência portuguesa e indígena; 2) estrutura-se pela tradição de um esforço cooperativo da arte, técnica e habilidades subjetivas; 3) mantém ao longo de séculos a “Festa da Tainha” ao longo das regiões costeiras do Sul e Sudeste do Brasil; e 4) depende de iniciativas dos órgãos oficiais e da sociedade civil organizada para manter exploração sustentável, garantindo a preservação das espécies e do ecossistema marinho.

Palavras-chave: tainha, *Mugil liza*, história da pesca, aspectos socioeconômicos, pesca no Brasil.

¹ University of São Paulo (USP), Department of Preventive Medicine and Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270 São Paulo/Capital, Brazil.

² Fishery Engineer, Doctorate in Sciences by FMVZ - USP - Department VPS.

³ Veterinarian, Doctor of Science by FMVZ - USP – Department VPS.

ALGUNAS NOTAS SOBRE LA PESCA DE LA TAINHA (*Mugil liza*, Valenciennes, 1836) EN BRASIL: HISTORIA Y TRADICIÓN

RESUMEN

El presente estudio se propuso describir algunas peculiaridades sobre la historia y tradición de la pesca de la tainha, *Mugil liza* Valenciennes (1836) en Brasil. Se trata de un estudio de carácter cualitativo, descriptivo y exploratorio, destacando algunos hechos históricos dentro del periodo de 1945 a 2014. Se concluyó que la pesca de la tainha en Brasil: 1) sufrió fuerte influencia portuguesa e indígena; 2) se estructura por la tradición de un esfuerzo cooperativo del arte, técnica y habilidades subjetivas; 3) mantiene al largo de siglos la “Festa da Tainha” en las regiones costeras del Sur y Sudeste de Brasil y depende de iniciativas de los órganos oficiales y de la sociedad civil organizada para mantener explotación sostenible, garantizando la preservación de las especies y del ecosistema marino.

Palabras clave: tainha, *Mugil liza*, historia de la pesca, aspectos socioeconómicos, la pesca en Brasil.

INTRODUCTION

Mullet fishing is a part of both historical fishing in Brazil and the customs of the indigenous populations along the southern-southeastern coast (1). This activity displays an extensive cultural richness, starting with tasks such as fishing preparation by the production of weapons and expedition equipment and extending to the mobilization of people and artisans (2) creating a dynamic process of customs and traditions transmission along of generations (3). The activity of capturing, specifically, employs different techniques, weapons, and effort (4). After the capture, fish-conservation techniques are also employed which allows the long-distance commercialization of fishing and riverside areas and enables this species to be consumed throughout the year.

An important dietary item, mullet is responsible for driving the economy in various locations along the coast and for integrating communities over generations. This species is the protagonist of one of the most traditional regional celebrations, which also carries its name (2), along with various species of the genus *Mugil*, which belong to family Mugilidae.

Fish of family Mugilidae, popularly known as Le branche mullet and Silver mullet, are among the most abundant species found in coastal marine and estuarine environments, and they form dense schools in southern and southeastern Brazil (5). These species range from Rio de Janeiro to Argentina in the western South Atlantic (6,7). According to the fishing histories, the largest specimens obtained reached up to a meter in length and six kilograms in live weight. These fish often have an average length of 50 centimeters.

Characterized as a diadromous species, mullet juveniles migrate from the open ocean to freshwater, where they remain for a specific amount of time. During the reproductive period, the fish have a preferentially catadromous behavior, i.e., they migrate to the open ocean to spawn (6,8).

Recent studies (9) define *Mugil liza* Valenciennes, (1836) as mullet found along the entire coast of the South American and Caribbean Atlantic Ocean, although these fish were previously known as *M. platanus*, Günther, 1880.

Over time, mullet have remained important in artisan and subsistence fishing and represent a source of income and survival. After the year 2000, with declining volumes of true sardines, mullet became an important species for industrial trawlers (5), and mullet was no longer a secondary species to *Sardinella brasiliensis* (10). The increasing capture of adult individuals in the reproductive phase has significantly jeopardized schools in

southern/southeastern Brazil (11) which necessitates responsible fishing under strict sustainability principles.

Because the mullet *Mugil liza* Valenciennes, (1836) is important to Brazilian extractive marine fishing and documented discussions on this theme are lacking, the present study proposes to describe and discuss some of the peculiarities of mullet fishing that stand out in the history of this activity in southern and southeastern Brazil. The study also highlights the activity's socio-economic and artistic importance and how mullet fishing promotes the integration of social groups in mass demonstrations.

Similar to other artisan fishing arts, mullet capture and its cultural and ethnic context have undergone various transformations over time, strongly driven by cultural factors and economic pressures that, over time, jeopardized the maintenance of this activity. Because such practices are based on the interpersonal transmission of knowledge from father to son and among members of a community, the practices tend to transform when they are not lost over time, if there is no effort to document them. This fact justifies the effort to preserve specific information to make available, at another point in time, the data and usable records of both historical preservation of a culture and the planning and ordinance of this system of extractive production. In this context, the present study was designed to describe some of the peculiarities that characterize the art of mullet *Mugil liza*, Valenciennes, (1836) fishing.

Biological aspects

The species *Mugil liza* Valenciennes, (1836) is a teleost fish, belonging to the group of vertebrates, which occur in larger number on the planet and exhibit an efficient body organization and reproduction. It's known that mullets belong to the same family *Mugilidae*, detritivore fish, with wide distribution, occurring in tropical waters and subtropical regions around the world, mainly in the marine estuarine coastal regions (12) and in the lagoons of hypersalines and fresh waters (13). Only the genus *Mugil* occurs in Southeastern Brazil. This genus is represented by seven species (8). The species *Mugil liza* was first described by Valenciennes in 1836, and it is a pelagic species that lives in the water column (8), usually at depths of 20 meters. Some specimens have been found up to 300 meters deep (14). These fish form large schools, especially during their reproductive migration from estuaries to the sea. Juveniles remain in estuaries, which are calm environments that offer shelter and rich food resources, until their gonads mature. Spawning occurs far from the coast, but juveniles require a period of time in waters with similar conditions to those of estuaries (15). Mullet attain sexual maturity when they reach a length of approximately 40 centimeters (8).

Vieira and Scalabrin (16) described the life cycle of the mullet that occurs on the Brazilian coast, which was known as *Mugil platanus* Günther, (1880), but in 2010, (Menezes, Oliveira and Nirchio (9) identified the species *Mugil liza* Valenciennes, (1836) occurring from the Caribbean to Argentina. These authors report that during the reproductive period, *Mugil liza* migrates to open sea to spawn between the coast of Northern Rio Grande do Sul and Northern Santa Catarina, originating large schools. Spawning occurs from the end of fall to the beginning of winter, with peaks in the months of May and June, and can extend until September. Juvenile recruitment in the Lagoa de Patos occurs throughout the year, with peaks of abundance during winter and spring. Juveniles search for coastal waters, penetrating estuaries where they develop until they again migrate to waters far from the coast. Menezes and Figueiredo (6) reported the capture of individuals measuring up to one meter in length and weighing approximately six pounds. Godinho, Serralheiro and Scorvo (17) affirmed that the species *Mugil liza*, *M. platanus* and *M. curema* are the most exploited species along the Brazilian coast.

Fishing gear used to catch mullet

A variety of fishing arts have been used to capture mullet, such as small nets made with lines of tucum (*Bactris setosa*) leaves used by the Tupi indigenous people, inhabitants of the southern Brazilian coast, along with arrows and structures fixed in the sea made of rods and leaves (5). These fixed structures, called fixed enclosures, were previously of the utmost importance to mullet fishing (18).

Currently, we still see various types of fishing arts employed in mullet capture on beaches, estuaries, and shores or in water farther from the coast by fishing vessels of a wide range of drafts and tonnages. According to Diegues (19), after the 1950s, with the advent of synthetic lines in seine nets, the first records of the use of seine nets for mullet appeared, along with the configuration of the trammel, which was used in mullet capture from canoes, rafts, and small rowboats.

According to De Pina and Chaves (4), who investigated mullet fishing in the state of Paraná, the uses of trawler nets and beach cast nets (beach haul or fence) are the most widespread in this region. Fishing with trawler nets occurs throughout the year but is intense during the winter. Beach seine nets are most commonly used during the spring, summer and fall. The authors also mention the use of gillnets, which can be anchored or drifting, also known as trammels (Table 1).

Table 1. Mullet capture in the Guaratuba Bay, state of Paraná, Brazil, by type and season according to Pina and Chaves (4).

	Summer	Autumn	Winter	Spring
Anchorage	-	<i>M. platanus</i> <i>M. curema</i>	-	<i>M. curema</i> <i>Mugil. sp.</i>
Drifting gill nets	-	<i>M. platanus</i>	-	-
Beach throw net	<i>M. platanus</i> <i>M. curema</i>	<i>M. platanus</i>	-	<i>M. platanus</i> <i>M. curema</i>
Cast net 10-11 cm	-	<i>M. platanus</i> <i>M. curema</i>	-	-
Cast net 07-09 cm	-	<i>M. platanus</i>	-	-
Cast net 04-06 cm	<i>M. platanus</i> <i>M. curema</i> <i>Mugil. sp.</i>	<i>M. platanus</i> <i>M. curema</i>	-	<i>M. platanus</i> <i>M. curema</i> <i>Mugil. sp.</i>

Beach cast nets are also cited by Pinheiro et al. (3) as one of the oldest forms of fishing practiced in Brazil, and the principal target species is mullet. These authors investigated the case of mullet fishing on the Paraná coast and describe the art of beach cast nets as the most widespread.

In a study by Mourão (20) about fishermen of the southern coast of the São Paulo state, the trawler or beach cast net is cited as the principal fishing art used by these fishermen. Fixed enclosures, made of bamboo rods (*Phyllostachys aurea*), have also been used in this region. Similar to the coast of Paraná, gillnets are also used on the coast of São Paulo, in addition to trawler nets.

In the Lagunar Cananéia-Iguape region, the fixed enclosure (corral) is the principal fishing art used to capture mullet according to Ramos et al. (21).

In the area around Patos Lagoon estuary, located in the state of Rio Grande do Sul, an investigation by Ferreira (22) showed the fishing characteristics and relative abundance of mullet. The author indicated the use of four different types of capture: fixed gillnets, enclosure, drift gillnets, and cast nets.

Fisheries on industrial fishing vessels uses different capture methods, including trawling, paired trawling, gillnets with drifting and weighted nets, and the enclosures built by mullet fishermen. The offloading performed by the São Paulo industrial fleet is described by Seckendorff and Azevedo (5).

Industrial mullet fishing in the state of Santa Catarina includes the use of trawls, paired trawls, gill nets, and enclosures. The industrial activity in this state is effectively all performed by mullet fishermen because there are insignificant numbers of other types of fishermen (11). Mullet are captured in this state by a mullet fishermen fleet that captures stocks of other species in addition to mullet (23).

Fishing mullet and geography

From Rio Grande do Sul to Rio de Janeiro, there are mullet fisheries practiced by fishermen and members of traditional communities and by fishing fleets that operate out of ports along the coast (11).

In the state of Rio Grande do Sul, the Lagoa de Patos estuary is described by Ferreira (22) as a region of intense fishing activity aimed toward mullet.

The Santa Catarina coast is known for harboring diverse traditional fishing communities, which maintain the Portuguese customs which were always intimately connected within the mullet fishing tradition. The Barra da Lagoa community in the Itajaí Valley (2) and in the cities of Imbituba, Florianópolis, Governador Celso Ramos, Bombas, Bombinhas and Balneário Camboriú (11), traditionally practice this capture. The mullet disembarkation in the state of Santa Catarina is cited as the largest of the country (11).

The state of Paraná has a limited coastline, yet there is traditional and intensive fishing for various species, including mullet, especially in the estuary-lagoon complex Paranaguá Bay and the Guaratuba Bay (4), Barra do Saí-Guaçu, Prainha, Caiobá, Ipanema, Shangri-lá, Guapê, Barranco, Pontal do Sul, Maciel, Ilha do Mel and Barra do Arapira (3).

In the state of São Paulo, from the southern to northern coast, mullet are captured by fishing members of traditional communities and the industrial fishing fleet (5). Cardoso Island and the Paranaguá Bay, on the border with Parana State of Brazil. The largest mullet disembarkations performed by the industrial fleet took place in Santos and Guarujá (5,11). Along the northern São Paulo coast, communities perform traditional fishing throughout the entire range (1) to the state of Rio de Janeiro where traditional communities inhabit various lengths of the southern coast near the border with São Paulo and extend to the Lagos region participating in mullet fishing (11).

METHODOLOGY

The present work is an exploratory documentary study (Table 2), which also uses information collected from direct contact with fishing researchers and professionals. The clerical search included records from 1913 to 2010. The search was performed via Scielo and other sites of institutions related to the theme of fishing and fisheries, including the USP [University of São Paulo] Zoology Museum and USP Oceanographic Institute. The field research was based on a qualitative, descriptive, and exploratory methodology, as a theoretical basis, described by Minayo (24). The data collection followed the precepts of a systematic observation described by Marconi and Lakatos (25). Visits were also made to regional

festivals celebrating mullet, at which time informal testimonies from the following entities were recorded: fishermen of southern and southeastern Brazil; fishermen unions of Santa Catarina and Fishing Colony Z-3 Fishermen Association of Guarujá/São Paulo (SP), called Vicente de Carvalho; fishermen of the neighborhoods Engenho and Perequê in Ilhabela/SP; and fisheries consumers in the City Market of the neighborhood of Tucuruvi/SP.

Table 2. Studies dealing with fishing and reference catch mullet and related topics to this activity.

Autor	Year	State/Brazil	Subject
Mussolini G (1)	1945	São Paulo	Mullet enclosures
Mourão F (20)	1971	São Paulo	Fishermen of the southern coast
Radasevsky A (18)	1976	São Paulo	Fixed enclosures
Mussolini G (1)	1980	São Paulo	Anthropology
Ramos E B, Jaques G, Verrone VMA (21)	1980	São Paulo	Fixed enclosures
Diegues ACS (19)	1983	São Paulo	Seamen
Mendonça JT, Katsuragawa M (26)	2001	São Paulo	Artisanal fishing
Mendonça JT, Pires AD, Calasans GC, Xavier SC, Hoff EA, Sena RJ (27)	2004	São Paulo	Fish production of the southern coast
Pina LV, Chaves PT (4)	2005	Paraná	Mullet fishing
Miranda LV, Mendonça JT, Cergole MC (8)	2006	São Paulo	Diagnosis of stock
Rossiwongtschowski CLB, Ávila-da-Silva AO, Cergole MC (28)	2006	São Paulo	Principal southeastern-southern fisheries REVIZEE
Ibama (11)	2007	Santa Catarina	Mullet fishing regulation
Ferreira CN (22)	2007	Rio Grande do Sul	Characterization of fishing
Miranda LV, Carneiro MH (10)	2007	São Paulo	Mullet fishing
Seckendorff RW, Azevedo VG (5)	2007	São Paulo	Historical account of mullet fishing
Alves PMF, Arfelli CA, Tomás ARG (29)	2009	São Paulo	Gillnet fishing
Pinheiro L, Lana PC, Andriguetto Filho JM, Hanazaki N (3)	2010	Paraná	Mullet fishing
Conceição ML (2)	2011	Santa Catarina	Mullet fishing and festival

LITERATURE REVIEW

Historical Highlights

As previously presented, reports in the national literature about mullet fishing, focused on fishing art and the socio-cultural importance, are lacking, which justifies the exhaustive use of the author Mussolini (30). In a study from 1980, the richness of information and accumulated knowledge were given in Mussolini's reports. The work by Mussolini is of great relative importance in the creation of knowledge on Brazilian coastal fishing, especially in the southern and southeastern regions.

Providing a short history, between the XVII and XIX centuries, the only valued fishery for the national economy was that of whaling, which began in 1603 in Bahia and moved towards the south, where it was heavily developed in Santa Catarina. The importance of this industry was focused on "[...] *extracting oil from whales [...]*", according to Mussolini (1, p. 224), but "[...] *“real contracts” or “armações” [...]*" were not established in fishing locations, and thus, fisheries were not considered to exist or maps of fishing production were "[...] *insignificant, only for waste, not making available establishments for this [...]*" (1, p. 224, author's emphasis).

Reaffirming the Portuguese and indigenous influence, they wore the harpoon to the whale fishing. In relation to the mullet fishing on the Sao Paulo coast there are reports that was almost as a sport, commonly known as slingshot (1) [...] trident fitted with a cable of 2.5 to 3 meters in length [...] to announce the station of the mullet, that is, the period of abundant fishing. Mussolini (1, p. 231, author's emphasis) tells that fishermen leave "[...] *at night in their canoes, to which was attached a lantern (torch) – which is why this type of fishing is known as ‘torching’, and the fishermen says he will go ‘torching’ – and, with his feet firm on the edges of the canoe, he throws a gaff and sticks a fish. This process is similar to not only harpooning a whale but also the indigenous system of shooting fish from within canoes [...]*."

Mullet exploitation has developed over time within the history of Brazilian fisheries. After whaling, the second most important economic exploration in Brazil began with colonization (1). This fact is, at least in part, associated with Brazil's abundance of natural resources due to its eco biological characteristics. For long periods, Brazil has suffered intense concentrations of individuals, which have made foraging/hunting/fishing important economic activities and food sources.

Mussolini (1) states that it is not possible to discern the Lusitanian and indigenous influences on the processes of fish capture in Brazil, even in fishing gear, such as in the appliance and type of vessel used. Regarding fishing techniques, Mussolini (1, p. 227) comments that "[...] *the principle of gilling the fish [...]* destined to those that, as the mullet, are disposed to jump in defense, which are not easily captured by enveloping nets, is so advertised to the world that we will not attribute the indigenous influence to the practice adopted by Brazil because Portuguese nets also put this practice to use [...]." The practice of corking involves the creation of a fence made of wood sticks that (1, p.227) [...] *you to shed much sum of one certain herbs footsteps, which they call “timbo”, with the puttest thy bottle the fish so that comes above the water as dead; where they have to many of them [...]*.

Describing the influence of Portugal and of indigenous people, the author (1, p. 227) that the technique of “tapagem”, comment that the corking technique that “[...] *is so condemned by the fishing legislation [...]* consists of a trap, formed by branches, to trap the fish.” In their words, “[...] *The Indians used ticum nets “[...] a species of palm (Bactris setosa) [...]* to entangle the fish, and the mode of encircling it, hitting it in the water afterwards to shock it so that thus it would be trapped in the net mesh [...].” This mode of fishing was practiced from the Northeast to the Southeast of Brazil and was called “jolt fishing” and “Trojan fishing” in the cities of Bahia and São Paulo state, respectively.

Santos (31) reports that indigenous people know mullet as “curumã-aiva”, or “bad to eat” flavor “tapiearas.” The author considered as mullet the fishes that were not sexually mature, i.e., those that had not yet gone to the sea, still inhabitants of estuaries. However, Santos (31) understood “tapiearas” not as still immature individuals but as mullet that after spawning were thinner and smaller with an unpalatable flavor that was uncharacteristic and unexpected for consumption.

In the Amazon, the practice of fish preparation called *moquém*, a product of indigenous inheritance, is still practiced. Mussolini (1, p. 227) explains that *moquém* is:

[...] the only way [...] to keep the fish fresh when it is not prepared with salt [...] They suspend for a given time over the fire the amount that serves as a meal, beef or fish, and let it cure and smoke until drying; [...] meat prepared in this manner is called moquém [...] (author's notes).

In 2010, artisanal fisherman from the cities of Santos/SP, Guarujá/SP and Ilha Bela/SP also reported the capture of mullet with undesirable flavor, which were thrown away even when fresh, large, and healthy. The fishers note that the mullet considered of high consumption quality are those that were captured in the open ocean and were well developed, with a blue back, also known as “new” mullet. According to Santos (31), the “new” mullet, are also called spawned mullet, is that one which is sexually mature after a long journey from the estuary and that has arrived in the open ocean.

Mussolini (1, p. 235) affirms that mullet is important in the context of fishing and relates to traditional practices that characterize the lifestyle of a region. These practices are passed down from generation to generation as a cultural inheritance. The author highlights fishing by “beach cast nets” as an art and ingenuity with a complex process. He describes with delicate beauty this intricate “man-nature” relationship established in the fishing practice, which depends on sensibility, intuition, observation, dexterity, effort, and cooperation. The abundance of mullet in specific periods allied with this true “ritual” might have fundamental characteristics that perpetuate the art details in its history (30).

Ramalho (32) comments in his book about artisanal fishermen from Pernambuco state that the practices exercised by fishermen, resulting from creativity, liberty, and resistance in an effort to live and work the true art, full of its own codes, are dominated by values much different than those of traditional systems of working relationships in other economic sectors, such as agriculture. The fishing activity occurs in a unique space, called by the author as “[...] aquatic space [...] in which [...] the fisherman has to make decisions regardless of [...] a priori defined external pressures; [...] the peculiarity of the main means of production (the sea) places constant unpredictability and risk (including loss of life)[...]” Therefore, the production units are governed by a strong sense of cooperation; the efforts are always toward a single objective on the boat, and partnership and familiar work are of the highest value.

Mussolini (1) argues that fishing comprises a set of practices whose work organization transcends familial limits and is converted into communal activity. Mullet is the species that best expresses this particular form of human interaction for productivity, based on extractive marine fishing. In the words of Mussolini “[...] it is in fishing, around the net, that a series of interactions between the people of a neighborhood are established, uniting them in cooperation and making them truly constitute a local group [...]”.

Based on the peculiar characteristics of mullet fishing in the country, especially in the South and Southeast, conditions have developed that allow the rise of the “mullet festivals”, which commemorate the victory of the cooperative fishing effort. Based on the words of Ramalho (32), there is a solid relationship between the abundance of mullet in Brazilian waters and the coastal communities aimed at its capture. Mullet harvest is perpetuated by the transmission of the “art of fishing”, i.e., of the set of practices more similar to art than technique, transmitted among family members, friends, and work colleagues, composing true

rituals with well-defined actions in the pre-fishing work and in the actual fishing until the catch arrives on land.

The fishing gear most frequently used to capture Lebranche and Silver mullet is gillnets. Gillnets are nets with lead weights that lie on the ground and floats that stay on the surface. According to the characteristics of the region, to avoid breaking and destroying the nets, fishermen fish for Lebranche mullet with nets that have three to four sections in height and a length of up to 14.0 m, and the mesh holes are greater than 10 cm between opposing knots. The nets used to catch Silver mullet have three to four sections in height and a length of up to 8.5 m, with holes in the mesh of six centimeters between opposing knots (5).

With the fishing completed, it is time to divide the fish, a practice that is nothing more than live tradition in action. First, the “third” that belongs to the owner of the net or nets is removed; the two remaining thirds are divided among all who helped haul the nets or row the boats. Here, there is an intertwined relationship between fishing participants and shares of the fish, Mussolini (1) notes that in this cooperative process, “[...] the canoes that were “*aparar*” deliver [...] one-third of their catch.

Seckendorff and Azevedo (5) in a technical report on Lebranche and Silver mullet fishing in northern São Paulo, highlights the importance of historians such as Staden and Léry, with published dates of 1974 and 1980, respectively, who highlight the importance of these species in feeding Tupi Indians throughout the São Paulo coast to Cabo Frio.

For the artisanal sector, mullet is a resource both for subsistence and income, while for the industrial sector (mid- or large-sized vessels), mullet represents, mainly after the 2000s, a potential alternative resource for sardines, which are highly valued by the consumer market, in a substitution of traditional resources that have shown strong declines, both in capture and yield (5).

On the northern coast of São Paulo, the controlled ships include industrial fishers with gillnets and some mullet fishermen. Regarding artisanal fishing, there are still deficiencies in the control and documentation systems, which implies that information is not available on the true dimension of this practice. In this region, beach cast nets are no longer used due to both the low availability of schools and the difficulty of organizing the large human contingent necessary for fishing, a result of changes in the social organization of communities. According to Giulietti and Assumpção (33), increasing tourism and housing expansion have threatened fishing activities in the same way as overfishing fish stocks. Diegues (19) states that real estate speculation has disrupted the foundation of the social organization of coastal communities along the São Paulo coast, and many coastal indigenous people never held documentation for the lands on which they lived, lands where they practiced itinerant extraction and artisanal fishing (e.g., with canoes and nets) and consequently, the knowledge about these activities, which has been passed down over generations, was lost.

The largest volumes of mullet are captured from March to May from the coast of Rio Grande do Sul to Pará. Gasalla et al. (34) call attention to the improvement of industrial fishing vessels, valuing sophisticated equipment for locating schools, such as echo sounders, sonar and GPS (*global positioning systems*), etc., which restrict the opportunity for captures by artisanal fishers.

Diegues (19) reports that small groups of fishermen from communities of the São Paulo and Rio de Janeiro coasts have faced reduced volumes of mullet in cold months which was considered to be the target harvest period for this species. Two decades ago, large schools of mullet were captured on some beaches which required the participation of neighboring communities and the use of connected nets to retain the fish. From reports by Diegues (19) in the 2000s schools were rarely visible, even less frequently and small fishermen take their canoes to the sea to capture them.

Gasalla et al. (34) state that from 1995 to 1999 mullet was the fourth most captured fish species by vessels in the ports of Santos and Guarujá, only surpassed by true sardines,

mackerel *Scomber japonicus* (Houttuyn, 1782) and pompano *Chloroscombrus chrysurus* (Linnaeus, 1766).

Santos (31) reports that the migration of mullet in the South and Southeast begins in March in Rio Grande do Sul state and ends at the end of June, or July in some years. The first schools appear in March in the state of Santa Catarina, in April in Paraná and northern states, in May in Maranhão, and in April and May in São Paulo and Rio de Janeiro. According to Seckendorff and Azevedo (5), because captures are concentrated during the reproductive migration, in winter, reduced stocks could occur when fishing is unplanned and/or controlled, which threatens the fishing activity in the mid- to long-term.

According to studies by Lowe-McConnell (35), some species of mullet begin migration in the Patos Lagoon, Rio Grande do Sul, in April/May, arriving at the coast of Santa Catarina in May/June, and spawn between the end of fall and beginning of winter, which includes the months of May and June, especially in areas where the temperature varies from 19°C to 21°C. The largest volumes captured occur at the end of fall and beginning of winter when the fish are “spawned” and the market value hits the highest marks. It is during this period that mullet are the most important artisanal fishery in the Southeast.

In the Patos Lagoon, Rio Grande do Sul, fishing production is highly variable from one year to the next and is extremely dependent on environmental conditions. In the fall, adults leave the estuary, an important development area, and begin their reproductive migration along the coast, toward the north, stimulated by large drops in temperature caused by cold fronts in the region. It is during this migration that most of the fishing occurs. Along the coast of São Paulo, larger quantities are found between May and August (6,7).

Generally from March to May (before the arrival of the cold fronts) the predominant gear used in mullet capture is beach cast nets, principally in Ilha Comprida/SP, and fixed enclosures and estuary gillnets predominate from May to October, e.g., in Cananéia/SP. The principal fishing ventures in Iguape/SP occur from May to September, mainly with beach cast nets and estuary and coastal gillnets. The peak collection occurs in September in Iguape/SP and Ilha Comprida/SP and results from the large captures from beach cast nets. Therefore, estuarine fishing peaks between the months of June and July, while coastal fishing peaks in the months of March to September (10).

Along the coast of São Paulo, mullet fishing is significantly more intense from March to May, due to the abundance of catch. The attractiveness of the species, results from its palatability, cost-benefit, and congregations of people celebrating the harvest period, which results in the traditional “mullet festivals”.

Mullet eggs are also eaten and are called “caviar substitute” by Verissimo (36); according the authors, this product has a sensorial quality better than Russian caviar, equally sophisticated and appreciated by a public with demanding taste. Dias Neto and Dornelles (37) defines industrial coastal fishing as that performed by vessels that are more autonomous than artisanal ones and are able to reach areas further from the coast, with diesel-powered propulsion, wood or steel hulls, and electronic equipment for navigation and detection of schools. These vessels dominate the capture of the principal resources in volume or value for the national production. Mullet capture by the industrial fleet is basically performed by mullet fishermen, mainly in Santos region and the northern coast of São Paulo, and by artisanal methods of beach cast nets, corkings, and fixed enclosures, mainly on the southern coast, which still maintains a strong indigenous influence.

Regarding mullet fishing in Santa Catarina, one of the historical reports of 1918 noted the Canasvieiras beach, in the northern part of the state, little more than two kilometers in length, which was considered in 2010 to be one of the principal beaches destinations of southern Brazil.

On the coast of the state of Santa Catarina, where fishing is part of the history of the state, due in part to the influence of the colonizers and in part to the favorable geographic

conditions regarding nutrient-rich maritime currents, mullet fishing has extensive participation.

Mussolini (1) comments that mullet capture is the only one that draws a large number of people during the period of maximum capture (i.e., winter), attracting men that do not practice professional or amateur activities as fishermen during the remainder of the year. Many years of the XX century have had an abundance of the species, uniting men to pull the nets because there were not enough fishermen for the quantity of the fish. Moments of abundance and festivity moved the entire local coastal community to join forces to produce a successful catch. A historical document, dated in the 1950s, notes the presence of the governor of Santa Catarina, Jorge Lacerda, participating in the *comradeship* to fish for mullet on the Pântano do Sul beach. Mullet fishing by beach cast nets is known as “comradeship” because it attracts locals, tourists, and other fishermen to participate to pull the net full of fish. The collaborating participants are called “comrades”.

In the 2000s, with the reduced catch of the sardine (*Sardinella brasiliensis*, Steindachner, 1879), the industrial fleet of mullet fishermen from southern and southeastern Brazil began to capture species that were previously considered accessory species, which became some of the principal resources, especially for artisanal fishing along the southern coast of São Paulo, mainly during the winter months. Currently, most mullet fishing occurs during the species' reproductive period from the coast of Rio Grande do Sul to the coast of São Paulo, which could have decreased the abundance of this species and jeopardized future fisheries (5).

This brief report is intended to emphasize the importance of the participants involved in fishing mullet and involved in advertising actions to the maintenance of a rational and sustainable fishery that guarantees not only the preservation of the species but also the live art of mullet fishing, the commemorative festivals, and the fishing culture.

Summarizing the findings of this study, mullet fishing (*Mugil liza*, Valenciennes, 1836) in Brazil 1) is based on strong Portuguese and indigenous influences; 2) is based on the tradition of a cooperative effort of art, technique, and subjective abilities; 3) has maintained over the centuries the “mullet festival” along coastal regions of southern and southeastern Brazil; and 4) depends on initiatives by official organizations and organized civil society to use sustainable exploitation, guaranteeing the preservation of the species and the marine ecosystem.

FINAL CONSIDERATIONS

Regardless of who captures the mullet, whether it is the artisanal fisherman or the industrial fleet, this activity always occurs near the coast, often in regions of lagoons and estuaries, regions that are susceptible to anthropic actions, which in many cases lead to negative impacts. Under this premise, society's view of environmental questions inherent to the preservation of coastal ecosystems is fundamental to maintaining the species and preserving the practices cited throughout this study because the capture of this species is influenced by a series of social, economic, and environmental factors. Parallel to environmental preservation is the maintenance of ecosystems and the preservation of immaterial patrimony figures as a social demand with the same level of importance. This patrimony, which is the fiber for a complex network of knowledge and centennial traditions dating to the Amerindians, has resisted various ethnic and cultural influences and the advent and modernization of innumerable fishing techniques.

Mullet stocks have decreased, according to reports of catch per unit effort. The size of the individuals captured follows the decrease in catch, as does the realization of this activity by traditional methods.

Because the capture volume of this stock is concentrated in a specific part of the year, we can affirm that the activity of catching this species plays a fundamental role in providing food and creating work for traditional populations in a specific part of the year, which composes an annual calendar that has been followed across generations. This calendar overlaps mullet fishing with agricultural activities and the capture of other species; thus, mullet fishing is extremely important for the continuation and connection of all the annual activities.

The cultural and ethnic factors are extremely extensive in the theme treated here. This fishing activity is intertwined with the history and customs of coastal communities of southern and southeastern Brazil. Additionally, mullet fishing carries a cultural richness that shows the relationships between human beings, the ocean, art, and survival.

REFERENCES

1. Mussolini G. Ensaios de antropologia indígena e caiçara. Rio de Janeiro: Paz e Terra; 1980.
2. Conceição ML. A pesca e a festa da tainha na formação da açorianidade. Rev Santa Catarina Hist. 2012;5:69-75.
3. Pinheiro L, da Cunha Lana P, Andriguetto Filho JM, Hanazaki N. Pesca de pequena escala e a gestão patrimonial: o caso da pesca da tainha no litoral paranaense. Desenvolv Meio Ambient. 2010;21:143-55.
4. De Pina JV, Chaves PDT. A pesca de tainha e parati na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. Acta Biol Par. 2005;34:103-13.
5. Seckendorff RW, Azevedo VG. Abordagem histórica da pesca da tainha *Mugil platanus* e do parati *Mugil curema* (Perciformes: Mugilidae) no litoral norte do Estado de São Paulo. Ser Relat Tec. 2007;28:1-8.
6. Menezes NA, Figueiredo JL. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil: Teleostei (4). São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; 1985.
7. Miranda LV, Mendonça JT, Cergole MC. Diagnóstico do estoque e orientações para o ordenamento da pesca de *Mugil platanus* (Günther, 1880). In: Rossiwongtschowski CLB, Ávila-da-Silva AO, Cergole MC. Análise das principais pescarias comerciais da região sudeste-sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração-II. São Paulo: Instituto Oceanográfico – USP; 2006. (Série Documentos REVIZEE–Score Sul).
8. Menezes NA. Guia prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do litoral brasileiro. Rev Bras Zool. 1983;2:1-12.
9. Menezes NA, Oliveira C, Nirchio M. An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). Zootaxa. 2010;2519:59-68.
10. Miranda LV, Carneiro MH. A pesca da tainha *Mugil platanus* (Perciformes: Mugilidae) desembarcada no Estado de São Paulo subsídio ao ordenamento. Ser Relat Tec. 2010;30:1-13.

11. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. I Relatório da reunião técnica para o ordenamento da pesca da tainha (*Mugil platanus*, *M. liza*) na região sudeste/sul do Brasil. Itajaí: IBAMA; 2007.
12. Fischer W. FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Central Atlantic. Rome: FAO; 1978. (Fishing area 31).
13. Cervigón F, Cipriani R, Fischer W, Garibaldi L, Hendrickx M, Lemus AJ, et al. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América [Internet]. Roma: FAO; 1992 [cited 2016 Feb 04]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/010/t0544s/t0544s00.HTM>.
14. Harrison IJ. Mulletts. In: Ke C. The living marine resources of the western central Atlantic. Rome: FAO; 2002. v.2, p.1071-81.
15. Bizerril CRSF, Costa PAS. Peixes marinhos do estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: FEMAR; 2001.
16. Vieira JP, Scalabrin C. Migração reprodutiva da “tainha”(*Mugil platanus* Gunther, 1980) no sul do Brasil. Atlantica. 1991;13:131-41.
17. Godinho HM, Serralheiro PCDS, Scorvo Filho JD. Revisão e discussão de trabalhos sobre as espécies do gênero *Mugil* (Teleostei, Perciformes, mugilidae) da costa brasileira (Lat. 3°S – 33°S). Bol Inst Pesca [Internet]. 1988 [cited 2016 Feb 4];15:67-80. Available from: ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/15_1_67-80.pdf.
18. Radasevsky A. Considerações sobre a captura de peixes por um cerco-fixo em Cananéia, São Paulo, Brasil. Bol Inst Oceanogr. 1976;25:1-28.
19. Diegues ACSA. Pescadores, camponeses e trabalhadores do mar. São Paulo: Editora Ática; 1983.
20. Mourão F. Pescadores do litoral sul do Estado de São Paulo [Internet]. São Paulo: FFLCHUSP; 1971 [cited 2016 Feb 4]. Available from: <http://nupaub.fflch.usp.br/sites/nupaub.fflch.usp.br/files/color/anexomourao.pdf>.
21. Ramos EB, Jaques G, Verrone VMA. Áreas da região lagunar Cananéia-Iguape suscetíveis de exploração pesqueira segundo diversos tipos de tecnologia. I-Pesca com cerco fixo. Bol Inst Oceanogr. 1980;29:329-35.
22. Ferreira CN. Caracterização da pesca e abundância relativa da tainha (*Mugil platanus*) (Günther, 1880) no Estuário da Lagoa dos Patos. Rio Grande: Fundação Universidade Federal do Rio Grande; 2007.
23. Andrade HA. Estrutura do setor industrial pesqueiro no estado de Santa Catarina. Notas Tec FACIMAR. 2010;2:17-27.
24. Minayo MCDS. Pesquisa social: teoria, método e criatividade. Rio de Janeiro: Vozes; 2004.

25. Marconi MA, Lakatos EM. Fundamentos de metodologia científica. In: Marconi MDA, Lakatos EM. Fundamentos de metodologia científica. 7a ed. São Paulo: Atlas; 2010.
26. Mendonça JT, Katsuragawa M. Caracterização da pesca artesanal no complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape, Estado de São Paulo, Brasil (1995-1996). Acta Sci Biol Sci. 2001;23:535-47.
27. Mendonça JT, Pires AD, Calasans GC, Xavier SC, Hoff EA, de Sena RJ. Produção pesqueira marinha do litoral sul do estado de São Paulo no período de 1995 a 2002. Ser Relat Tec. 2004;18:1-75.
28. Rossi-Wongtschowski CLB, Avila-Da-Silva AO, Cergole MC. Análise das principais pescarias comerciais da região sudeste-sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração–II [Internet]. São Paulo: Instituto Oceanográfico – USP; 2006 [cited 2016 Feb 3]. v.2. Available from: <http://www.fishbase.org/references/FBRefSummary.php?ID=83857&database=FB>.
29. Alves PMF, Arfelli CA, Tomás ARG. Caracterização da pesca de emalhe do litoral do Estado de São Paulo, Brasil. Bol Inst Pesca. 2009;35:17-27.
30. Mussolini G. O cerco da tainha na Ilha de São Sebastião. Rev Sociol. 1954;7:135-47.
31. Santos E. Zoologia brasílica: nossos peixes marinhos. Belo Horizonte: Itatiaia; 1982.
32. Ramalho CWN. "Ah, esse povo do mar!": um estudo sobre trabalho e pertencimento na pesca artesanal pernambucana. São Paulo: Polis; 2006.
33. Giuliatti N, Assumpção R. Indústria pesqueira no Brasil. Agric São Paulo [Internet]. 1995 [cited 2016 Feb 4];42:95-127. Available from: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpica/asp6-0295.pdf>.
34. Gasalla MA, Servo GJM, Tomás ARG. Dinâmica da frota de traineiras da região de Santos. In: Cergole MC, Rossi-Wongtschowski CLB. Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em exploração. São Paulo: Evoluir; 2005. p.227-49.
35. Lowe-McConnell RH. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo: Edusp; 1999. (Coleção base).
36. Veríssimo J. Pesca na Amazonia. Belém: Universidade Federal do Pará; 1970.
37. Dias Neto J, Dornelles LDC. Diagnóstico da pesca marítima do Brasil. Brasília: IBAMA; 1996. (Série estudos da pesca).

Recebido em: 13/02/2016

Aceito em: 18/12/2016

CRIOCIRURGIA: EFEITOS E COMPLICAÇÕES PÓS-TRATAMENTO

Carolina Malburg¹
Vinicius Gonzalez Peres Albernaz²
Jorge Luiz Costa Castro²

RESUMO

A criocirurgia, muitas vezes referida como crioterapia ou crioablação, é uma técnica cirúrgica que emprega substâncias em temperaturas criogênicas para destruir tecidos ou células indesejáveis, principalmente neoplásicas. A morte celular ocorre devido aos efeitos do congelamento e descongelamento, a curto e longo prazo. Em todos os métodos de tratamento cirúrgico a complicação é inerente ao procedimento e a criocirurgia não é exceção. O presente trabalho tem como objetivo apresentar as reações e complicações pós-tratamento decorrentes da aplicação da criocirurgia como tratamento curativo, adjuvante ou paliativo em cães e gatos. Muitas mudanças ocorrem no tecido tratado criocirurgicamente, que levam à destruição da lesão cutânea, e a resposta tecidual varia de acordo com a intensidade e profundidade da injúria criogênica. Alguns sinais, que podem ser interpretados como “efeitos colaterais” da criocirurgia, são esperados e considerados normais porque representam a progressão do processo fisiológico do congelamento do tecido. Alguns efeitos imediatos observados são: dor, hemorragia, insuflação pelo gás e edema; efeitos a curto prazo: formação de bolhas, infecção, granuloma piogênico, e reações sistêmicas, como febre; efeitos a longo prazo: hiperplasia pseudoepiteliomatosa, hiperpigmentação, leucodermia, danos a nervos, alteração nos pelos, estenose de orifícios naturais devido a retração cicatricial e necrose cutânea. Os efeitos pós-tratamento dependerão da técnica de congelamento utilizada no local, da afecção presente, do tamanho da lesão a ser tratada e da resposta individual do paciente. Apesar da ocorrência de complicações e efeitos colaterais, a criocirurgia deve ser empregada, quando indicada, pois os benefícios ultrapassam, quando executada corretamente, os da técnica cirúrgica convencional.

Palavras-chave: crioterapia, crioablação, congelamento, canino, felino

CRYOSURGERY: EFFECTS AND POST TREATMENT COMPLICATIONS

ABSTRACT

Cryosurgery, as known as cryotherapy or cryoablation, is a surgical technique that use substances in cryogenic temperatures to destroy undesirable tissue and cells, mainly neoplastic. Cellular death occurs due to short and long term freezing and thawing effect. In all methods of surgical treatment, complications are inherent to procedure, and cryosurgery is no exception. This paper aims to show post-treatment reaction and complications of cryosurgery application as curative, adjuvant or palliative treatment in dogs and cats. Many changes occur on cryosurgical treated tissue, that leads to destruction of cutaneous lesion, and tissue response vary according to intensity and depth of cryogenic injury. Some signs, that may be interpreted as “side effects” of cryosurgery are expected and considered normal due to progression of freezing physiologic process. Some immediate effects are: pain, bleeding, inflation by gas and edema; short-term effects are: blistering formation, infection, pyogenic granuloma, and systemic reaction as fever; long-term effects are: pseudo-epiteliomatous

¹ Pontifícia Universidade Católica do Paraná

² Unidade Hospitalar para Animais de Companhia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Correspondência.

hyperplasia, hyperpigmentation, leucodermia, nerve damage, coat changes, natural orifices stenosis due to scar retraction and cutaneous necrosis. Post-treatment effects depend of freezing technique, disease process, lesion size and individual response of the patient. Despite the side effects and complications occurrence, cryosurgery should be applied whenever indicated, because benefits exceed that of conventional surgical technique, when correctly executed.

Keywords: cryotherapy, cryoablation, freezing, canine, feline.

CRIOCIRURGIA: EFECTOS Y COMPLICACIONES DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

RESUMEN

Criocirurgia, a menudo referido como criocirurgia o crioablación, es una técnica quirúrgica que emplea sustancias a temperaturas criogénicas para destruir tejidos y células no deseadas, especialmente neoplásicas. La muerte celular se produce debido a los efectos a corto y largo plazo de la congelación y descongelación. En todos los métodos de tratamiento quirúrgico la complicación es inherente al procedimiento, y la criocirurgia no es una excepción. Este estudio tiene como objetivo presentar las reacciones y complicaciones post-tratamiento derivados de la aplicación de la criocirurgia como tratamiento curativo, adyuvante o paliativo en perros y gatos. Muchos cambios se producen en el tejido tratado por criocirurgia, lo que lleva a la destrucción de las lesiones de la piel, y la respuesta del tejido varía de acuerdo con la intensidad y la profundidad de la lesión criogénica. Algunas señales, que pueden ser interpretadas como "efectos secundarios" de la criocirurgia, se consideran normales y esperados, ya que representan la progresión del proceso fisiológico de congelación del tejido. Algunos efectos inmediatos observados son dolor, hemorragia, insuflación por gas y edema; Los efectos a corto plazo son: formación de ampollas, infección, granuloma piógeno, y reacciones sistémicas como fiebre; Los efectos a largo plazo son: hiperplasia pseudoepiteliomatosa, hiperpigmentación, leucodermia, daño a los nervios, pelo anormal, estenosis de orificios naturales por la retracción de la cicatriz y necrosis cutánea. Los efectos post-tratamiento dependen de la técnica de congelación llevada a cabo en el sitio, de la afección, del tamaño de la lesión a tratar y de la respuesta individual del paciente. A pesar de la aparición de complicaciones y efectos secundarios, la criocirurgia debe ser utilizada cuando esté indicado, puesto que, cuando realizada correctamente, sus beneficios superan los de la técnica quirúrgica convencional.

Palabras Clave: crioterapia, crioablación, congelación, canina, felina.

INTRODUÇÃO

O frio tem sido utilizado como método de tratamento na medicina há milhares de anos. Baixas temperaturas podem causar dano tecidual por uma série de mecanismos, incluindo destruição direta do tecido e por meio da indução de resposta imune. Desde o século passado, a criocirurgia tem sido utilizada no tratamento de lesões teciduais benignas, pré-malignas e malignas (1).

A criocirurgia, muitas vezes referida como crioterapia ou crioablação, é uma técnica cirúrgica que emprega o frio em temperaturas criogênicas para destruir tecidos ou células indesejáveis. Uma das suas vantagens é a destruição celular localizada, minimizando o dano ao tecido saudável adjacente ao local congelado. Contudo, a natureza minimamente invasiva da criocirurgia ocasiona algumas dificuldades no controle do procedimento. À medida que o

frio se propaga pela sonda, a extensão do tecido afetado pelo congelamento não pode ser determinada exatamente pelo cirurgião, resultando na perda de precisão e de controle (2).

Em todos os métodos de tratamento cirúrgico a complicação é inerente ao procedimento, e a criocirurgia não é exceção. Muitos efeitos, relacionados aos métodos de congelamento empregados na rotina clínica, produzem alterações inflamatórias importantíssimas para o sucesso do tratamento. Todavia os efeitos colaterais e as complicações não podem ser tratados como entidades separadas da criocirurgia. Os efeitos pós-tratamento dependerão da técnica de congelamento realizada no local, da patologia presente, do tamanho da lesão a ser tratada e da resposta individual do paciente (3).

Neste trabalho, objetiva-se descrever, na forma de revisão de literatura, os efeitos da criocirurgia, assim como suas reações e complicações pós-tratamento decorrentes da sua aplicação como forma de terapia curativa, adjuvante, ou paliativa em cães e gatos.

REVISÃO DE LITERATURA

Equipamentos e Técnicas

Alguns criógenos já foram utilizados na criocirurgia, tais como: dióxido de carbono, enxofre, acetona, óxido nitroso, “freons”, mas foram abandonados devido às suas desvantagens (temperatura atingida insatisfatória, uso restrito, área de destruição tecidual pequena) (4). Há décadas que o nitrogênio líquido é o criógeno mais utilizado (5) pois sua temperatura chega a até $-195,8^{\circ}\text{C}$ (6).

Há três técnicas criocirúrgicas que podem ser utilizadas: aplicação do criógeno com swab/cotonete, spray com ponteira aberta/ponteira de cone confinado e ponteira de sonda fechada (1). Embora a literatura considere a técnica que faz uso de swab para aplicação do criógeno, a mesma tem como principal desvantagem a pequena profundidade de congelamento atingida, chegando a no máximo 2-3 mm (7,8), por este motivo, atualmente, não se aplica rotineiramente nos procedimentos criocirúrgicos. A maioria dos profissionais utiliza a aplicação de nitrogênio líquido com o equipamento portátil que permite a armazenagem do criógeno e um bocal para acoplar as sondas.

Na técnica de spray utilizando ponteiros abertos, pode-se aplicar o spray diretamente no centro da lesão, em padrão espiral (iniciando no centro da lesão e avançando em espiral para periferia), em padrão “pincel” (movendo a ponteira de um lado da lesão até o outro como se estivesse pintando uma parede).

Uma variação da técnica de spray é a que faz uso de crioplate ou ponteiros de cone confinado (cryochamber), que devem ter tamanho apropriado para a lesão aonde serão colocados, fazendo com que o spray do criógeno fique confinado à área da ponta do cone. Essa técnica permite atingir mais rapidamente uma maior profundidade no congelamento e o criógeno é aplicado diretamente no tecido alvo. Graças ao uso do cryochamber (ponteira de spray confinado), a utilização de cones com este objetivo também está em desuso.

Podem ser utilizadas também sondas fechadas, cuja ponteira é congelada pela circulação interna do criógeno e aplicada ainda congelada diretamente na lesão, onde a extremidade da ponteira atinge a temperatura de 70°C negativos; as ponteiros estão disponíveis em uma grande variedade de tamanhos e formatos, permitindo diferentes tipos de congelamento em tecidos alvos diversos.

Criobiologia – Mecanismos de Injúria Tecidual

A criocirurgia envolve a retirada de calor a partir de um tecido para um dissipador de calor, o criógeno. Muitas mudanças ocorrem no tecido tratado criocirúrgicamente, que levam à destruição da lesão cutânea, e as respostas teciduais variam de acordo com a intensidade da

injúria criogênica. Pouca injúria produz apenas uma resposta inflamatória, mas uma boa injúria criogênica é a que pode causar destruição do tecido (9).

Sabe-se que o tecido alvo deve atingir de -40°C a -60°C para que ocorra dano máximo efetivo e o nitrogênio líquido é o único criógeno capaz de fazer com que o tecido atinja essas temperaturas em regiões mais profundas (9,10). Quando o criógeno é aplicado, o contorno da criolesão apresenta-se em forma de cúpula até uma profundidade de 6mm e torna-se piramidal à medida que a profundidade aumenta (11). A difusão lateral do gelo a partir do bordo da sonda ou do cone é aproximadamente igual à profundidade do congelamento (12).

O efeito destrutivo no tecido pelo congelamento é resultado do mecanismo imediato e tardio (13). As causas imediatas estão relacionadas com o efeito do resfriamento e congelamento (formação de cristais de gelo intra e extracelulares). O efeito tardio da injúria pelo congelamento pode durar de horas a dias após a finalização da criocirurgia, e o mecanismo dominante neste caso é a estase vascular, causadora da anóxia tecidual (14,15).

A formação de gelo extracelular, conhecida como “efeito da solução” é tida como a maior causadora de morte celular pelo congelamento (16). A destruição celular pela cristalização extracelular ocorre em temperaturas entre -4 a -21°C , o gelo extracelular se forma, aumenta a concentração do soluto extracelular e com isso cria-se um meio hiperosmótico. Para que haja equilíbrio, a água sai da célula pela sua membrana por osmose. A perda de água desidrata a célula, lesando a membrana e organelas citoplasmáticas. Muitas vezes, mesmo que a célula perca toda a água a concentração extracelular ainda aumenta. Com isso, ocorre a criação de um gradiente entre os dois lados até um ponto em que o soluto do fluido extracelular acaba passando para dentro da célula. Essa passagem gera uma força mecânica nas células que acaba destruindo-as (17).

Quando as taxas de congelamento são altas e o tempo de congelamento é muito rápido, há menos tempo para formação de gelo extracelular e teoricamente haveria menos destruição celular. Entretanto, outro fenômeno ocorre: a formação de gelo intracelular. Nesse caso, não há tempo para a água sair da célula pela membrana e manter o equilíbrio osmótico. O equilíbrio é então alcançado pela formação de cristais de gelo tanto dentro quanto fora da célula. Na criobiologia a formação de núcleos heterogêneos de cristais intracelulares ocorre a -15°C , enquanto núcleos homogêneos são formados a -40°C . Assim que a temperatura vai caindo, a solução intracelular se torna termodinamicamente super-resfriada e cada vez mais instável (16,18). Essa instabilidade faz com que haja fusão das moléculas de água permitindo a formação de cristais de gelo próximo à membrana celular; quando o descongelamento é lento, os cristais de gelo aumentam de tamanho e há uma expansão do volume intracelular, fenômeno chamado recristalização, ocasionando uma ruptura irreversível da membrana (19). Ao mesmo tempo, há lesão nas organelas intracelulares, que perdem a função, e com isso, ocorre destruição das células no tecido tratado pela criocirurgia (17).

A inflamação e estase vascular após o tratamento também auxiliam na destruição do tecido (20). A estase vascular está restrita ao local de aplicação do criógeno e ocorre devido ao aumento de permeabilidade vascular resultando em hemoconcentração (21). Além disso, as reações imunológicas são necessárias para que a criocirurgia seja eficaz (22). Os possíveis mecanismos envolvidos na resposta imune são que as substâncias antigênicas, normalmente encontradas nas células e liberadas quando ocorre destruição celular, podem estar associadas a resposta antigênica durante a fase de congelamento (23).

O que já se sabe é que quanto mais rápida for a velocidade de congelamento, mais intenso será o grau de destruição celular e quanto mais lento for o descongelamento, por sua vez, maior será a morte celular. Já um congelamento lento seguido de um descongelamento rápido irá reduzir a morte celular causada pela criocirurgia (24-30).

Efeitos Imediatos

Muitos sinais, que podem ser interpretados como “efeitos colaterais” da criocirurgia, são esperados e considerados normais porque representam a progressão natural do processo fisiológico de congelamento do tecido. As complicações que ocorrem podem ser consequência de diversos fatores, tais como: paciente, tipo de doença, local da lesão, escolha da técnica, escolha do equipamento e cuidados no pós-tratamento.

Humanos relatam sensação de queimação durante o procedimento de criocirurgia, principalmente na hora do descongelamento e também pelo efeito do anestésico local quando utilizado. Deve-se fazer administração de analgésicos, inclusive nos animais que são submetidos à anestesia geral (pós-operatório), para redução da dor, uma vez que em estudo realizado em humanos submetidos à criocirurgia a dor foi classificada como leve a moderada (31,32).

Embora a maioria dos autores referencie hemorragia, o que observamos ao realizar a técnica são alguns pequenos sangramentos que podem ocorrer com a criocirurgia. A separação entre a superfície do tecido congelado e a ponteira da sonda fechada é muitas vezes a fonte de pequenos sangramentos. Isto pode ser evitado com a utilização de gel lubrificante na ponteira. Com a aderência, também denominada crioadesão, a ponteira deve ser descongelada antes de ser removida para evitar trauma tecidual, principalmente em mucosa (33). Outro ponto interessante, é que na presença de sangramentos efusivos, ou mesmo hemorragia, a técnica de criocirurgia torna-se ineficaz uma vez que não ocorre congelamento rápido e descongelamento lento (34).

A insuflação do tecido adjacente pelo gás do nitrogênio durante a criocirurgia ocorre quando o gás entra no espaço entre epiderme e subcutâneo na superfície do tecido. Essa insuflação não é um trauma permanente e normalmente se resolve nas primeiras 24 horas após a cirurgia. Se for necessário, pode ser feita uma leve pressão na área enfisematosa na tentativa de expelir o gás (35).

Na fisiopatologia do edema, observa-se o influxo de líquido o interstício, por aumento da permeabilidade capilar a proteínas plasmáticas e diminuição da pressão intersticial, com desequilíbrio entre forças hidrostáticas e oncóticas. Existem evidências significativas que mediadores bioquímicos também agem na formação do edema (36). Imediatamente após o trauma térmico ocorre liberação de histamina pelos mastócitos, possivelmente, por exposição ao colágeno no tecido acometido. Entretanto, níveis elevados de histamina são apenas transitórios, indicando que o mecanismo esteja envolvido somente na fase inicial do aumento da permeabilidade capilar (37,38).

Poucas horas após a lesão térmica, já se pode observar grande quantidade de neutrófilos na derme, atingindo o pico máximo nas vinte e quatro horas e decrescendo após setenta e duas horas. Os neutrófilos liberam diversos mediadores envolvidos na formação de edema e são a maior fonte de radicais livres que irão determinar a lesão endotelial, causadora do aumento da permeabilidade capilar (39). Os radicais livres também desnaturam e fragmentam o ácido hialurônico, o colágeno e outros elementos da matriz intersticial, contribuindo para o aumento da complacência do espaço intersticial (40).

Outros importantes mediadores liberados maciçamente, após a lesão térmica, são a prostaciclina (PGI₂ - vasodilatadora) e o tromboxano (TxA₂ - vasoconstrictor). A liberação de histamina e mediadores inflamatórios irá ativar o sistema cinina-caliceína, liberando bradicinina na circulação e aumentando a permeabilidade capilar (41).

O edema no tecido tratado criocirurgicamente aparece logo após o prurido (Figura 1). O tamanho do edema está relacionado a fatores como intensidade e quantidade de congelamento, o local da área tratada (áreas com pouca pele tem maior probabilidade de apresentar edema) e a resposta fisiológica individual à lesão. Corticóides podem ser utilizados em casos que apresentem edema exacerbado (como, por exemplo, em região periorbital), mas

haverá retardo na cicatrização (42). O edema é comum e normalmente se resolve em poucos dias após a criocirurgia (43).



Figura 1. Formação de edema e crostas secundária a tratamento criocirúrgico. **A.** Formação crostosa enegrecida em flanco abdominal de cão tratado com sessões de criocirurgia para carcinoma de células escamosas **B.** Felino após tratamento criocirúrgico de carcinoma espinocelular em plano nasal apresentando formação crostosa e edema do tecido da região aplicada.

Efeitos a Curto Prazo

No tratamento de lesões superficiais, como neoplasias benignas, formações de bolhas após a criocirurgia são esperadas e consideradas um processo benéfico. A separação entre epiderme e derme é necessária para o efetivo tratamento dessas lesões superficiais (Figura 2). Além disso, a bolha serve como um escudo protetor para o tecido abaixo que está em processo de cicatrização. Nos casos em que as bolhas são grandes e hemorrágicas, a drenagem do conteúdo e tratamento antibiótico tópico se fazem necessários para evitar contaminação e minimizar o desconforto do paciente (44).

As infecções nos sítios criocirúrgicos são raras, pois a maioria dos micro-organismos são destruídos pelo congelamento. Em humanos podem ocorrer nos indivíduos imunossuprimidos ou pacientes com diabetes mellitus não controlada. Outras possibilidades de contaminação são feridas que demoram a cicatrizar ou bolhas cobertas por crostas espessas. Em pacientes livres de outras condições patológicas, mas que apresentam infecção no local, ou nos imunossuprimidos, ou que estejam utilizando quimioterápicos, se faz necessário o uso de antibiótico via oral. Nos demais casos, antibioticoterapia tópica confere proteção antimicrobiana efetiva (1).

Por ser uma técnica menos cruenta e com menos chance de infecção secundária, é indicada para abordagem de lesões de difícil acesso e já contaminadas, tais como: em boca, interdígito, reto, períneo e áreas extensas para suturas (43,45,46).

Sangramento após a criocirurgia é incomum, mas pode ocorrer pela preservação dos elementos estromais do vaso sanguíneo com simultânea destruição das células tumorais pelo congelamento (Figura 3). Nos casos de sangramentos pequenos, deve-se pressionar o local por alguns minutos. Se o sangramento persistir, pode-se realizar sutura para garantir hemostasia (47). Nas áreas do tronco (tórax e abdome), bem como nos membros, a aplicação de bandagens são importantes para ajudar na compressão e tratamento do sangramento, podendo ser associadas ao uso de esponjas hemostáticas ou adrenalina tópica como meios de hemostasia (46).



Figura 2. Canino apresentando lesão eritematosa e formações bolhosas secundárias ao tratamento de dermatite actínica com criocirurgia.

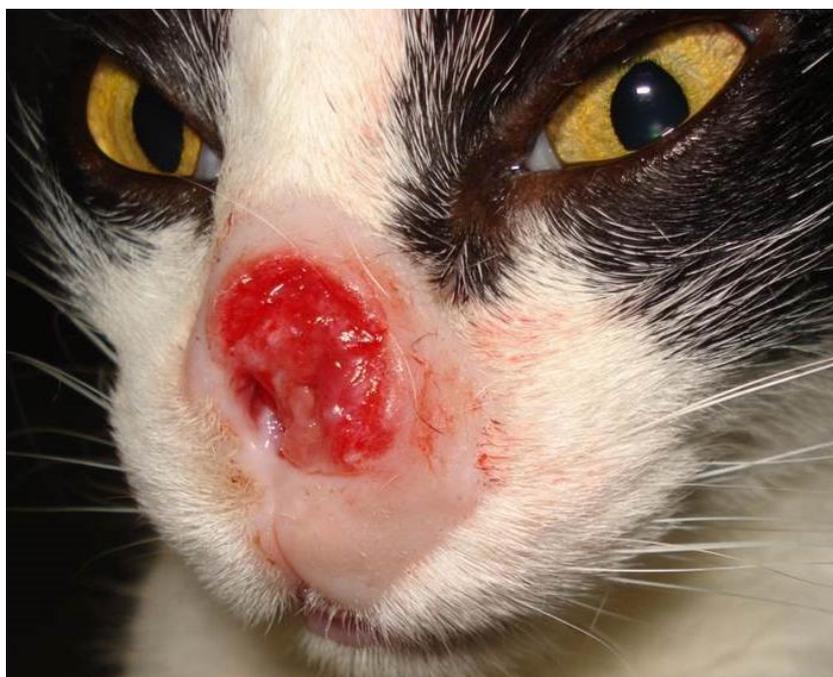


Figura 3. Felino apresentando lesão ulcerativa e sangramento em região nasal após aplicação de técnica de criocirurgia para tratamento de carcinoma espinocelular de plano nasal.

O granuloma piogênico é um processo proliferativo reacional, composto por tecido de granulação com extensa vascularização, provavelmente decorrente de irritação crônica de baixa intensidade, ou trauma (48). A formação do granuloma piogênico já foi observada em humanos após a remoção criocirúrgica de verrugas, carcinoma de células basais e dermatite actínica (35,49).

Em humanos foi observado que alguns pacientes submetidos à criocirurgia em lesões extensas apresentaram febre algumas horas após o término do procedimento (50). É recomendado o uso de antipiréticos e a resolução se dá em 36 horas.

Efeitos a Longo Prazo

Os melanócitos são destruídos entre -4 e -7° C, bem acima da temperatura geralmente alcançada pelo tecido tratado por criocirurgia (51). Com isso, perda na pigmentação é um problema comum após a criocirurgia. Apesar de o risco ser imprevisível, pacientes que possuem pele escura tem maior tendência a desenvolver hipopigmentação (leucodermia) e tem maiores chances de alterações pigmentares permanentes. Ciclos de congelamento mais longos e profundos normalmente são os causadores de hipopigmentação residual (52). A repigmentação começa tipicamente nas margens da lesão tratada (53).

A hiperpigmentação é um efeito colateral comum da criocirurgia, embora a alteração vagarosamente clareie. A alteração clássica de pigmentação é uma região central hipopigmentada circundada por um anel hiperpigmentado (Figura 4A) (54).

A hiperplasia pseudoepiteliomatosa é um padrão histológico de hiperplasia irregular benigna da epiderme associado a uma série de estímulos lesivos, tais como: irritação crônica, trauma, crioterapia e linfedema crônico (55). Raramente esta reação inflamatória ocorre após a criocirurgia, podendo ser confundida como recorrência da neoplasia tratada. O aparecimento ocorre em 3-4 semanas e melhora após vários meses sem que seja necessário tratamento (56).

A criocirurgia raramente causa dano a nervos graças à natureza resistente da bainha neural. Entretanto, algumas vezes, a enervação superficial pode ser afetada pela criocirurgia, nesses casos o frio causa hiperestesia. A perda permanente de função é rara, mas pode demorar até 1 ano para haver recuperação da função (57). Para evitar danos à bainha neural, deve-se evitar o congelamento direto e muito profundo dos locais próximos a nervos. Isso pode ser realizado com a movimentação contrária do tecido a ser tratado, afastando-o manualmente do tecido mais profundo; a injeção de anestésico local ou salina por debaixo da lesão pode ser utilizada, criando um balão que afaste a lesão das estruturas que estão abaixo (58).

Quando os folículos pilosos sofrem danos ocasionados pela criocirurgia (tratamentos de 15 segundos já podem induzir à lesão), não há mais crescimento dos pelos (Figura 4B). Em casos de tumores malignos localizados em áreas pilosas, essa complicação permanente se faz necessária para que haja completa destruição da neoplasia (1).

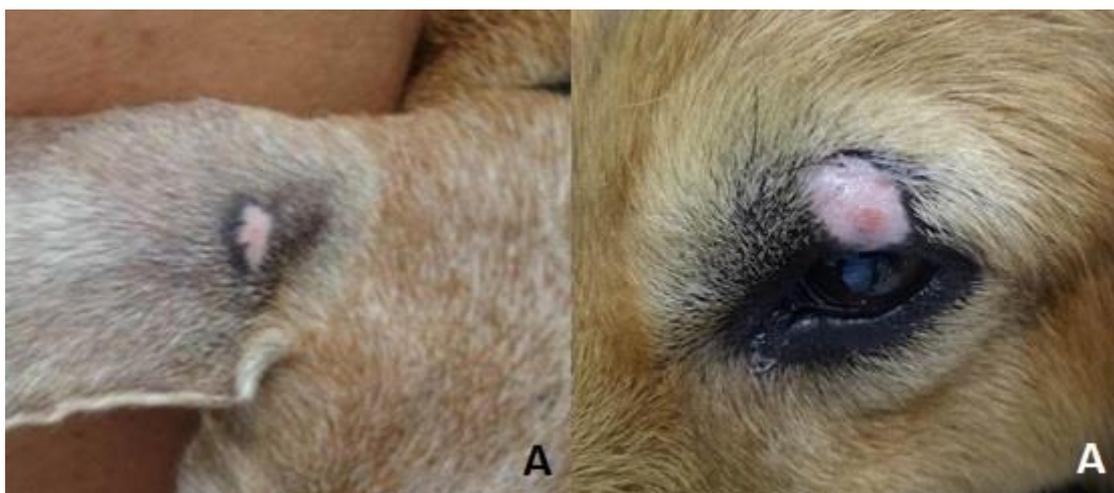


Figura 4. Hiperpigmentação e leucodermia. A. Canino apresentando anel hiperpigmentado circundando área de leucodermia após aplicação de criógeno em lesão próxima a base de pino. B. Alopecia e leucodermia após tratamento criocirúrgico de melanoma de pálpebra superior em cão.

A leucotriquia (branqueamento dos pelos) pode ser observada nos casos em que há destruição dos melanócitos, mas os folículos pilosos permanecem íntegros (Figura 5) (34,59).

O congelamento profundo, realizado principalmente em tumores malignos, geralmente resulta em formação de tecido cicatricial. Contudo, a preservação do estroma da derme permite uma apropriada regeneração da epiderme (60). A cicatriz pela hipertrofia da pele pode se desenvolver e o aparecimento se dá em aproximadamente 4 semanas após o tratamento. O tecido hipertrófico aparece no centro da lesão e tem aparência linear como se o tecido tivesse sido suturado. A maioria dessas cicatrizes não necessita tratamento, pois normalmente melhoram com o tempo (35).

Já foi observado que a retração cicatricial pode levar à estenose de orifícios naturais (Figura 6) que pode ser temporária ou permanente (43).



Figura 5. Após tratamento criocirúrgico para carcinoma espinocelular cutâneo em região distal de membro, este canino apresentou leucodermia, formação de cicatriz, hipotricose e leucotriquia.



Figura 6. A. Canino tratado com diversas sessões de criocirurgia apresentando retração cicatricial de lesão lítica infiltrativa em plano nasal direito. Observa-se a estenose quase completa da narina direita em virtude da presença de tecido cicatricial. B. Felino após tratamento com criocirurgia para carcinoma de células escamosas em plano nasal. Observa-se deformação e estenose de narina após necrose secundária ao tratamento pelo frio.

Como a pele é fina nos locais aonde há cartilagem, essas áreas são suscetíveis a sofrerem necrose pelo congelamento. Essa situação é incomum, mas pode ocorrer principalmente nos casos aonde se faz necessário o congelamento mais longo e profundo das

lesões malignas (Figura 7A) (33). Observamos esse risco de complicação nas criocirurgia em narinas (Figura 7B) e pinas de orelhas (Figura 7C) em animais portadores de carcinoma espinocelular.



Figura 7. Necrose cutânea após tratamento criocirúrgico. **A.** Canino tratado com múltiplas sessões de criocirurgia para melanoma cutâneo disseminado apresentando necrose epidérmica devido ao tratamento intenso e profundo. **B.** Felino apresentando necrose de septo nasal esquerdo após criocirurgia. **C.** Felino após tratamento criocirúrgico para carcinoma basocelular apresentando necrose em pina de orelha direita. **D.** Necrose de tecido conjuntivo e fascia muscular em membro pélvico de cão após diversas sessões de criocirurgia. **E.** Animal da figura D após tratamento tóxico. (Figura 7B gentilmente cedida pelo Dr. Cristiano Gomes)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criocirurgia tem sido considerada uma ferramenta muito útil para o tratamento de diversas doenças, principalmente nas áreas de oncologia e dermatologia veterinária. Como em qualquer técnica, ocorrem reações esperadas no pós-tratamento que contribuem para o resultado final, e também é passível de complicações decorrentes de inúmeros fatores (paciente, doença, escolha da técnica, tempo de congelamento/descongelamento, cuidados após a criocirurgia).

Apesar dos possíveis efeitos indesejáveis, se a criocirurgia está indicada, deve ser realizada pois os benefícios de seu uso (quando executada corretamente), são maiores quando comparado ao tratamento cirúrgico convencional

REFERÊNCIAS

1. Graham GF, Barham KL. Cryosurgery. *Curr Probl Dermatol*. 2003;15:223-50.
2. Chua KJ, Chou SK, Ho JC. An analytical study on the thermal effects of cryosurgery on selective cell destruction. *J Biomech*. 2007;40:100-16.
3. Dawber RPR. Cryosurgery: complications and contraindications. *Clin Dermatol*. 1990;8:108-14.
4. Dewar L. *Collected papers of Sir James Dewar*. Cambridge: Cambridge University Press; 1927.
5. Bojrab MJ. Veterinary cryosurgery: an overview. *Norden News*. 1978;53:16-20.
6. Ameerally PJ, Colverg GB. Cutaneous cryotherapy in maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:1785-92.
7. Burke WA, Baden TJ, Wheeler CE, Bowdre JH. Survival of herpes simplex virus during cryosurgery with liquid nitrogen. *J Dermatol Surg Oncol*. 1986;12:1033-5.
8. Jones SK, Darville JM. Transmission of virus by cryotherapy and multi-use caustic pencils: a problem for dermatologists? *Br J Dermatol*. 1989;12:481-6.
9. Gage AA, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology*. 1998;37:171-86.
10. Le Pivert P. Predictability of cryonecrosis by tissue impedancemetry. *Low Temp Med*. 1977;4:129-38.
11. Breitbart EW, Dachow-Siwiec E. Scientific basis. *Clin Dermatol*. 1990;8:5.
12. Torre D. Understanding the relationship between lateral spread of freeze and depth of freeze. *J Dermatol Surg Oncol*. 1979;5:51.
13. McCarty TM, Kuhn JA. Cryotherapy for liver tumors. *Oncology*. 1998;12:7.
14. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984;247:125-42.

15. Reed KL, Brown TD, Conzemius MG. Focal cryogen insults for inducing segmental osteonecrosis: computational and experimental assessments of thermal fields. *J Biomech.* 2003;36:1317-26.
16. Orpwood RD. Biophysical and engineering aspects of cryosurgery. *Phys Med Biol.* 1981;26:555-75.
17. Muldrew K, McGann LE. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys J.* 1994;66:532-41.
18. Rubinsky B. Cryosurgery. *Annu Rev Biomed Eng.* 2000;2:157-87.
19. Hoffmann NE, Bischof JC. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology.* 2002;60:40-9.
20. Johnson JF. Immunologic aspects of cryosurgery: potential modulation of immune recognition and effector cell maturation. In: Breitbart E, Dachow-Siwiec E. *Clinics in dermatology: advances in cryosurgery.* New York: Elsevier; 1990. p.39.
21. Seim HB. Mechanisms of cold-induced cellular death. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1980;10:755-62.
22. Ablin RJ. Current concepts in cryoimmunology. In: Zacarian SA. *Cryosurgery for skin cancer and cutaneous disorders.* St Louis: Mosby; 1985. p.307-12.
23. Leopard PJ. Cryosurgery, and it's application to oral surgery. *Br J Oral Surg.* 1975;13:128-52.
24. Lane JG. Practical cryosurgery: an introduction for small animal clinicians. *J Small Anim Pract.* 1974;15:715-25.
25. Greiner TP, Liska WD, Withrow SJ. Cryosurgery. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1975;5:565-81.
26. Holmberg DL. Criocirurgia. In: Slatter D. *Manual de cirurgia de pequenos animais.* 3a ed. São Paulo: Manolo; 2007. p.222-7.
27. Withrow SJ. Cryosurgery. In: Withrow SJ, MacEwen EG. *Small animal clinical oncology.* 4th ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2007. p.275-9.
28. Baust JG, Gage AA, Robilotto AT, Baust JM. The pathophysiology of thermoablation: optimizing cryoablation. *Curr Opin Urol.* 2009;19:127-32.
29. Eurides D, Daleck CR, Silva LAF, Silva MSM. Criocirurgia. In: Daleck CR, De Nardi AB, Rodaski S. *Oncologia em cães e gatos.* São Paulo: Roca; 2009. p.196-203.
30. Erinjeri J, Clark TWI. Cryoablation: mechanism of action and devices. *J Vasc Interv Radiol.* 2010;21:187-91.

31. Keefe M, Dich DC. Cryotherapy of hand warts: a questionnaire survey of “consumers.” *Clin Exp Dermatol.* 1990;15:260-3.
32. Poziomczyk CS, Koche B, Dornelles MA, Dornelles SIT. Avaliação da dor em criocirurgia de ceratosesactínicas. *An Bras Dermatol.* 2011;86:645-50.
33. Graham GF. Cryosurgery for benign, premalignant and malignant lesions. In: Wheeland RG. *Cutaneous surgery.* Philadelphia: Sanders; 1994. p.835.
34. Castro JLC, Silveira AMM, Castro VSP, Santalucia S, Ferreira AA, Huppess RR, et al. Criocirurgia: revisão de literatura. *Medvep Dermat.* 2013;3:11-25.
35. Elton RF. Complications of cutaneous cryosurgery. *J Am Acad Dermatol.* 1983;8:513.
36. Lund T, Onarhei H, Wiig H, Reed RK. Mechanisms behind increased dermal inhibition pressure in active edema. *Am J Physiol.* 1989;256:940-8.
37. Leappe LL. Initial changes in burns: tissue changes in burned and unburned skin of rhesus monkeys. *J Trauma.* 1970;10:488-92.
38. Yoshika T, Monafó WW, Ayvazian VH, Deitz F, Flynn D. Cimetidine inhibits burn edema formation. *Am J Surg.* 1978;136:81-8.
39. Mulligan MS, Till GO, Smith CW, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, et al. Role of leukocyte adhesion molecules in lung and dermal vascular injury after thermal trauma of skin. *Am J Pathol.* 1994;144:1008-15.
40. Li J, Lai-Fook SJ. Effect of hyaluronidase on interstitial pressure response to edema in air-inflated rabbit lung. *Respir Physiol.* 1992;89:133-46.
41. Diess DL, Collins JN, Ardell JL, Townsley MI, Taylor AE, Ferrara JJ. Modulation of microvascular permeability by 21-aminosteroids burn injuries. *J Burn Care Rehabil.* 2000;21:406-13.
42. Kuflik EG, Webb W. Effects of systemic corticosteroids on post-surgical edema and other manifestations of the inflammatory response. *J Dermatol Surg Oncol.* 1985;11:464.
43. Goloubeff B, Oliveira HP. Tratamento criocirúrgico de tumores e de fístulas, em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1999;51:463-70.
44. Kuflik EG. Cryosurgery for cutaneous malignancy. *Dermatol Surg.* 1997;23:1081-7.
45. Hancox JG, Graham GF, Yosipovitch G. Hemorrhagic bullae after cryosurgery in a patient with hemophilia A. *Dermatol Surg.* 2003;29:1084-6.
46. Lucas R, Larsson CE. O uso da criocirurgia na dermatologia veterinária. *Clin Vet.* 2007;69:74-84.
47. Castro JC, Castro VSP, Ramos SD, Huppess R, Nardi AB, Raiser AG, et al. Criocirurgia no tratamento de carcinoma de células escamosas em cão. *Rev Colombiana Cienc Anim.* 2013;5:213-21.

48. Jafarzadeh H, Sanatkhani M, Mohtasham N. Oral pyogenic granuloma: a review. *J Oral Sci.* 2006;48:167-75.
49. Cecchi RM, Giomi A. Pyogenic granuloma as a complication of cryosurgery for venous lake. *Br J Dermatol.* 1999;140:373-4.
50. Zacarian SA. Cryogenics: the cryolesion and the pathogenesis of cryonecrosis. In: Zacarian SA. *Cryosurgery for skin cancer and cutaneous disorders.* St Louis: Mosby; 2007. p.2-3.
51. Gage AA, Meenaghan MA, Natiella JR, Greene GW. Sensitivity of pigmented mucosa and skin to freezing injury. *Cryobiology.* 1979;16:348-361.
52. Zhou GY, Zhang ZY, Lin GC, Gu JZ, Qiu WL. Evaluation of cryosurgery for the management of oral malignant mucomembranous melanoma: a survey of 107 cases reports. *Shangai Kou Qiang Yi Xue.* 1999;8:92-3.
53. Lubritz RR. Cryosurgical approach to benign and precancerous tumors of the skin. In: Zacarian SA. *Cryosurgery for skin cancer and cutaneous disorders.* St Louis: Mosby; 1985. p.44-8.
54. Bohler-Sommeregger K, Schuller-Petrovic S, Knobler R, Neumann PR. Reactive lentiginous hyperpigmentation after cryosurgery for lentigomaligna. *J Am Acad Dermatol.* 1992;27:523-6.
55. Kluger N, Durand L, Thoumin C, Plantier F, Cotten H, Berteloot E, et al. Pseudoepitheliomatous epidermal hyperplasia in tattoos. *Am J Clin Dermatol.* 2008;9:337-40.
56. Kadunc B, Palermo E, Addorf F, Metsavaht L, Rabello L, Mattos R, Martins S. *Tratado de cirurgia dermatológica, cosmiatria e laser: da Sociedade Brasileira de Dermatologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. p.537-54.
57. Dawber RPR. Cold kills! *Clin Exp Dermatol.* 1988;13:137-50.
58. Nix TW. Liquid nitrogen neuropathy. *Arch Dermatol.* 1965;92:185.
59. Queiroz GF, Matera JM. Criocirurgia no tratamento de tumores. *Rev Educ Contin CRMV-SP.* 2004;6:53-62.
60. Shepperd JP, Dawber RPR. Wound healing and scarring after cryosurgery. *Cryobiology.* 1984;21:157-69.

Recebido em: 23/02/2016

Aceito em: 07/01/2017

PROCESSO CARCINOGENÉTICO DAS PRÓSTATAS CANINAS: VIA WNT CANÔNICA E SEU ESTUDO COMPARADO

Priscila Emiko Kobayashi^{1*}
Carlos Eduardo Fonseca-Alves¹
Luis Gabriel Rivera-Calderón²
Renée Laufer-Amorim¹

RESUMO

A espécie canina apresenta semelhanças com a espécie humana com relação às lesões prostáticas, sendo a única espécie a apresentar tumores espontâneos e com frequência, desse modo representa um importante modelo para estudo comparativo de afecções desta glândula. O desenvolvimento das neoplasias prostáticas é multifatorial e dentre eles, alterações genéticas e epigenéticas estão envolvidas, portanto o cão pode ser um modelo natural e espontâneo para o estudo das lesões pré neoplásicas e neoplásicas da próstata, com futuro alto potencial de ser utilizado como modelo em testes pré-clínicos de medicamentos. Uma das vias importantes para o desenvolvimento dos carcinomas prostáticos é a WNT canônica, dependente da proteína β -catenina. Nesta revisão, abordaremos o papel desta via e sua participação na carcinogênese prostática, importante em humanos e cães, além de algumas proteínas envolvidas na regulação da mesma.

Palavras-chave: carcinoma prostático canino, oncologia comparada, cães, via WNT.

CARCINOGENIC PROCESS OF CANINE PROSTATE: WNT CANONICAL PATHWAY AND ITS COMPARATIVE STUDY

ABSTRACT

Prostate of dogs have similar lesions to that observed in human and is the only species other than man which frequently displays spontaneous prostatic tumors. In this way, the dog represent an important model of studying different prostatic affections. The prostate cancer development is multifactorial and among them, genetic and epigenetic alterations are involved. The dog can be a natural and spontaneous model to study preneoplastic and neoplastic lesions, with potential future studies as models for pre-clinical tests. One of important pathway to prostate carcinogenesis is beta catenin dependent canonical WNT pathway. In this paper, we review the role of this pathway in prostate carcinogenesis, important in humans and dogs, besides some regulatory proteins involved in this pathway.

Keywords: canine prostate carcinoma, compared oncology, dogs, WNT pathway.

¹ Departamento de Clínica Veterinária. Patologia Veterinária. FMVZ – Unesp.

² Departamento de Patologia Veterinária. Patologia Veterinária. FCAV – Unesp.

* Contato para correspondência.

PROCESO CARCINOGENICO DE LAS PRÓSTATAS CANINAS: VIA WNT CANÓNICA Y SU ESTUDIO COMPARADO

RESUMEN

La especie canina presenta semejanza con la especie humana con relación a las lesiones prostáticas. Es la única especie en presentar tumores espontáneos con frecuencia, de esta manera representa un importante modelo para estudio comparativo de afecciones de la glándula. El desarrollo de las neoplasia prostáticas es una enfermedad con causas multifactoriales, entre estas, alteraciones genéticas y epigenéticas están involucradas. Por lo tanto, el perro puede ser un modelo natural y espontaneo para el estudio de lesiones pre-neoplásicas e neoplásicas de próstata canina. En el futuro, podrá ser utilizado como modelo en pruebas pre-clínicas de medicamentos, como ya fue realizado para osteosarcoma, por ejemplo. Una de las vías importantes para el desarrollo de los carcinomas prostáticos es la WNT canónica dependiente de la proteína β -catenina. En esta revisión abordaremos el papel de esta vía y su participación en la carcinogénesis prostática, importante en humanos y perros, además de algunas proteínas involucradas en la regulación de la misma.

Palabras clave: Carcinoma prostático canino, oncología comparada, perros, via WNT.

INTRODUÇÃO

A próstata é a única glândula sexual do cão e possui dois lobos: direito e esquerdo, com formato ovoide, e envolve a uretra caudal ao colo da vesícula urinária (1). Em cães, notam-se afecções prostáticas espontâneas semelhantes aos humanos: hiperplasia prostática benigna (HPB), atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (2) e carcinoma prostático (CaP) (3).

No Brasil, são esperados para o ano de 2016, 61.200 mil novos casos, sendo a segunda neoplasia mais incidente em homens, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma (4).

Os cães domésticos são considerados excelentes modelos para estudos de doenças e neoplasias em humanos, bem como o tratamento, a exemplo de linfomas, carcinoma mamário, osteossarcoma, melanoma e sarcoma de partes moles (5). Aproximadamente 400 doenças genéticas semelhantes aos humanos estão definidas, tais como câncer, doenças cardíacas e neurológicas. Devido aos cães e o homem dividirem o mesmo ambiente, este fato contribui para o estudo dos fatores ambientais e evolução das doenças (6). Por meio de um estudo epidemiológico com linfoma canino, Zanini et al. (7) correlacionaram a poluição advinda dos transportes veiculares com o desenvolvimento dos linfomas caninos. Em seu estudo os autores avaliaram na cidade de São Paulo as regiões com maior incidência de casos de linfoma em cães e compararam com os dados humanos e concluíram que as regiões coincidem nas duas espécies, uma evidência que os mesmos fatores devem estar causando a doenças no homem e no cão.

A ocorrência natural de neoplasias em animais contribui para os estudos em angiogênese, oncogênese, metástases e mecanismos de iniciação e promoção molecular (5).

Os modelos em estudos de câncer prostático têm aumentado o conhecimento sobre a doença, tais como, grandes variedades de modelos em ratos transgênicos, xenoenxertos e inativação gênica (8), além de estudos em cães, devido às suas semelhanças ao homem, em relação ao desenvolvimento e curso clínico da doença (9).

Em meados do século 20, iniciaram-se os estudos retrospectivos com neoplasias prostáticas em animais de companhia e a escolha da próstata canina foi em consequência às semelhanças anatômicas com a próstata humana, além de o cão ser o único grande mamífero a

apresentar incidência significativa em neoplasias prostáticas espontâneas (5). Similarmente aos humanos, os cães apresentam neoplasias prostáticas geralmente quando idosos e o crescimento frequentemente é expansivo e exofítico. Além disso, os carcinomas prostáticos em ambos têm uma grande propensão para metastatizar em ossos (3).

As pesquisas sobre as neoplasias prostáticas são de extrema relevância para melhor compreensão sobre o desenvolvimento da doença, assim, os modelos animais vêm para auxiliar nesse processo (9). Os estudos com marcadores moleculares e vias da carcinogênese prostática podem adicionar dados às informações clínicas, diagnósticas e terapêuticas, podendo inclusive prever a progressão tumoral em um estágio inicial do câncer (10).

Uma das vias de sinalização amplamente estudada na oncologia humana é a WNT/ β -Catenina canônica, que participa de processos importantes na embriogênese e patogênese (11,12). A desregulação da sinalização da WNT ativa, de forma desordenada, alguns genes alvo desta via (13), podendo levar a síndromes múltiplas hereditárias e câncer, inclusive o prostático (14). O passo chave para essa regulação, envolve um complexo de destruição da β -catenina, principal mediador da via WNT no núcleo (12,14). Quando não há sinalização WNT este complexo, que se constitui pelo APC (*adenomatous polyposis coli*) e outras proteínas, degrada a β -catenina presente no citosol e impede seu acúmulo (12,15). A metilação do APC na próstata humana é uma das alterações epigenéticas estudadas e associadas com mortalidade (16), e possivelmente correlacionada com a não degradação da β -catenina no citoplasma, em humanos (17).

A β -catenina também é um componente essencial no complexo de adesão celular com a E-caderina na superfície celular, sendo importante na formação e função da glândula prostática (18). Durante a carcinogênese, a ausência de E-caderina e β -catenina na membrana está associada com invasão ao tecido adjacente e metástase, observado em cães (19) e humanos (20). Em cães, também é abordada a dinâmica da E-caderina durante o ciclo celular e carcinogênese, em que pode ocorrer perda e ganho de expressão durante o desenvolvimento do câncer prostático (21). Além disso, a entrada no ciclo celular para posterior proliferação se dá com a diminuição da E-caderina, o que poderia ocorrer na proliferação de células do CaP e não em células em repouso cancerígenas, justificando assim a heterogeneidade de expressão nos CaP (21). O papel da E-caderina em cães também é demonstrado em lesões pré-neoplásicas as quais são semelhantes em humanos, com perda de expressão membranosa quando comparada às próstatas normais e hiperplásicas (22).

REVISÃO DE LITERATURA

ANATOMIA

A próstata canina é uma glândula bilobulada, com elementos glandulares e estromais, possui formato redondo a ovoide, sulco dorsal e ventral, circunda a uretra caudal ao colo da vesícula urinária e é recoberta por uma cápsula fibromuscular. Sendo esta, a única glândula acessória sexual do cão (1,23). Em animais jovens, a próstata se localiza predominantemente na região pélvica, porém, com a maturidade sexual e consequente aumento de tamanho em razão da elevada concentração da testosterona sanguínea, a glândula assume uma posição mais abdominal (24).

HISTOLOGIA

A próstata é uma glândula sexual dos cães machos e apresenta variação histológica de acordo com a maturidade sexual do animal. Basicamente, é composta por um epitélio limitado com por uma ou duas camadas de células cuboides a colunares (25). Há ácinos desenvolvidos

e projeções digitiformes para o interior do lúmen. O estroma é fibroso, por vezes contendo septos de músculo liso, alterando-se de acordo com a maturidade sexual (26).

ATROFIA INFLAMATÓRIA PROLIFERATIVA (PIA)

A PIA é uma lesão prostática, considerada uma lesão pré neoplásica na espécie humana (27) e canina (2,21). Caracteriza-se por epitélio prostático displásico e atrófico com mais de uma camada celular atípica, associado a processo inflamatório mononuclear intersticial, classificadas histologicamente em difuso e focal (2).

Há uma estimativa que 20% das neoplasias prostáticas humanas são resultantes das inflamações crônicas (28). A hipótese que a inflamação pode estar relacionada com o progresso para um carcinoma prostático é devido ao microambiente tumoral favorável (29).

A baixa prevalência de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) nas lesões prostáticas em cães (30) foi representada também em estudo prévio da nossa equipe (21) o qual revelou ausência desta lesão nos fragmentos prostáticos estudados e alta frequência de PIA.

NEOPLASIA PROSTÁTICA

Dentre as neoplasias prostáticas caninas, relatou-se carcinoma prostático (CaP) como a mais comum, além de carcinoma de células de transição, carcinoma de células escamosas, fibrossarcoma, leiomiossarcoma, e raramente linfoma (31).

Ainda é desconhecida a origem celular precisa dos carcinomas prostáticos, podendo provir tanto do epitélio glandular quanto ductular ou urotélio da uretra prostática (32). Alguns autores citam a correlação das células basais com o surgimento direto das lesões prostáticas, além de apresentarem um importante papel no desenvolvimento dos CaP (21). Em estudo de Matsuzaki et al. (33) comparando neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN) e próstatas caninas normais, revelou por método imuno-histoquímico uma marcação positiva maior para *p63* nas células basais das neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN), diminuição focal na marcação para Receptor de Andrógeno (AR) e aumento da marcação para Ki67, sugerindo um papel importante das células basais na carcinogênese e sua evolução no câncer prostático independente de receptor de andrógeno, além de colaborar para hipótese de que as células tronco podem estar localizadas no compartimento basal da próstata.

Os CaP são tumores altamente invasivos e malignos que acometem cães castrados e inteiros. Há relatos de metástases em ossos, pulmão, linfonodos, fígado, baço, intestino grosso, vesícula urinária, coração, rins e glândulas adrenais, sendo que nos casos de metástases ósseas está relacionado com carcinomas prostáticos de alto grau (1).

CARCINOGENESE

As causas do câncer prostático ainda não estão todas estabelecidas, porém fatores genéticos e epigenéticos, ambientais, hormonais, infecção crônica, inflamação, entre outros, estão sendo estudados e melhor avaliados na patogenia da lesão (27). Em consequência da complexidade de fatores etiológicos envolvidos, o tratamento para o câncer prostático em pacientes humanos também é variável, de acordo, por exemplo, com a idade do paciente, graduação tumoral e condição geral do paciente (34).

Em humanos, 20% das neoplasias em adultos estão associadas com inflamação desencadeadas por um fator ambiental, infeccioso ou ambos, e nas neoplasias prostáticas também há evidências dessa mesma relação na etiopatogenia em um quinto das neoplasias prostáticas (26,28).

O processo inflamatório pode iniciar o processo de carcinogênese por acarretar dano celular e genômico, criar um microambiente tumoral favorável para a replicação celular, tumorigênese e reparação tecidual, desencadeando substituição celular (35).

Fatores ambientais e dieta também têm sido estudados na correlação da carcinogênese em neoplasias prostáticas e mamárias em humanos (36). Enquanto as consequências moleculares, devido ao avançar da idade, não estão bem estabelecidas, outros estudos têm sido feito com expressão gênica relacionado com a idade, dentre eles genes envolvidos no estresse oxidativo e morte celular (37).

As pesquisas relacionadas com a carcinogênese facilitam as estratégias relacionadas com prevenção, diagnóstico e tratamento das neoplasias prostáticas. Além de que os estudos correlacionados com epidemiologia e aspectos moleculares poderão ser analisados sob influência da dieta, ambiente e fatores possivelmente carcinogênicos, e assim avaliar as possíveis intervenções terapêuticas durante o desenvolvimento das neoplasias prostáticas (37).

β-CATENINA

A proteína β-catenina encontra-se predominantemente em três localizações: na membrana plasmática associada a E-caderina, no núcleo onde promove a transcrição de genes alvo com os fatores de ligação ao DNA (Tcf/Lef) e no citoplasma associado a um complexo de multi proteínas formados basicamente por GSK3, AXIN e APC (38). A proteína β-catenina está envolvida basicamente em dois processos independentes: adesão celular e transdução de sinal (39).

Na membrana plasmática, a ligação da β -catenina com caderinas é importante para a organização estrutural e função das caderinas (40), além de que os níveis e localização celular da β-catenina também são controlados pela E-caderina (38). A β-catenina liga-se por meio do domínio intracelular da E-caderina de forma direta e a α-catenina liga-se de forma indireta por meio de sua ligação com a β-catenina (41,42).

A perda da β-catenina na membrana está relacionada com a progressão tumoral (43), invasão e metástase prostática canina (19).

A desregulação da via de sinalização WNT gera excessivo acúmulo de β-catenina nuclear e ativação desapropriada de genes alvo, causando diversas doenças inclusive o câncer (13).

E-CADERINA

As caderinas são glicoproteínas localizadas na transmembrana que fazem a mediação da adesão intercelular na presença do cálcio extracelular (42). A E-caderina possui três domínios: extracelular, transmembrana e citoplasmático (44). A ligação inter epitelial da E-caderina serve de mediador para adesão celular em tecidos secretórios como próstata e glândula mamária, garantindo a manutenção da morfologia tecidual e sua diferenciação (45).

A redução da adesão celular resulta em perda da polaridade celular e altera a estrutura histológica do tecido (45). A perda da E-caderina na membrana tem sido associada com a transição epitelial-mesenquimal, em que ocorre a mudança reversível do fenótipo celular de epitelial para mesenquimal, facilitando assim a migração celular (18) (46). Além disso, a E-caderina presente na membrana citoplasmática funciona como um regulador negativo da via WNT canônica, pois está ligada a β-catenina. Porém, com a diminuição da E-caderina, a β-catenina que estava presente na membrana citoplasmática se torna livre e acumula no citoplasma, possibilitando a translocação para o núcleo (20).

O gene da E-caderina, CDH1, está localizado no cromossomo 16q22, em humanos, e raramente encontra-se mutado, portanto, o mecanismo da diminuição de expressão proteica é

controverso, incluindo, além da mutação, a metilação do DNA e modificações pós translacional (47).

Além disso, a via WNT pode induzir o aumento dos membros da família Snail (repressor da E-caderina) e, conseqüentemente, diminui a expressão de E-caderina (48).

APC

O gene *APC* é um supressor tumoral, a expressão proteica na próstata humana é relatada e amplamente envolvido no início do desenvolvimento dos carcinomas de cólon (48,49). Foram descritas frequentes perdas de alelo no locus *APC*, 5q21 em neoplasias prostáticas primárias avançadas no homem (50). As alterações tanto somáticas quanto promotoras de hipermetilação do gene *APC* foram identificadas em neoplasias prostáticas primárias e metastáticas (51). Richiardi et al. (52) encontraram um aumento de 50% de risco de mortalidade em câncer prostático correlacionado com a metilação do gene *APC* em tecido prostático.

A proteína APC faz parte do complexo de destruição da β -catenina presente no citoplasma, promovendo a fosforilação da β -catenina e orientando-a para a degradação pela via ubiquitina-proteossoma (50).

VIA WNT CANÔNICA/ β - CATENINA

A via WNT canônica participa na embriogênese, na proliferação celular, polaridade e migração, quanto na tumorigênese (53). A via WNT atua inclusive no desenvolvimento da próstata e geralmente apresenta-se inativa nas células normais da próstata (54).

A WNT é uma glicoproteína secretada que possui importante papel no desenvolvimento embrionário e homeostase de tecidos (18).

Existem duas famílias de receptores na via de sinalização WNT canônica/ β -catenina: receptor LDL relacionado as proteínas 5 e 6 (LRP5 e LRP6) e o receptor transmembrana Frizzled (53). Há proteínas que previnem a interação da proteína com esses receptores para inibir a via de sinalização WNT (11). Existem duas famílias de antagonistas das glicoproteínas WNT: classe DKK e a sFRP, incluindo WIF-1, ambas as classes se ligam diretamente nas glicoproteínas WNTs, alterando a habilidade de ligação com os receptores (55).

A via WNT basicamente depende da estabilização da β -catenina no citoplasma e conseqüente acúmulo no núcleo, sendo que os níveis de β -catenina citoplasmática são controlados por meio do complexo de destruição APC/AXIN/GSK-3 β (56). Com a ativação pela WNT, a AXIN é recrutada para a porção fosforilada do receptor LRP e ocorre a supressão da atividade da GSK-3, inibindo a ubiquitinação da β -catenina, com conseqüente saturação de β -catenina fosforilada no citoplasma e translocação para o núcleo (57). No núcleo, a β -catenina se associa com o as proteínas TCF/LEF-1 e ativa a transcrição de genes alvo (58). Na ausência de WNT, a β -catenina é fosforilada e ubiquitinada, e posterior degradação proteossomal (59). A β -catenina é apresentada a proteossoma pela sua interação com a proteína F-box contendo uma proteína adaptadora (E3-ligase B- TRCP) que forma um complexo de ubiquitinação(15).

COMENTÁRIOS FINAIS

A via WNT canônica participa na embriogênese e carcinogênese de diversos tumores, inclusive da próstata canina e humana. A principal proteína dessa via é a β -catenina, já estudada em próstatas caninas em estudos anteriores, a qual a presença desta no núcleo ativa a

via de sinalização WNT. O complexo E-caderina/ β -catenina presente na membrana plasmática e o complexo APC/ β -catenina possuem papéis importantes na regulação desta via.

Os cães apresentam papel importante no estudo da neoplasia prostática, já que além de serem animais sentinelas do homem por dividirem o mesmo ambiente, apresentam cada vez mais neoplasias devido a maior expectativa de vida desses animais. Portanto, o estudo da carcinogênese prostática canina e suas vias de ativação é necessário para melhorias no diagnóstico prévio, tratamento, melhorando a qualidade de vida deste animal e sua taxa de sobrevivida.

REFERÊNCIAS

1. Johnston S, Kamolpatana K, Root-Kustritz M, Johnston G. Prostatic disorders in the dog. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:405–15.
2. Toledo DC, Faleiro MBR, Rodrigues MMP, Di Santis GW, Amorim RL, Moura VMBD. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. *Cienc Rural.* 2010;40(6):1372–7.
3. Teske E, Naan E, Van Dijk E, Van Garderen E, Schalken J. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;197(1-2):251–5.
4. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2016 [cited 2017 Jan 19]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>.
5. LeRoy BE, Northrup N. Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *Vet J.* 2009;180(2):149–62.
6. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med.* 2011;17(7):380–8.
7. Zanini DA, Kimura KC, Nishiya AT, Ubukata R, Leandro RM, Brito CP, et al. Environmental risk factors related to the development of canine non-Hodgkin's lymphoma. *Cienc Rural.* 2013;43(7):1302–8.
8. Keller JM, Schade GR, Ives K, Cheng X, Rosol TJ, Piert M, et al. A novel canine model for prostate cancer. *Prostate.* 2013;73(9):952–9.
9. Winkler S, Escobar HM, Meyer B, Simon D, Eberle N, Baumgartner W, et al. HMGA2 expression in a canine model of prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;177(2):98–102.
10. Yang G, Goltsov AA, Ren C, Kurosaka S, Edamura K, Logothetis R, et al. Caveolin-1 upregulation contributes to c-Myc-Induced High-Grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Mol Cancer Res.* 2012;10(2):218–29.
11. Verras M, Sun Z. Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2006;237(1):22–32.

12. Yu X, Wang Y, Jiang M, Bieri B, Roy-Burman P, Shen MM, et al. Activation of β -Catenin in mouse prostate causes HGPIN and continuous prostate growth after castration. *Prostate*. 2009;69(3):249–62.
13. Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(6):847–50.
14. Li VSW, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, et al. Wnt Signaling through inhibition of β -Catenin degradation in an intact axin1 complex. *Cell*. 2012;149(6):1245–56.
15. Stamos JL, Weis WI. The β -Catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1):a007898.
16. Richiardi L, Fiano V, Vizzini L, De Marco L, Delsedime L, Akre O, et al. Promoter methylation in APC, RUNX3, and GSTP1 and mortality in prostate cancer patients. *J Clin Oncol*. 2009;27(19):3161–8.
17. Wang L, Liu X, Gusev E, Wang C, Fagotto F. Regulation of the phosphorylation and nuclear import and export of β -catenin by APC and its cancer-related truncated form. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 8):1647–59.
18. Kypta RM, Waxman J. Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2012;9(8):418–28.
19. Fonseca-Alves CE, Kobayashi PE, Rivera-Calderón LG, Laufer-Amorim R. Evidence of epithelial–mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis. *Res Vet Sci*. 2015;100:176–81.
20. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):151–66.
21. Fonseca-Alves CE, Rodrigues MMP, de Moura VMBD, Rogatto SR, Laufer-Amorim R. Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. *Microsc Res Tech*. 2013;76(12):1250–6.
22. Rodrigues MMP, Rema A, Gartner MF, Laufer-Amorim R. Role of adhesion molecules and proliferation hyperplastic, pre neoplastic and neoplastic lesions in canine prostate. *Pak J Biol Sci*. 2013;16(21):1324–9.
23. Smith J. Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriogenology*. 2008;70:375–83.
24. L'Eplattenier HF. Studies on the pathogenesis and management of prostate carcinoma in dogs [thesis]. Utrecht: University Utrecht; 2009.
25. Dorso L, Chanut F, Howroyd P, Burnett R. Variability in weight and histological appearance of the prostate of beagle dogs used in toxicology studies. *Toxicol Pathol*. 2008;36:917–25.

26. Fonseca-Alves CE, Faleiro MBR, Amorim RL, De Moura VMBD. Avaliação histológica da próstata de cães adultos sexualmente intactos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010;62(3):596–602.
27. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):256–69.
28. De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, et al. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol*. 2011;60(1):106–17.
29. Omabe M, Ezeani M. Infection, inflammation and prostate carcinogenesis. *Infect Genet Evol*. 2011;11(6):1195–8.
30. Rossignol A, Villers A, Molinié V, Mazerolles C. Histologie et immunohistochimie de la prostate du chien. Validité du modèle animal pour l'étude des lésions précancéreuses. *Rev Med Vet*. 2004;1(155):21–6.
31. Galvão ALB, Ferreira GS, Léga E, Costa PF, Ondani AC, Denicol A. Principais afecções da glândula prostática em cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2011;35(4):456–66.
32. LeRoy BE, Nadella MVP, Toribio RE, Leav I, Rosol TJ. Canine prostate carcinomas express markers of urothelial and prostatic differentiation. *Vet Pathol*. 2004;41(2):131–40.
33. Matsuzaki P, Cogliati B, Sanches DS, Chaible LM, Kimura KC, Silva TC, et al. Immunohistochemical Characterization of Canine Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *J Comp Pathol*. 2010;142(1):84–8.
34. Baetke SC, Adriaens ME, Seigneuric R, Evelo CT, Eijssen LMT. Molecular pathways involved in prostate carcinogenesis: insights from public microarray datasets. *PLoS One*. 2012;7(11):e49831.
35. Palapattu GS. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*. 2004;26(7):1170–81.
36. Grover PL, Martin FL. The initiation of breast and prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2002;23(7):1095–102.
37. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev*. 2010;24(18):1967–2000.
38. Alshenawy HA, Ali MAE-HAE-A. Differential caveolin-1 expression in colon carcinoma and its relation to E-cadherin- β -catenin complex. *Ann Diagn Pathol*. 2013;17(6):476–82.
39. Chen G, Shukeir N, Potti A, Sircar K, Aprikian A, Goltzman D, et al. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer*. 2004;101(6):1345–56.

40. López-Knowles E, Zardawi SJ, McNeil CM, Millar EK, Crea P, Musgrove E, et al. Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(1):301–9.
41. Morgan C, Jenkins SA, Kynaston HG, Doak SH. The role of adhesion molecules as biomarkers for the aggressive prostate cancer phenotype. *PLoS One.* 2013;8(12):1–8.
42. Drivalos A, Papatsoris AG, Chrisofos M, Efstathiou E, Dimopoulos MA. The role of the cell adhesion molecules (integrins/cadherins) in prostate cancer. *Int Braz J Urol.* 2011;37(3):302–6.
43. Rodrigues MMP, Rema A, Gartner MF, Laufer-Amo R. Role of adhesion molecules and proliferation hyperplastic, pre neoplastic and neoplastic lesions in canine prostate. *Pak J Biol Sci.* 2013;16(21):1324–9.
44. Kim H, He Y, Yang I, Zeng Y, Kim Y, Seo YW, et al. δ -Catenin promotes E-cadherin processing and activates β -catenin-mediated signaling: implications on human prostate cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(4):509–21.
45. Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urol Oncol.* 2005;23(6):402–6.
46. Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, Lopes CS. Prognostic value of E-cadherin immunoexpression in patients with primary ovarian carcinomas. *Ann Oncol.* 2004;15(10):1535–42.
47. Rubin MA, Mucci NR, Figurski J, Fecko A, Pienta KJ, Day ML. E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. *Hum Pathol.* 2001;32(7):690–7.
48. Cervantes-Arias A, Pang LY, Argyle DJ. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlying the cancer phenotype. *Vet Comp Oncol.* 2013;11(3):169–84.
49. Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1332(3):F127–47.
50. Bruxvoort KJ, Charbonneau HM, Giambernardi TA, Goolsby JC, Qian CN, Zylstra CR, et al. Inactivation of Apc in the mouse prostate causes prostate carcinoma. *Cancer Res.* 2007;67:2490–6.
51. Watanabe M, Kakiuchi H, Kato H, Shiraishi T, Yatani R, Sugimura T, et al. APC gene mutations in human prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 1996;26(2):77–81.
52. Richiardi L, Fiano V, Grasso C, Zugna D, Delsedime L, Gillio-Tos A, et al. Methylation of APC and GSTP1 in non-neoplastic tissue adjacent to prostate tumour and mortality from prostate cancer. *PloS One.* 2013;8(7):e68162.

53. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17(1):9–26.
54. Valkenburg KC, Yu X, De Marzo AM, Spiering TJ, Matusik RJ, Williams BO. Activation of Wnt/ β -catenin signaling in a subpopulation of murine prostate luminal epithelial cells induces high grade prostate intraepithelial neoplasia. *Prostate*. 2014;74(15):1506–20.
55. Kawano Y. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 13):2627–34.
56. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;13(1):11–26.
57. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;149(6):1192–205.
58. Lean FZX, Kontos S, Palmieri C. Science direct expression of β -catenin and mesenchymal markers in canine prostatic hyperplasia and carcinoma. *Journal of Comp Pathol*. 2014;150(4):373–81.
59. Simons BW, Hurley PJ, Huang Z, Ross AE, Miller R, Marchionni L, et al. Wnt signaling though beta-catenin is required for prostate lineage specification. *Dev Biol*. 2012;371(2):246–55.

Recebido em: 24/02/2016

Aceito em: 08/01/2017

VESÍCULAS EXTRACELULARES: UMA FORMA DE COMUNICAÇÃO INTRAFOLICULAR

Felipe Morales Dalanezi¹
Fernanda Fagali Franchi²
Patrícia Kubo Fontes²
Anthony César de Souza Castilho³
João Carlos Pinheiro Ferreira⁴

RESUMO

A produção de leite de bovinos taurinos apresenta uma série de entraves em regiões tropicais como o Brasil. Um desses entraves é o estresse térmico (ET), que acarreta uma perda econômica importante para os produtores. A perda de capital se deve em grande parte à queda na produção de leite e nas falhas reprodutivas associadas ao ET. Já foram demonstradas várias alterações reprodutivas oriundas do ET. A nível celular, foi notada a comunicação entre células foliculares, por meio de vesículas extracelulares (EVs). Foi observada a comunicação entre células do *cummuluse* células da granulosa por meio de EVs. Sendo assim, esta revisão tem por finalidade correlacionar as EVs produzidas no interior dos folículos com os efeitos do ET sobre os oócitos bovinos.

Palavras-chave: oócito, células do *cummulus*, estresse térmico.

EXTRACELLULAR VESICLES: A FORM OF INTRAFOLLICULAR COMMUNICATION

ABSTRACT

The production of taurine cattle milk presents a number of obstacles in tropical regions like Brazil. One of these barriers is the thermal stress (ET), which entails a major economic loss for producers. The loss of capital should largely fall in milk production and reproductive failures associated with ET. Already it has been demonstrated several reproductive changes arising from the ET. At the cellular level, it was noted between the communication follicular cells through extracellular vesicles (EVs). Communication was observed between cumulus cells and granulosa cells by EVs. Therefore, this review intends to correlate the EVs produced inside the follicles with the effects of ET on bovine oocytes.

Keywords: oocyte, cumulus cells, heat stress.

¹ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu. Contato para correspondência: fmdalanezi@gmail.com

² Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP – Botucatu.

³ Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente – SP.

⁴ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu.

VESÍCULAS EXTRACELULAR: UNA FORMA DE COMUNICACIÓN INTRAFOLLICULAR

RESUMEN

La producción de leche en el ganado taurina presenta una serie de obstáculos en las regiones tropicales como Brasil. Una de estas barreras es la tensión térmica (ET), lo que implica una pérdida económica importante para los productores. La pérdida de capital debe caer en gran medida en la producción de leche y fallas reproductivas asociadas con ET. Ya se ha demostrado varios cambios reproductivos derivados de la ET. A nivel celular se observó entre las células foliculares de comunicación a través de vesículas extracelulares (EVs). Se observó la comunicación entre las células del cúmulo y células de la granulosa de los vehículos eléctricos. Lo que esta revisión se pretende correlacionar los vehículos eléctricos producidos en el interior de los folículos con los efectos de ET en ovocitos bovinos.

Palabras clave: ovocitos, células del cumulus, el estrés por calor.

INTRODUÇÃO

Regiões de clima tropical apresentam verão com elevadas temperaturas médias. São bem conhecidos os decréscimos de fertilidade observados nos taurinos principalmente nos animais da raça Holandesa durante os meses mais quentes do ano. As perdas produtivas e reprodutivas associadas com o estresse térmico (ET) têm um significativo impacto econômico (1). Estimou-se que, em regiões tropicais, essa perda chega a € 69.379,00 por ano na bovinocultura leiteira devido aos efeitos do ET (2). Vacas sob ET podem diminuir sua produção diária de leite em até 40% (3). Já no âmbito da reprodução, o ET ocasiona a diminuição do crescimento folicular, redução das concentrações séricas de estradiol, comprometimento da dominância folicular e, ainda, atraso no dia esperado da luteólise (4); levando assim à falhas na fecundação, falhas no desenvolvimento embrionário, e no reconhecimento materno da gestação (5,6). Entretanto, os mecanismos fisiológicos que levam à infertilidade no verão são apenas parcialmente compreendidos.

Dentre os vários fatores presentes neste microambiente, encontram-se as vesículas extracelulares (EVs) as quais exibem funções biológicas pleiotrópicas (7). Os fatores que influenciam na classificação dessas vesículas são o tamanho, o formato, as proteínas de membranas, alguns lipídios estruturais e a origem. Estudos mostram, também, a presença de EXOs e MVs em diversos fluidos biológicos como saliva, plasma, urina (8-11) e também no líquido folicular de éguas (12). Essas EVs transportam principalmente proteínas, microRNAs (miRNAs) e RNAs mensageiros (mRNAs) e sua bicamada lipídica protege esse biomaterial (13).

AS EVs apresentam sua liberação estimulada por eventos que levam à injúria celular como estresse físico ou químico (14). O ET leva a alterações metabólicas que geram este tipo de estresse (15). As EVs são liberadas por células foliculares e desempenham função importante na transferência de moléculas para as células da granulosa e oócito (16,17). Com base no exposto, esta revisão tem como objetivo demonstrar a importância da comunicação celular pelas EVs e sua relação com a reprodução bovina durante episódios de estresse térmico.

REVISÃO DE LITERATURA

Microvesículas e Exossomos

A comunicação intercelular é muito importante para garantir uma resposta uniforme dos diferentes componentes do tecido (18). As células podem se comunicar pelo fluido extracelular (19), por ligações mediadas por moléculas e por nanotubos que estabilizam a passagem de substâncias da superfície e de componentes do citoplasma (20,21).

A descoberta de estruturas circulares secretadas pelas células não é recente. Quando foram descobertas, acreditava-se que eram resultado de um processo celular específico e demonstrou-se que tinham função de transportar enzimas funcionais na mesma proporção encontrada no citoplasma das células de origem (22). Entretanto, apenas estudos mais recentes demonstraram funções para as EVs secretadas por diversos tipos de células (18). Vesículas extracelulares são classificadas de acordo com o tamanho, morfologia, tipos de proteínas e lipídeos da membrana e a sua origem. As MVs e os EXOs apresentam, respectivamente, diâmetros entre 100 e 1000 nm e 40 a 150 nm (23,24).

As MVs são produzidas pela membrana plasmática enquanto que os EXOs são produzidos dentro de corpos multivesiculares e são secretados pela fusão entre a membrana plasmática e a membrana dos corpos multivesiculares (25). As MVs se originam pela fusão entre a membrana endossomal e a membrana plasmática e após essa fusão, estes componentes celulares são liberados pela superfície celular (26,27). De acordo com a Vesiclepedia (28), já foram descritas 43 mil proteínas, 342 lipídeos, 20 mil RNAs mensageiros e 2400 microRNAs no interior das EVs de diferentes tipos celulares e organismos.

Atualmente, já se sabe que os EXOs são produzidos pela internalização da membrana formando endossomos, que por sua vez são recobertos por outra membrana levando à formação dos corpos multivesiculares (MVBs) (29,30). Após essa formação, ocorre a fusão entre os MVBs e a membrana plasmática e liberam os EXOs do seu interior (31).

As EVs apresentam importante função no espaço intercelular e desempenham um papel de regulação da comunicação entre as células (18). Esta hipótese é fundamentada em observações que demonstraram que EVs liberadas pela célula doadora podem interagir com receptores específicos em outras células promovendo na célula alvo uma estimulação direta ou transferindo receptores de ligação (32,33). Esta interação pode ser limitada por uma ligação a um receptor na membrana da célula alvo, concretizando uma plataforma de recebimento dos complexos multimoleculares ou conduzindo um sinal para a célula, ambos os processos necessitam da internalização das EVs (34). Quando internalizadas, as EVs podem fundir suas membranas com os endossomos e liberar seu conteúdo no citoplasma das células alvo; outro caminho que as vesículas podem seguir é pela não ligação com os endossomos e ocorrer a transferência destas para os lisossomos ou serem descartadas pela fusão com a membrana plasmática (34).

A primeira observação de EVs em fluido folicular de mamíferos foi descrita em éguas, pela microscopia eletrônica e citometria de fluxo. Após a constatação da existência das mesmas, estudou-se a capacidade das vesículas em penetrar nas células da granulosa. Com o uso de EVs marcadas por fluorescência demonstrou-se a capacidade das vesículas em adentrar as células da granulosa tanto *in vivo* como *in vitro* (12). Outro grupo de pesquisadores observou que miRNAs presentes em EXOs isolados de fluido folicular de bovinos estão associados com a maturação oocitária, sugerindo que estes miRNAs podem ser utilizados como marcadores de qualidade oocitária (35).

Ainda não está claro se as células do *cummulus*, as células da granulosa e ou os oócitos secretam as EVs. O primeiro passo foi a realização da microscopia eletrônica do fluido folicular de folículos entre 3 e 6 mm de diâmetro, normalmente usados em procedimentos de aspiração para coleta de oócitos, assim pode-se observar a presença de MVBs contendo EXOs

no interior das células da granulosa e células do *cummulus*, sugerindo então que estes tipos celulares produzem e liberam as EVs para o fluido folicular (36).

Estudos levantaram a hipótese de que os EXOs desempenham função importante de transferir moléculas para as células da granulosa, na metade e no fim do ciclo estral de bovinos, os EXOs atuam aumentando a proliferação celular e estimulando a expressão de receptores de LH. As EVs são produzidas no interior dos folículos e agem sobre as células da granulosa (16).

A adição de EVs extraídas do fluido folicular de bovinos em meio de maturação de oócitos de ratas e vacas acarretou uma melhor expansão das células do *cummulus* bem como aumentou a expressão de genes relacionados a estas células em ambas as espécies (37).

1.1. Estresse Térmico

Em condições de estresse térmico (ET) uma vaca holandesa de alta produção pode atingir temperatura retal de 41,0°C, enquanto que sua temperatura média em condições de termoneutralidade é de 38,5 a 39,0°C. Porém, quando levamos em consideração os órgãos do sistema reprodutivo, esse aumento na temperatura é ainda mais relevante, pois a temperatura uterina pode atingir valores 0,2 a 0,5°C maiores que a retal (38).

Sob ET, o organismo possui alguns mecanismos para tentar restabelecer a temperatura ideal, sendo assim uma forma de perder calor é pela pele. Para tanto, ocorre um direcionamento de maior aporte sanguíneo para a periferia em detrimento dos órgãos internos. Esse direcionamento diminui a quantidade de sangue que atinge os órgãos internos e, por conseguinte o útero e os ovários, causando assim a queda da concentração de nutrientes e hormônios para esses órgãos (38). Recentemente foi demonstrado que o aporte sanguíneo para o sistema reprodutivo interno, útero e ovários diminui de 20 a 30% em animais sob ET, enquanto que o fluxo sanguíneo para a vulva aumenta cerca de 40%, devido a vasodilatação periférica (39).

Nas células, o estresse térmico (ET) leva a expressão de vários genes protetores que são regulados pelo fator de transcrição do estresse térmico (HSF) (40). O HSF rege a produção de proteínas do choque térmico (HSP), que possuem funções protetoras contra a hipertermia, hipóxia e isquemia cerebral durante o ET (41). Acredita-se que a resposta ao ET seja um mecanismo integrado de células e tecidos com o propósito de diminuir o dano das temperaturas elevadas à célula (42).

Quando as células são expostas a temperatura acima da faixa de conforto, algumas alterações ocorrem como: inibição da produção de proteínas, alterações no citoesqueleto, disfunções metabólicas, mudanças na dinâmica da membrana plasmática e diminuição da proliferação celular (43). Essas alterações levam às mudanças na expressão de alguns genes e, conseqüentemente, na produção proteica (44). O tempo e a eficiência da adaptação a essas condições é o que vai determinar a viabilidade ou a morte celular (42).

Todavia o ET pode alterar todas as fases do desenvolvimento folicular, como pode ser observado pela diminuição da diferença de tamanho entre folículos subordinados e dominantes, tanto animais que sofreram longos período de ET como animais submetidos a períodos curtos de estresse, ambos apresentaram uma continuação do crescimento dos folículos subordinados por mais tempo (45).

Em vista da ausência da dominância total de um dos folículos, há uma antecipação da segunda onda. Esse fenômeno provavelmente está relacionado a baixa concentração de inibina, que por sua vez não inibe a secreção de FSH, permitindo o crescimento do folículo subordinado (46). Essa falha na dominância além de atrapalhar o desenvolvimento correto da segunda onda (46), ainda altera a conformação uterina e a liberação de PGF2 α (47), diminuindo a capacidade de implantação do embrião (6).

Recentemente, observou-se que o ET levou a um aumento da taxa de perda fetal, diminuiu a porcentagem de prenhez, aumentou o número de fetos mortos ao nascimento,

aumentou a taxa de abortamento, e por fim aumentou o período de espera (período entre o nascimento e a primeira inseminação) e o intervalo entre os partos (48)

O efeito do ET sobre a liberação de LH é muito controverso. Alguns autores relatam aumento da liberação de LH (49), enquanto outros relatam que não há alteração (38,50) e ainda existem autores que defendem a diminuição da liberação de LH devido ao ET (51-54). A teoria mais aceita ainda é que o ET leve a diminuição da liberação de LH pela diminuição da amplitude (53) e da frequência (52) dos pulsos deste hormônio, sendo assim o folículo dominante desenvolve-se em baixas concentrações de LH, resultando em uma menor liberação de estradiol e uma diminuição na expressão do estro e consequentemente redução na fertilidade (6).

Em se tratando mais especificamente do oócito na espécie bovina, foi relatado que o ET leva a redução na capacidade do oócito se desenvolver em blastocisto (55), aumenta a chance de ocorrer anomalias durante a maturação oocitária (56), diminui a porcentagem de embriões saudáveis (57) e redução da esteroidogênese (58). A queda na capacidade oocitária pode estar associada ao fato dos oócitos sofrerem alterações morfológicas (59). Alterações no perfil de ácidos graxos de membrana e da homogeneidade do citoplasma estão presentes durante o ET, assim como foram observadas falhas no armazenamento do mRNA e da transcrição reversa desse oócitos (60).

COMENTÁRIOS FINAIS

As EVs desempenham uma função importante na comunicação celular de vários tecidos, inclusive reprodutivos. Sendo assim, o ET possui a capacidade de modificar o conteúdo das EVs, portanto essas vesículas produzidas durante situações de estresse têm a capacidade de sinalizar para outras células que devem modificar seu metabolismo visando sobreviver à situação adversa. Acredita-se que células foliculares apresentam esse tipo de comunicação evitando assim a morte oocitária.

REFERÊNCIAS

1. Igono MO, Bjotvedt G, Sanford-Crane HT. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. *Int J Biometeorol.* 1992;36(2):77-87.
2. Boni R, Perrone LL, Cecchini S. Heat stress affects reproductive performance of high producing dairy cows bred in an area of southern Apennines. *Livest Sci.* 2014;160:172-7.
3. Rhoads ML, Rhoads RP, VanBaale MJ, Collier RJ, Sanders SR, Weber WJ, et al. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J Dairy Sci [Internet].* 2009;92(5):1986-97.
4. Wilson SJ, Marion RS, Spain JN, Spiers DE, Keisler DH, Lucy MC. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J Dairy Sci.* 1998;81(8):2124-31.
5. Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci.* 2002;85(11):2803-12.

6. De Rensis F, Scaramuzzi RJ. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. *Theriogenology*. 2003;60(6):1139-51.
7. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes : extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2010;73(10):1907-20.
8. Caby M, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*. 2005;17(7):879-87.
9. Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, et al. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res*. 2009;8(3):1304-14.
10. Berckmans RJ, Sturk A, Van Tienen LM, Schaap MCL, Nieuwland R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood*. 2011;117(11):3172-80.
11. Pisitkun T, Shen R, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(36):13368-73.
12. da Silveira JC, Veeramachaneni DNR, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod*. 2012;86(3):71.
13. Taylor DD, Gercel-taylor C. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet*. 2013;4:1-12.
14. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 2006;20(9):1487-95.
15. Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*. 2010;4(07):1167-83.
16. Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, et al. Identification of MicroRNAs in human follicular fluid: characterization of MicroRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(7):3068-79.
17. Silveira JC, Winger QA, Bouma GJ, Carnevale EM. Effects of age on follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth factor-b signalling during follicle development in the mare. *Reprod Fertil Dev*. 2015;27(6):897-905.
18. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes / microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int*. 2010;78(9):838-48.

19. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Anna Kowalska M, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001;97(10):3075-85.
20. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 2004;303(5660):1007-10.
21. Sherer NM, Mothes W. Cytonemes and Tunnelling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol*. 2009;18(9):414-20.
22. De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, Roels F. Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. *Clin Chim Acta*. 1977;81(3):237-45.
23. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985;101(3):942-8.
24. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc cell Biol*. 2006;Chapter 3:Unit 3.22.
25. Raposo G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996;183(3):1161-72.
26. Heijnen BHFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Blood*. 1999;94(11):3791-9.
27. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, et al. Platelet and Megakaryocyte derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS*. 2003;17(1):33-42.
28. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):8-12.
29. Johnstone RM. Exosomes biological significance: a concise review. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36(2):315-21.
30. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):581-93.
31. De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones*. 2011;16(3):235-49.

32. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Robert Turner A, et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*. 2001;98(10):3143-9.
33. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet J. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol*. 2004;11(3):156-64.
34. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009;19(2):43-51.
35. Soheli MMH, Hoelker M, Nofaresti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, et al. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS One*. 2013;8(11).
36. Silveira JC, Andrade GM, Nogueira MFG, Meirelles F V, Perecin F. Involvement of miRNAs and cell-secreted vesicles in mammalian ovarian antral follicle development. *Reprod Sci*. 2015;22(12):1474-83.
37. Hung W-T, Christenson LK, McGinnis LK. Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. *Biol Reprod*. 2015;93(5):117.
38. Gwazdauskas FC, Thatcher WW, Wilcox CJ. Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination which may affect conception. *J Dairy Sci*. 1973;56(7):873-7.
39. Rocha DR, Salles MGF, Moura AN, Araújo A. Impacto do estresse térmico na reprodução da fêmea bovina. *Rev Bras Reprod Anim*. 2012;36(1):18-24.
40. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J*. 2001;15(7):1118-31.
41. Lee WC, Wen HC, Chang CP, Chen MY, Lin MT. Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *J Appl Physiol*. 2006;100(6):2073-82.
42. Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, Baumgard LH. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. *J Dairy Sci*. 2008;91(2):445-54.
43. Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol*. 2002;92(4):1725-42.
44. Lanks KW. Modulators of the eukaryotic heat shock response. *Exp Cell Res*. 1986;165(1):1-10.
45. Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, et al. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol Reprod*. 1995;52(5):1106-13.
46. Roth Z, Meidan R, Braw-Tal R, Wolfenson D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J Reprod Fertil*. 2000;120(1):83-90.

47. Shaham-Albalancy A, Folman Y, Kaim M, Rosenberg M, Wolfenson D. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF₂ α secretion in the subsequent oestrous cycle. *Reproduction*. 2001;122(4):643-8.
48. El-Tarabany MS, El-Tarabany AA. Impact of maternal heat stress at insemination on the subsequent reproductive performance of Holstein, Brown Swiss, and their crosses. *Theriogenology*. 2015;84(9):1523-9.
49. Roman-Ponce H, Thatcher WW, Wilcox CJ. Hormonal interrelationships and physiological responses of lactating dairy cows to a shade management system in a subtropical environment. *Theriogenology*. 1981;16(2):139-54.
50. Gauthier D. The influence of season and shade on oestrous behaviour, timing of preovulatory LH surge and the pattern of progesterone secretion in FFPN and Creole heifers in a tropical climate. *Reprod Nutr Dev*. 1986;26(3):767-75.
51. Madan ML, Johnson HD. Environmental heat effects on bovine luteinizing hormone. *J Dairy Sci*. 1973;56(11):1420-3.
52. Wise ME, Armstrong DV, Huber JT, Hunter R, Wiersma F. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J Dairy Sci*. 1988;71(9):2480-5.
53. Gilad E, Meidan R, Berman A, Graber Y, Wolfenson D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J Reprod Fertil*. 1993;99(2):315-21.
54. Lee CN. Environmental stress effects on bovine reproduction. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1993;9(2):263-73.
55. Torres-Júnior JRS, Pires MFA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA, et al. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2008;69(2):155-66.
56. Andreu-Vázquez C, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Maya-Soriano MJ, Hunter RHF, López-Béjar M. Does heat stress provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation? *Zygote*. 2010;18(04):293-9.
57. Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*. 1988;30(2):195-209.
58. Roth Z, Meidan R, Wolfenson D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*. 2001;121(5):745-51.

59. Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: Relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*. 2001;121(3):447-54.
60. Gendelman M, Roth Z. Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes Is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. *Biol Reprod*. 2012;86(1):1-9.

Recebido em: 01/03/2016

Aceito em: 15/01/2017

AÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NOS ESPERMATOZOIDES

Endrigo Adonis Braga de Araujo¹
Luis Fernando Mercês Chaves Silva¹
Sidnei Nunes de Oliveira¹
Felipe Morales Dalanezi¹
Luiz Roberto Pena de Andrade Junior¹
Fabiana Ferreira de Souza¹
José Antonio Dell'Aqua Junior¹
Frederico Ozanam Papa¹

RESUMO

Para que os espermatozoides possam executar suas funções e alcançarem o objetivo final, que é a fecundação, necessitam de energia que advém da adenosina trifosfato (ATP). Durante o metabolismo, a energia é armazenada na forma de elétrons de alta energia que são direcionados a cadeia de transporte de elétrons, composta de cinco proteínas supramoleculares. Neste processo, há a formação de um radical intermediário, o ânion semiquinona (Q^-) que eventualmente é capaz de transferir este elétron desemparelhado ao O_2 e formar as espécies reativas de oxigênio, sendo as principais o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Essas moléculas são altamente reativas e nos espermatozoides desencadeiam processos que levam à degradação e decréscimo na qualidade celular. Porém, essas mesmas moléculas que muitas vezes são consideradas grandes vilãs, também participam de mecanismos que culminam na fertilização e formação do zigoto, adquirindo assim uma grande importância. Com o advento da criopreservação de sêmen e o estresse oxidativo associado ao processamento, as espécies reativas de oxigênio entraram em evidência nas pesquisas, tornando-se necessário o estudo de sua ação e maneiras de reduzir o estresse oxidativo.

Palavras-chave: células espermáticas, radicais livres, estresse oxidativo.

ACTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ON SPERMATOZOA

ABSTRACT

So that spermatozoa can perform functions and achieve the goal that is fertilization, require energy from adenosine triphosphate (ATP). During the energy metabolism is stored in the form of high-energy electrons that are directed to the electron transport chain, comprised of five supramolecular protein. In this process, there is the formation of a semiquinone anion (Q^-) an intermediate radical that is eventually able to transfer this unpaired electron to O_2 and form reactive oxygen species, as the main superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. These molecules are highly reactive and sperm trigger processes that lead to degradation and decrease in cell quality. However these same molecules that are often considered great villains, also participate in mechanisms that culminate in fertilization and zygote formation, thus acquiring great importance. With the advent of semen cryopreservation and oxidative stress associated with the processing, reactive oxygen species entered into evidence in the research, making it necessary to study its action and ways to reduce oxidative stress.

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu/Brasil.

Keywords: free radicals, oxidative stress, sperm cells.

ACCIÓN DE OXÍGENO EN ESPECIES REACTIVAS EN LOS ESPERMATOZOIDES

RESUMEN

Para que el esperma puede desempeñar sus funciones y lograr el objetivo final, que es la fertilización, requieren energía que proviene de trifosfato de adenosina (ATP). Durante el metabolismo de la energía se almacena en forma de electrones de alta energía que se dirige a la cadena de transporte de electrones, compuesto de cinco proteínas supramolecular. En este proceso, se produce la formación de una, el anión intermedio radical semiquinona ($Q^{\cdot-}$) que es finalmente capaz de transferir este electrón desapareado a O_2 y formar especies reactivas del oxígeno, la superóxido principal, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Estas moléculas son procesos de activación altamente reactivos y espermatozoides que llevan a la degradación y la disminución de la calidad celular. Sin embargo, estas mismas moléculas que a menudo se consideran grandes villanos, también participan en los mecanismos que culminan en la fertilización y la formación de cigoto, adquiriendo así una gran importancia. Con el advenimiento de la criopreservación del semen y el estrés oxidativo asociado con el procesamiento, especies reactivas de oxígeno entraron en evidencia en la investigación, por lo que es necesario estudiar su acción y formas de reducir el estrés oxidativo.

Palabras clave: células de esperma, estrés oxidativo, los radicales libres.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen se tornou essencial nos programas de reprodução em todo mundo, todavia esses processos imprimem nos espermatozoides uma redução de sua viabilidade e fertilidade devido ao estresse oxidativo, resultado de um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes (1,2), levando a necessidade de conhecimento relacionado à ação das ERO nos espermatozoides e formas de manter seu equilíbrio.

As espécies reativas de oxigênio em altas concentrações são prejudiciais aos espermatozoides, devido a indução de lipoperoxidação, danos ao DNA e apoptose. Por outro lado, em baixas concentrações, desencadeiam eventos de sinalização celular e regulação das funções fisiológicas, como a maturação, capacitação, hiperativação espermática, reação acrossomal e, até mesmo, a singamia (3-5).

Esta revisão bibliográfica visa atualizar os conhecimentos sobre a ação das espécies reativas de oxigênio nas células espermáticas.

Espermatozoide

O espermatozoide é dividido morfológicamente em cabeça e cauda (flagelo). A cabeça contém o núcleo, acrossoma e um conjunto reduzido de elementos citosólicos, e se divide em região acrossomal, segmento equatorial e região pós-acrossomal. A cauda pode ser subdividida em peça intermediária, principal e final (6).

Os elementos estruturais principais do flagelo incluem o axonema, as fibras densas exteriores, bainha fibrosa e as mitocôndrias, dispostas de modo helicoidal (Figura 1). O axonema é uma estrutura formada por α e β -tubulina disposta num par de microtúbulos centrais rodeado por outros nove periféricos e equidistantes entre si, ligados por braços de dineína (7).

As mitocôndrias se encontram exclusivamente na peça intermediária e são estruturas responsáveis pela produção da maior parte da energia necessária para a movimentação das células espermáticas, tendo como fonte principal de energia a metabolização da glicose (8).

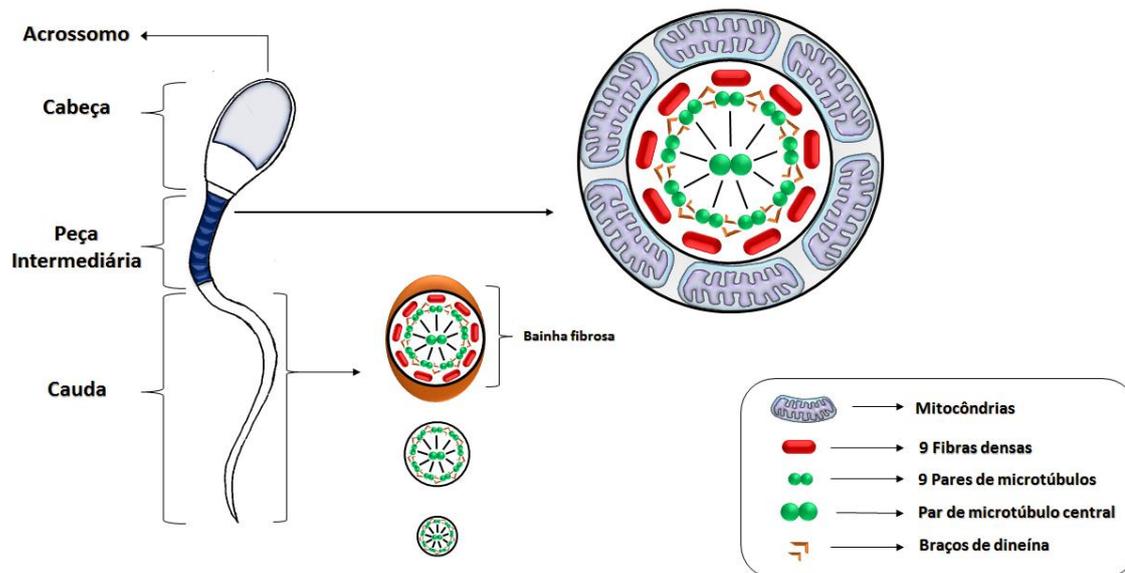


Figura 1. Descrição morfológica dos espermatozoides (Autoria: L.F.M.C.SILVA).

A maioria das organelas e citoplasma é removida durante a espermiogênese e trânsito no epidídimo, modificando o espermatozoide a partir de uma célula esférica convencional em uma das células mais especializadas do organismo. Nessa transformação além da remoção ou modificação de organelas (retículo endoplasmático, ribossomos e aparelho de Golgi), ocorre a compactação do DNA e a célula é capaz de se mover (9,10).

A cromatina no interior do núcleo do espermatozoide é altamente condensada, com volume 10% ou menos do que o de uma célula somática. Para adquirir esse nível de compactação, as histonas são substituídas por protaminas e o complexo DNA-protamina é enrolado numa forma helicoidal. Esse modelo fornece proteção adicional contra os efeitos de fatores genotóxicos e confere conformação ideal à célula para executar sua função, facilitando a mobilidade e penetração na zona pelúcida (10,11).

Recobrendo dois terços do núcleo em sua porção apical, localiza-se o acrossoma, estrutura vesicular derivada do complexo de Golgi, envolvida na fertilização (12). Armazena em seu interior enzimas hidrolíticas como a acrosina e hialuronidase, dentre outras, essenciais para penetração do espermatozoide no oócito (6,8).

Em relação aos constituintes das membranas celulares, os espermatozoides equinos contêm em média 14% de lipídios, sendo 59,0% de fosfolipídio, 13% de colesterol, 9,0% de diglicerídeos, 8,0% de triglicerídeos e 11,0% de ésteres. Dos lipídeos neutros, o colesterol é o que apresenta maior variação entre espécies e entre ejaculados de um mesmo indivíduo, variando de 13 a 37% dentre todos os lipídeos. A função do colesterol é estabilizar os fosfolipídios, mantendo a membrana em um estado de fluidez compatível com a sobrevivência da célula e execução de sua tarefa (13,14).

Metabolismo energético

O espermatozoide para desempenhar seu papel de transporte do material genético para dar origem a um novo indivíduo, além de adquirir mobilidade, passa por diversos processos (capacitação, reação acrossomal, singamia) dependentes de trifosfato de adenosina (ATP).

Para isso, os espermatozoides utilizam diversas vias metabólicas para sobreviver sob diferentes fontes de energia, sendo a fosforilação oxidativa a mais significativa. Esta versatilidade é fundamental para garantir o sucesso da fertilização (15).

A glicose é o principal açúcar utilizado pelos espermatozoides equinos, devido a capacidade muito limitada de metabolizar a frutose (7). A glicose ($C_6H_{12}O_6$), por meio de uma série de reações executadas principalmente nas mitocôndrias, é convertida a seis moléculas de dióxido de carbono (CO_2), seis moléculas de água (H_2O) e 32 moléculas de ATP.

A produção de ATP inicia-se com a glicólise e quase toda a energia disponível pelo consumo de carboidratos, é conservada na forma de elétrons de alta energia removidos dos substratos pela nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e flavina-adenina dinucleotídeo (FAD). A etapa seguinte consiste na oxidação dessas coenzimas reduzidas pela cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa e a energia é captada para produzir ATP (16).

Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa

A compreensão do transporte de elétrons e fosforilação oxidativa é de fundamental importância para entender o metabolismo celular e como ocorre a geração de radicais livres, visto que todos os passos oxidativos na degradação de moléculas ricas em energia convergem para esse estágio final da respiração celular, no qual a energia gerada promove a síntese de ATP a partir de difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico. Diversas etapas metabólicas ocorridas nas mitocôndrias podem gerar radicais livres altamente reativos, que podem danificar as células (17).

Os componentes da cadeia transportadora de elétrons estão localizados na membrana interna das mitocôndrias e compõe uma via comum pela qual os elétrons de diferentes combustíveis do organismo fluem para o oxigênio (18). A cadeia respiratória é organizada em cinco complexos supramoleculares (Figura 2), sendo que ao final o oxigênio (O_2) é reduzido gerando água (H_2O). Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores de elétrons diferentes: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH, complexo I) e succinato (complexo II). O complexo III carrega elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo c, e o complexo IV transfere elétrons do citocromo c para o O_2 . Neste processo, prótons (H^+) bombeados para o espaço intermembranar geram um gradiente químico e elétrico que possibilitam o fluxo inverso dos prótons pela ATP sintetase (complexo V) com a resultante formação de ATP (17).

A produção mitocondrial de radicais superóxido ocorre mais frequentemente em dois sítios da cadeia transportadora de elétrons, no complexo I (NADH: coenzima Q redutase) e no complexo III (ubiquinol: citocromo c redutase), sendo este o principal local de produção de ERO (19-21).

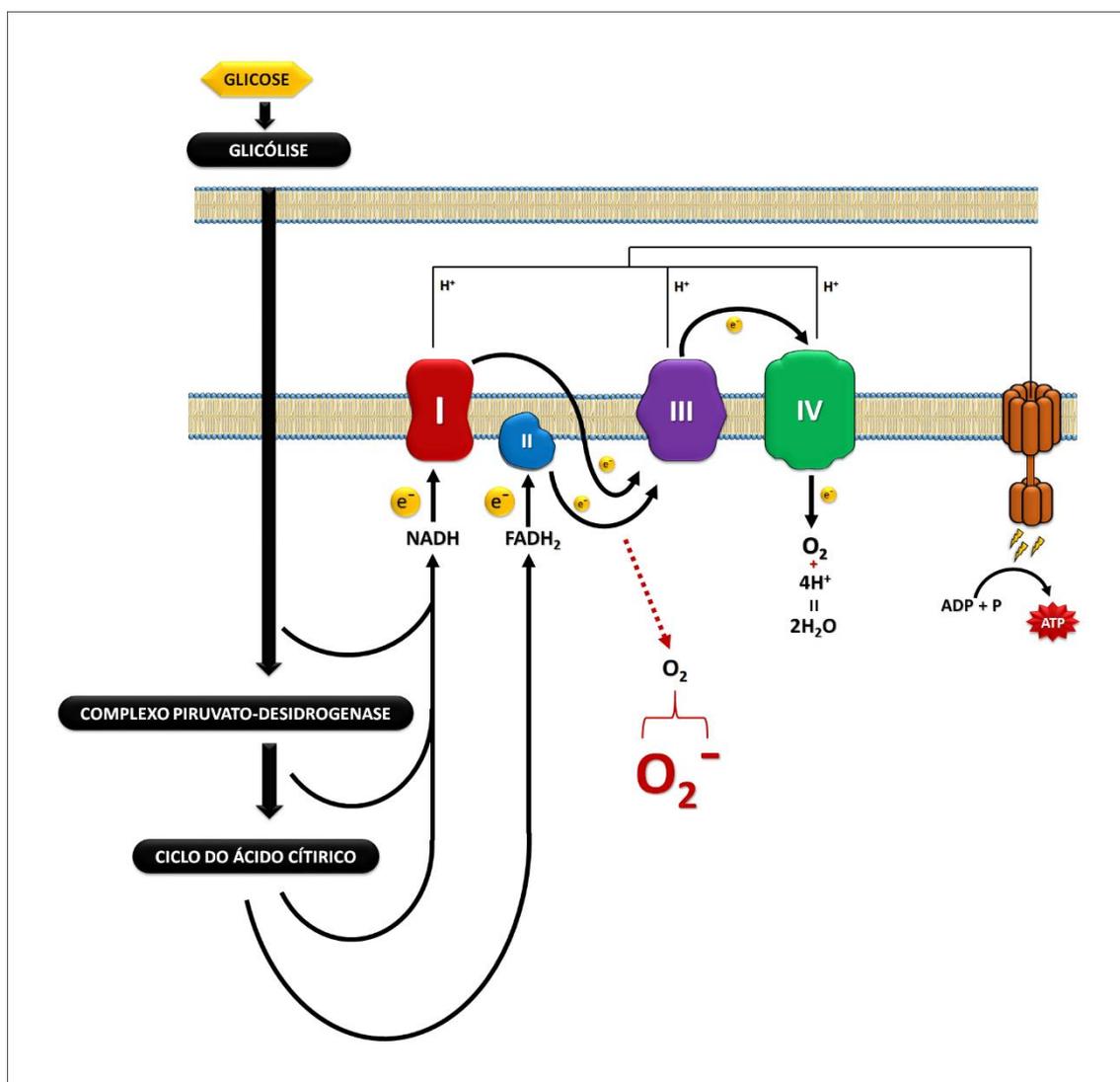


Figura 2. Descrição dos componentes da cadeia de transporte de elétrons e o trajeto executado pelos elétrons de alta energia durante todo o metabolismo, desde a glicólise até a fosforilação oxidativa, onde será formada a adenosina trifosfato (ATP) (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

Pela transferência do par de elétrons, dos NADH e FADH₂ às Q, nos complexos I e II respectivamente, assim como durante a transferência dos elétrons dos QH₂ aos Cit c, no complexo III, há a formação de um radical intermediário, o ânion semiquinona (Q⁻) que eventualmente é capaz de transferir este elétron desemparelhado ao O₂, levando à formação do radical superóxido (O₂⁻) (19,20,22-25).

O fluxo de prótons pela membrana interna da mitocôndria é responsável pela formação das moléculas de ATP, isto ocorre devido à diferença de cargas existente entre o espaço interno e externo da membrana, havendo uma tendência de migração passiva dos H⁺ do espaço intermembranar em direção à matriz mitocondrial (26). Estes prótons podem adentrar a matriz mitocondrial por dois compartimentos distintos, pela fosfato-translocase ou pela ATP-sintase (27).

A fosfato-translocase permite que um H⁺ adentre à matriz mitocondrial carregando consigo um fosfato inorgânico (Pi), que é necessário para que a ADP seja convertida à ATP, já a ATP-sintase é responsável por gerar energia, e esta depende da migração de três H⁺ em direção à matriz mitocondrial, portanto são necessárias quatro moléculas de H⁺ por ATP gerada (24,27).

Espécies reativas de oxigênio

As ERO ou radicais livres de oxigênio são quaisquer compostos que contenham um ou mais elétrons não emparelhados. São instáveis e altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos, causando uma cascata de reações. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons, sendo os três principais tipos de ERO: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-) (28,29).

Ânion Superóxido

Gerado pela adição de um elétron principalmente na cadeia respiratória, localizada na membrana mitocondrial, após a primeira redução do oxigênio molecular. O ânion superóxido é pouco reativo e não possui a capacidade de penetração pela membrana lipídica, agindo somente no compartimento onde é produzido. É o produto primário do sistema de formação de ERO, participando da formação do peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (28,30) (Figura 3).



Figura 3. Formação do radical superóxido (O_2^-) a partir da incorporação de um elétron livre ao oxigênio (O_2) (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

Peróxido de Hidrogênio

Metabólito do oxigênio possui características importantes, mesmo não sendo considerado um radical livre, por não apresentar elétron desemparelhado na última camada. O peróxido de hidrogênio possui vida longa e elevada propriedade de difusão biológica, sendo altamente tóxico para as células (31).

O O_2^- forma H_2O_2 ao receber um elétron, doado por outra molécula de O_2^- e dois H^+ , esta reação pode ser espontânea ou catalisada por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), presente em quantidades elevadas nas células dos mamíferos. (20,23,32) (Figura 4).



Figura 4. Esquematização da formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da superóxido dismutase (SOD) (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

Radical Hidroxila

Considerada a ERO mais reativa em sistemas biológicos, o radical hidroxila é muito enérgico, possui meia vida curta e capacidade de atravessar membranas, reagindo com moléculas tais como lipídeos insaturados e DNA. Este é formado a partir do H_2O_2 e sua estrutura é composta por um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de oxigênio, onde um dos elétrons do O_2 encontra-se desemparelhado (23,33).

Sua formação ocorre a partir da recepção de um elétron por parte do H_2O_2 , podendo ser por reações envolvendo H_2O_2 e o íon férrico (Fe^{2+}) ou cobre (Cu^+), conhecida por reação de Fenton (20,32,34,35) (Figura 5), ou pela reação entre uma molécula de H_2O_2 e o O_2^- , conhecida como reação de Haber-Weiss (35,36) (Figura 6).

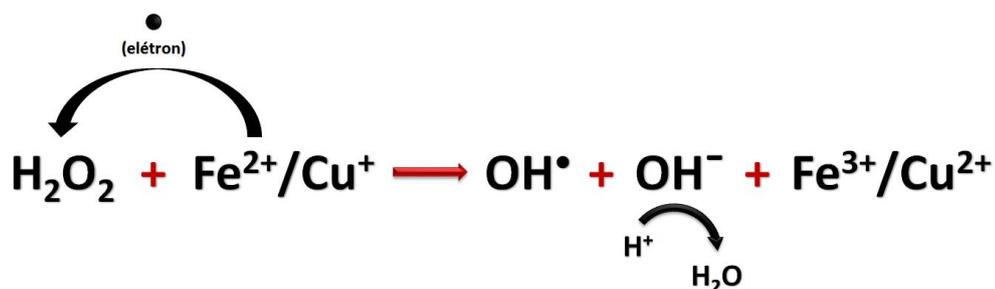


Figura 5. Formação do radical hidroxil (OH^\bullet) pela reação de Fenton (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

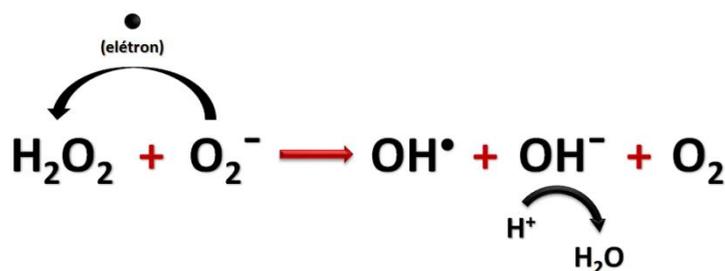


Figura 6. Formação do radical hidroxil (OH^\bullet) pela reação de Haber-Weiss (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

Ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides

Os espermatozoides são células produzidas pelos testículos, porém só adquirem competência funcional após passar por processo de maturação pós-testicular, durante o trânsito epididimário. Após a ejaculação, no trajeto pelo trato reprodutivo feminino até o sítio de fertilização, o espermatozoide sofre capacitação, ganhando habilidade de movimento hiperativado e respondendo a sinais que iniciam a sequência de interação celular que culmina na fertilização. Neste percurso, os espermatozoides passam por uma série complexa de transformações que envolvem alterações metabólicas, iônicas e da membrana que são chamadas coletivamente de capacitação (37).

Para o espermatozoide penetrar na zona pelúcida do oócito, é necessário a hiperativação do movimento, que ocorre no local da fertilização; esse é um processo fundamental compreendido na capacitação espermática (38). Já a reação acrossômica é um evento de excitose, iniciado após a ligação de uma célula espermática à glicoproteína três da zona pelúcida (ZP3) do oócito, no qual enzimas hidrolíticas e proteolíticas (principalmente acrosina e hialuronidase) são liberadas para poder penetrar a zona pelúcida e fundir-se ao oócito. A fusão entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática na cabeça do espermatozoide ocorre de forma a liberar o conteúdo acrossômico (39).

O primeiro evento na capacitação é o efluxo de colesterol, que está associado com a ativação das vias de transdução de sinais. A membrana plasmática da cabeça do espermatozoide tem quantidades elevadas de colesterol, que regulam a fluidez da membrana (40). O efluxo é promovido mediante carreadores de esterol, como albumina e lipoproteínas de alta densidade presentes no fluido uterino e fluido folicular.

Esse aumento na fluidez da membrana pode incrementar a permeabilidade da membrana para vários íons, tais como cálcio e bicarbonato, que afetam as moléculas de sinalização (41).

O influxo de cálcio e bicarbonato ativam a adenilato-ciclase (AC) para produzir 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPC), que ativa a proteína quinase A2 (PKA) para fosforilar, indiretamente, determinadas proteínas em resíduos de tirosina (40). O aumento do

cálcio intracelular é um dos acontecimentos bioquímicos cruciais durante a capacitação e reação acrossomal (42).

O mecanismo exato pelo qual o bicarbonato regula a capacitação não é claro, no entanto, seu influxo tem sido associado a um aumento intracelular do potencial hidrogeniônico (pH), regulação dos níveis de AMPc e hiperpolarização da membrana plasmática (43).

Fosforilação de proteínas, especialmente em resíduos de tirosina, é um dos acontecimentos mais importantes que ocorrem durante a capacitação. A fosforilação é uma modificação que funciona como um dos principais mecanismos de regulação da célula agindo sobre modulação iônica e regulação de receptores, sendo que a adição ou remoção de grupos fosfato pode induzir alterações conformacionais que resultam em ativação ou inativação (44).

Evidências de que ERO estão envolvidas na capacitação espermática e reação acrossomal são demonstradas em experimentos que evidenciaram a inibição da capacitação após a adição de superóxido dismutase (SOD) ao sêmen, o que não ocorre após a adição do ânion superóxido. Além disso, quando adicionado peróxido de hidrogênio ao sêmen, ocorreu reação acrossomal em bovinos (45).

O O_2^- e o H_2O_2 , em baixas concentrações, são responsáveis por ativar proteínas quinases específicas. Estas enzimas têm a função de catalisar a transferência de grupos fosfatos provenientes de moléculas como o ATP, em direção à tirosina, promovendo fosforilação desta proteína (46-48).

Com isto, Aitken et al. (36), observaram que níveis equilibrados de ERO, são capazes de promover uma desestruturação fisiológica à membrana espermática, levando à adesão do espermatozoide à zona pelúcida do oócito.

Cohen et al. (49) observaram em espermatozoides de ratos in vitro, que o aumento nos níveis de H_2O_2 induziram aumento nos níveis de cálcio intracelular, indicando maior capacidade de fertilizar.

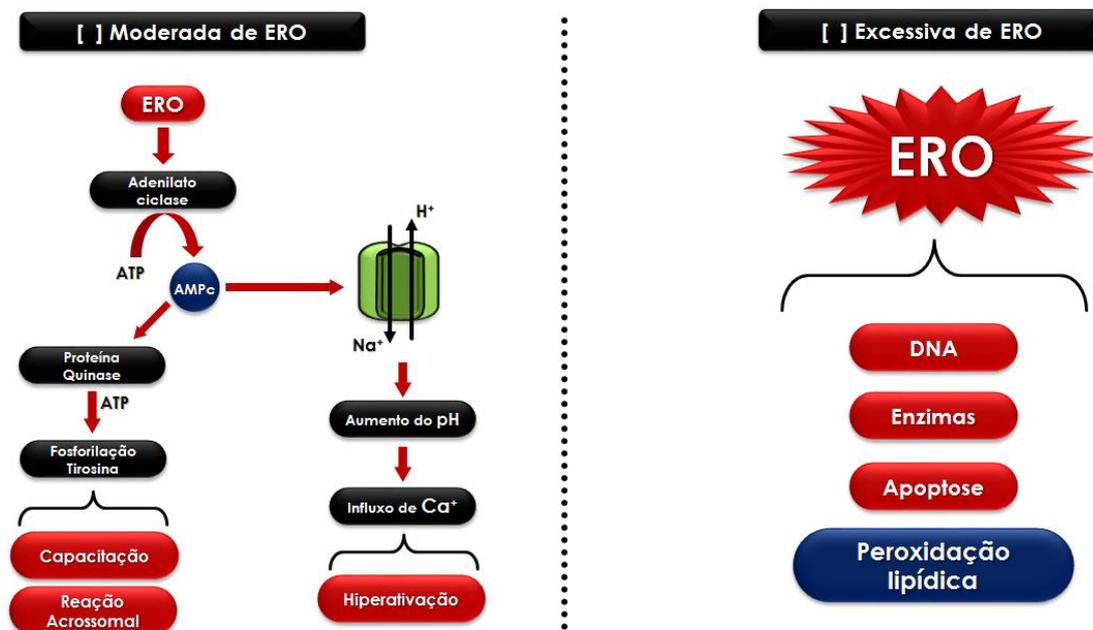


Figura 7. Resumo da ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides a depender de sua concentração (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

Em relação ao desenvolvimento de processos patológicos, as ERO estão relacionadas a causas de infertilidade devido a dois processos principais: danos às membranas espermáticas e dano ao DNA (Figura 7). As membranas possuem grandes quantidades de ácidos graxos poli-

insaturados, tornando os espermatozoides susceptíveis aos efeitos das ERO quando ocorre estresse oxidativo, o que pode afetar a motilidade espermática e sua capacidade em fertilizar os oócitos. Por outro lado, a fragmentação do DNA pode prejudicar a contribuição paterna do material genético para o desenvolvimento do embrião (50).

Esse processo chamado de peroxidação lipídica pode ser definido como a deterioração oxidativa dos lipídios contendo qualquer número de ligações duplas carbono-carbono. Peroxídeos lipídicos são instáveis e decompõem-se para formar uma série complexa de compostos (51). Essa cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação das ERO sobre os lipídios insaturados das membranas celulares gera principalmente radical alquil (R^\bullet), alcóxil (RO^\bullet) e peróxil (ROO^\bullet), levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e à morte celular (52)

A peroxidação lipídica é determinada por uma sequência de reações desencadeada a partir da ação do OH^\bullet , que sequestra um H^+ dos ácidos graxos polinsaturados presentes na bicamada fosfolipídica das membranas, se convertendo a H_2O . Esse processo promove uma desestabilização do ácido graxo formando uma região reativa, com um elétron livre, o radical alquil. Esta região de instabilidade acaba reagindo com uma molécula de O_2 circulante formando os radicais alcóxil ou peróxil, que têm a tendência de buscar estabilidade retirando uma molécula de H^+ e um elétron presentes nos fosfolípídeos adjacentes, levando a formação do hidroperóxido lipídico (ROOH). A remoção deste H^+ do ácido graxo vizinho, induz a formação de um novo R^\bullet , desencadeando uma reação em cadeia. (53,54) (Figura 8).

Se a reação em cadeia não for interrompida haverá a formação de ligações entre os radicais instáveis ($R^\bullet-R^\bullet$, $R^\bullet-ROO^\bullet$ ou $ROO^\bullet-ROO^\bullet$), que afetam a fluidez, elasticidade e permeabilidade da membrana, fragilizando-a e levando à quebra da estrutura (53,55). Levando à diminuição da motilidade e viabilidade espermáticas (56). Como resultado, a retirada de hidrogênio, evento que inicia a peroxidação lipídica, é promovida, desencadeando uma cascata que, em última análise, conduz à geração de aldeídos eletrofílicos tais como acroleína, 4-hidroxinonenal (4HNE), e de malondialdeído (57).

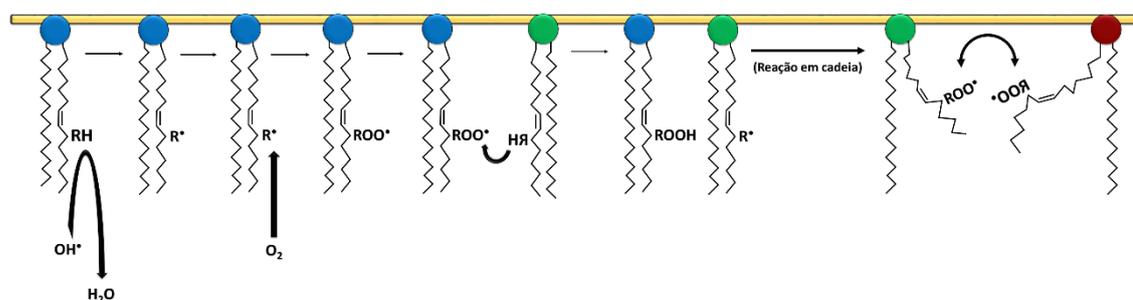


Figura 8. Esquematização da reação em cadeia ocorrida na membrana plasmática durante a peroxidação lipídica. H_2O (água); OH^\bullet (radical hidroxil); RH (região estável no ácido graxo); R^\bullet (radical alquil); ROO^\bullet (radical peróxil); ROOH (hidroperóxido lipídico) (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

De acordo com Halliwell (54), os íons de ferro e cobre, são capazes de reagir com o ROOH, doando ou sequestrando elétrons, desestabilizando a molécula e reiniciando a reação em cadeia (Figura 9).

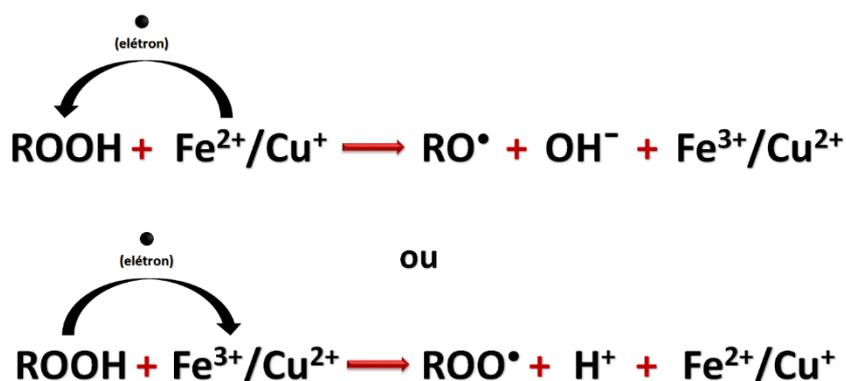


Figura9. Desestabilização do hidroperóxido lipídico (ROOH) por ação dos íons metálicos ($\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^+$ ou $\text{Fe}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$). (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

Os altos níveis de OH^\bullet circulantes promovem também desestruturação de enzimas importantes, como a succinatodesidrogenase e enzimas do complexo I, comprometendo o funcionamento normal do ciclo do ácido cítrico, levando a inativação do transporte de elétrons e deficiência na produção de ATP, o que reflete em redução na motilidade espermática (20,58,59).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas nos últimos anos avaliando-se a influência das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides. Observa-se que, ao mesmo tempo em que as ERO são consideradas vilãs, promovendo decréscimo na qualidade espermática principalmente após criopreservação, elas exercem funções fisiológicas importantes ligadas à fecundação, tornando a busca pelo equilíbrio uma necessidade.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio à pesquisa (Processo nº 2014/00175-8).

REFERÊNCIAS

1. Watson PF. The cause of reduced fertility with cryopreserved sêmen. *Anim Reprod Sci.* 2000;60:481-92.
2. Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev Bras Reprod Anim.* 2010;34:79-85.
3. Lamirande DE, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *J Reprod Fertil.* 1997;2:48-54.
4. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl.* 2000;21:895-902.
5. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol.* 2010;48:425-435.

6. Varner DDD, Gibb Z, Aitken RJ. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. *Equine Vet J.* 2015;47:16-24.
7. Varner D, Johnson L. From a sperm's view: revisiting our perception of this intriguing cell. *AEEP Proceedings.* 2007;53:104-77.
8. Brito LFC. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clin Tech Equine Pract.* 2007;6:249-64.
9. Toshimori K, Ito C. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol.* 2003;66:383-96.
10. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction.* 2010;139(2):287-301.
11. Braun RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet.* 2001;28:10-2.
12. Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 2010;73:279-319.
13. Komarek RJ, Pickett BW, Gibson EW, Lanz RN. Composition of lipids in stallion semen. *J Reprod Fertil.* 1965;10:337-42.
14. Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci.* 2001;68:249-65.
15. Ruiz-Pesini E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Enríquez JA. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr Top Dev Biol.* 2007;77:3-19.
16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula.* 5a ed. Porto alegre: Artmed; 2010.
17. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger princípios da bioquímica.* 6a ed. Porto alegre: Artmed; 2014.
18. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica ilustrada.* 3a ed. Porto alegre: Artmed; 2006.
19. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408:239-47.
20. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 2000;25:502-8.

21. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc National Acad Sci USA*. 2006;103:7607-12.
22. Herrero A, Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. [J Bioenerg Biomembranes](#). 2000;32:609-15.
23. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552:335-44.
24. Pryde KR, Hirst J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J Biol Chem*. 2011;286:18056-65.
25. Quilan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem*. 2012;287:27255-64.
26. Bertram R, Gram PM, Luciani DS, Sherman A. A simplified model for mitochondrial ATP production. *J Theor Biol*. 2006;243:575-86.
27. Capaldi RA. Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1982;694:292-306.
28. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem*. 2001;8:851-62.
29. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int*. 2005;95:503-7.
30. Nogueira BG, Bitencourt JL, Sampaio BFB, Bender ESC, Costa e Silva EV, Zúccari CESN. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. *Rev Electron Vet*. 2013;15:1-15.
31. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*. 1997;43:61-8.
32. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*. 2013;13:71-82.
33. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann Rev Physiol*. 1986;48:657-67.
34. Liochev SI, Fridovich I. Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life*. 1999;48:157-61.
35. Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*. 2004;10:387-99.

36. Aitken RJ, Clarkson JS, Fisel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;40:183-97.
37. Jonge CD. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update.* 2005;11:205-14.
38. Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction.* 2001;122:519-26.
39. Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol.* 2008;52:503-10.
40. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1469:197-235.
41. Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/ acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;2:1-12.
42. Florman HM, Corron M, Kim TDH, Babcock D. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol.* 1992;152:304-14.
43. Nishigaki T, José O, González-Cota AL, Romero F, Treviño CL, Darszon A. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem Biophys Res.* 2014;450:1149-58.
44. Pawson T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-sh2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell.* 2004;116:191-203.
45. O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology.* 1999;52:289-301.
46. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci.* 1995;108:2017-25.
47. Leclerc P, De Lamirande E, Gagnon C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med.* 1997;22:643-56.
48. O'Flaherty C, De Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:528-40.
49. Cohen N, Lubart R, Rubinstein S, Breitbart H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals. *Photochem Photobiol.* 1998;68:407-13.
50. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Human Reprod Update.* 2008;14:243-58.

51. El-Beltagi HS, Mohamed HI. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca*. 2013;41:44-57.
52. Repetto MG, Ferrarotti NF, Boveris A. The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Arch Toxicol*. 2010;84:255-62.
53. Gardner HW. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med*. 1989;7:65-86.
54. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? *J Neurochem*. 2006;97:1634-58.
55. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38:1482-95.
56. Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 1997;3:203-13.
57. Aitken RJ, Lambourne S, Gibb Z. The john hughes memorial lecture: aspects of sperm physiology oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*. 2014;34:17-27.
58. De Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Rad Biol Med*. 1993;14:157-66.
59. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. 1995;11:376-81.

Recebido em: 20/04/2016

Aceito em: 24/02/2017

PRINCIPAIS ZONOSSES EM PEQUENOS ANIMAIS: BREVE REVISÃO

Mayra de Castro Ferreira Lima¹
Joyce Cappa Mittestainer¹
Paula Barreto da Rocha¹
Elisabeth Regina de Carvalho¹
Barbara do Prado Verotti¹
Patricia Rosa Pellicciari¹
Cassiano Victoria²
Helio Langoni²

RESUMO

Com a relação mais estreita entre as pessoas e os animais, as zoonoses se tornam mais importantes na saúde pública. Entre elas, podem ser destacadas a raiva, leishmaniose, brucelose canina, febre maculosa, toxoplasmose e leptospirose que apresentam aspectos epidemiológicos e de controle diferentes entre elas. A **Raiva** é 100 % fatal em animais e humanos, causando encefalomielite aguda e sendo considerada ainda um grave problema de saúde pública. Desde as décadas de 1950 e 1960, quando houve elevado número de casos de raiva humana transmitida principalmente por cães no Brasil, pôde-se observar uma preocupação nas atividades governamentais, como, por exemplo, a implantação do “Programa Nacional de Profilaxia da Raiva Humana” (PNPR) em 1973, a nível nacional, e, posteriormente, em 1983, o “Plano de Ação para Eliminação da Raiva Urbana das Principais Cidades da América Latina”, desenvolvido pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Alguns avanços foram obtidos no controle dessa doença, com redução do número de casos humanos, tendo sido reportado apenas um caso de raiva humana no Brasil em 2015. A **Leishmaniose Visceral Canina (LVC)** vem se expandindo no Brasil, sendo uma zoonose de extrema importância para a saúde pública. Seu agente etiológico é um protozoário do gênero *Leishmania*, transmitido pela picada de mosquitos flebotomíneos. Os cães são os principais reservatórios primários da doença, enquanto os humanos, os hospedeiros acidentais. Esta doença em cães traz muita polêmica, já que o Ministério da Saúde juntamente com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) criaram a *Portaria Interministerial nº 1426* que proíbe seu tratamento com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA, recomendando a eutanásia dos cães infectados ou doentes. A **Brucelose** canina é caracterizada como uma antropozoonose infecciosa crônica, que apesar de menor incidência na população humana, possui grande importância socioeconômica, pois é a principal causa de infertilidade em canídeos domésticos em todo o mundo e trata-se de uma zoonose ocasional, mesmo no caso da doença em cães que pode infectar humanos em suas atividades laborais, principalmente no caso de cães de canil. A **Febre maculosa brasileira** é causada pela bactéria gram negativa, intracelular obrigatória, *Rickettsia rickettsii*, tendo como vetor o carrapato Ixodídeo *Amblyomma cajennense*. Com a proximidade das áreas urbana e rural, a incidência da doença em humanos tem aumentado, já que a exposição ao vetor e aos animais infectados ou doentes é cada vez mais frequente. A doença tem evolução aguda e seu diagnóstico rápido é importante, pois pode ser fatal na maioria dos casos, se não houver a instituição do tratamento rapidamente. A **Toxoplasmose** é uma das zoonoses de ampla difusão mundial, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que apresenta três genótipos distintos. Tem como hospedeiro definitivo o gato e outros felídeos e, devido à crescente

¹ Alunos da disciplina “Saúde pública individual e coletiva para o Sistema Único de Saúde” do Programa de Residência Multiprofissional em Saúde MS/MEC – FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu.

² Docente do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu.

importância como animal de estimação, há a necessidade de maiores esclarecimentos sobre sua transmissão, especialmente quando há o envolvimento de gestantes. Há conceitos controversos e errôneos sobre o contato direto com esses animais e a sua transmissão. Precários hábitos de higiene e ingestão de alimentos crus são as principais fontes de contaminação em humanos e, desta forma, profissionais da saúde devem orientar a população quanto às medidas essenciais de higiene para diminuir sua incidência. A **Leptospirose** é outra zoonose de distribuição mundial causada principalmente pela bactéria *Leptospira interrogans* e afeta diversas espécies de mamíferos domésticos e selvagens. Os cães e os gatos além de outras espécies animais eliminam leptospirosas pela urina, tendo importante papel epidemiológico na sua disseminação que prevalece em locais com falta de saneamento básico. A bactéria penetra no organismo pelo contato com água ou urina contaminada, pela pele lesada e mucosas. Vencendo as defesas naturais do organismo, se aloja principalmente no rim e no fígado. A vacinação e o manejo ambiental são as principais formas de prevenção.

Palavras-chave: zoonoses, leptospirose, brucelose, leishmaniose, raiva, toxoplasmose.

PRINCIPAL ZOOSES IN SMALL ANIMALS: A BRIEF REVIEW

ABSTRACT

With the close relationship between people and animals, zoonosis take an even more important role in public health. Among the main zoonoses can be highlighted rabies, leishmaniasis, canine brucellosis, Rocky Mountain spotted fever, toxoplasmosis and leptospirosis which have different epidemiological and control aspects. **Rabies** is 100% fatal in animals and humans, causing acute encephalomyelitis, it is still considered a serious public health problem. Since the 1950s and 1960s, when there was a high number of cases of human rabies transmitted mainly by dogs in Brazil, it was observed growing in government activities, such as the implementation of the "Prevention National Program of Human Rabies" (PNPR) in 1973, at national level, and then in 1983 the "Action Plan for the Elimination of Urban rabies the Cities of Latin America", developed by the Pan American Health Organization (PAHO). Some progress has been made in controlling the disease, reducing the number of human cases. In Brazil, in 2015, was reported only one case of human rabies. **Canine Visceral Leishmaniasis (CVL)** is expanding in Brazil. It is a zoonosis of importance to public health. The causative agent of canine visceral leishmaniasis is a protozoan of the genus *Leishmania*, transmitted by mosquitoes belonging to the family of sandflies. Dogs are the main reservoir of the disease and humans, accidental hosts. This disease in dogs brings a lot of controversy, since the Ministry of Health together with the Ministry of Agriculture Livestock and Supply (MAPA) created the Interministerial Ordinance No. 1426 which prohibits the treatment with medicaments recommended for the treatment of human unregistered products in MAPA, recommending euthanasia of infected or sick dogs. **Canine Brucellosis** is characterized as a chronic infectious anthroozoonosis that despite low incidence in the human population and its mild signs has great socioeconomic importance because it is the main cause of infertility in domestic canids worldwide and it is a zoonosis. It can infect humans in their work activities, especially in the case of shelter dogs. **Brazilian Spotted Fever** is caused by Gram negative bacteria, obligate intracellular, *Rickettsia rickettsii*. Its vector is the tick *Amblyomma cajennense*. With the proximity of urban and rural areas, the incidence of the disease in humans has increased, since exposure to vector and infected or sick animals is becoming more frequent. Rocky Mountain spotted fever has an acute evolution and its rapid diagnosis is important because it can be fatal in most cases, if the treatment is not rapidly initiated. **Toxoplasmosis** is one of the most worldwide spread zoonoses, caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, which has three distinct genotypes. Its

definitive host is cat and other felines, and because of the increasing importance as a pet, there is need for further clarification about its transmission, especially, when there is the involvement of pregnant women. There are controversial and misconceptions about the direct contact with these animals and their transmission. Poor hygiene and eating raw foods are the main sources of contamination in humans and these health professional must guide the population as the essential hygiene measures to reduce its incidence. **Leptospirosis** is another zoonosis of worldwide distribution caused by the different serovars of *Leptospira interrogans* that affects several species of domestic and wild mammals. The dog and cat eliminate leptospire in the urine, with important epidemiological role in the spread of this disease, which is prevalent in places with poor sanitation. The bacteria enter the body through contact with contaminated water or urine with the injured skin and mucous membranes, evading the body's natural defenses and staying mainly in the kidney and liver. Vaccination and environmental management are the main forms of prevention.

Keywords: zoonosis, leptospirosis, brucellosis, leishmaniasis, rabies, toxoplasmosis.

ZOONOSIS PRINCIPALES EN PEQUEÑOS ANIMALES: UNA BREVE REVISIÓN

RESUMEN

Con la estrecha relación entre las personas y los animales, zoonosis toman un papel aún más importante en la salud pública. Entre las principales zoonosis se pueden destacar la rabia, la leishmaniasis, la brucelosis canina, la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, la toxoplasmosis y la leptospirosis que presentan epidemiológicos aspectos y control diferente entre ellos. La **Rabia** es 100% mortal en los animales y los seres humanos, causando encefalomiелitis aguda, todavía se considera un problema grave de salud pública. Desde la década de 1950 y 1960, cuando hubo un alto número de casos de rabia humana transmitida por perros, principalmente en Brasil, se observó crecimiento de las actividades gubernamentales, tales como la implementación del "Programa Nacional de Prevención de la rabia humana" (PNPR) en 1973, a nivel nacional, y luego en 1983 el "plan de Acción para la eliminación de la rabia urbana de las ciudades de América Latina", desarrollado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Se han hecho algunos avances en el control de la enfermedad, lo que reduce el número de casos humanos se han reportado un solo caso de rabia humana en Brasil en 2015. **Leishmaniasis Visceral Canina (LVC)** no se está expandiendo en Brasil. Es una zoonosis de importancia para la salud pública. El agente causante de la leishmaniasis visceral canina es un protozoo del género *Leishmania*, transmitida por mosquitos que pertenecen a la familia de los flebótomos. Los perros son los principales reservorios de la enfermedad primaria como seres humanos, huéspedes accidentales. Esta enfermedad en los perros trae mucha controversia, ya que el Ministerio de Salud, junto con el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA) creó la Orden Interministerial N° 1426, que prohíbe el trato con el uso humano o productos no registrados en el MAP, recomendar la eutanasia de los perros infectados o enfermos. La **Brucelosis** canina se caracteriza como un antroponosis infecciosa crónica que a pesar de la baja incidencia en la población humana y sus signos leves de esta especie, tiene una gran importancia socioeconómica, ya que es la principal causa de infertilidad en los cánidos domésticos en todo el mundo y es una zoonosis casual, incluso en el caso de la enfermedad en los perros pueden infectar a los seres humanos en sus actividades de trabajo, especialmente en el caso de los perros del refugio. La **Fiebre de las Montañas Rocosas** es causada por bacterias gram negativas, intracelulares obligados, *Rickettsia rickettsii*. Su vector de la garrapata *Amblyomma ixodidae cajennense*. Con la proximidad de las zonas urbanas y rurales, la incidencia de la enfermedad en los seres humanos ha aumentado, ya que la

exposición a vectores y animales infectados o enfermos es cada vez más frecuente. Fiebre de las Montañas Rocosas es la evolución aguda y su diagnóstico rápido es importante, ya que puede ser fatal en la mayoría de los casos, si la imposición del tratamiento rápidamente. **Toxoplasmosis** es una de las zoonosis propagación más en todo el mundo, causadas por el protozoo *Toxoplasma gondii*, que tiene tres genotipos distintos. Su gato huésped definitivo y otros felinos, y debido a la creciente importancia como animal de compañía, existe la necesidad de una mayor clarificación sobre su transmisión, sobre todo cuando existe la participación de las mujeres embarazadas. Hay polémica y conceptos erróneos sobre el contacto directo con estos animales y su transmisión. La falta de higiene y alimentos crudos alimenticios son las principales fuentes de contaminación en los seres humanos, y de esta manera profesional de la salud debe orientar a la población como las medidas de higiene esenciales para reducir su incidencia. **Leptospirosis** es otra zoonosis de distribución mundial causada por la bacteria *Leptospira interrogans*, y afecta a varias especies de mamíferos domésticos y salvajes. El perro y el gato eliminan leptospiras en la orina, con el papel epidemiológico importante en la propagación de esta enfermedad, que es frecuente en lugares con condiciones sanitarias deficientes. Las bacterias entran en el cuerpo a través del contacto con agua contaminada con la orina o la piel lesionada y las membranas mucosas, evadir las defensas naturales del cuerpo y permanecer principalmente en el riñón y el hígado. La vacunación y la gestión del medio ambiente son las principales formas de prevención.

Palabras clave: zoonosis, leptospirosis, brucelosis, leishmaniasis, rabia, toxoplasmosis.

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas dos animais para o ser humano são denominadas zoonoses, e estão distribuídas amplamente no mundo de acordo com as diferentes variações ambientais, socioeconômicas e culturais (1). A incidência destas vem aumentando gradativamente devido às constantes mudanças promovidas pelo ser humano no meio ambiente. Geralmente a maior disseminação de doenças se dá em regiões em que habitam populações mais carentes, com baixa renda e hábitos precários de higiene, propiciando uma maior proliferação de agentes patogênicos (2).

Devido ao estreitamento da relação humano-animal de companhia, os animais de estimação têm representado um maior risco na transmissão de algumas zoonoses, principalmente em casos em que esses animais exercem importante papel como portadores reservatórios e por transitarem em locais públicos, eliminando seus dejetos contaminados, facilitando a infecção de seres humanos bem como de outros animais (2). Além dos riscos proporcionados aos animais e seres humanos pelas zoonoses, há perdas em setores da saúde e agricultura, e grande prejuízo econômico (3).

A medicina veterinária está totalmente relacionada com a saúde pública, principalmente no que envolve a proteção aos alimentos e no combate e erradicação de zoonoses (3). Os aspectos epidemiológicos das doenças nos animais esclarecem como as enfermidades de caráter zoonótico podem chegar até os humanos. O presente estudo visa discorrer sobre as principais zoonoses transmitidas por animais de companhia principalmente no Brasil, e que acarretam grande impacto sócio-econômico-cultural para a população. Serão abordados os aspectos epidemiológicos, de controle e de impacto na saúde pública. Dentre as zoonoses que serão discutidas, estão: raiva, leishmaniose visceral canina, brucelose, toxoplasmose, leptospirose e febre maculosa.

A raiva é uma doença infecciosa, de caráter zoonótico e etiologia viral, que pode acometer todos os mamíferos, incluindo humanos, causando encefalomielite aguda com letalidade de cerca de 100%, sendo, portanto, considerada ainda um grave problema de saúde pública (4). A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), em seu Código Sanitário para os

Animais Terrestres, lista a raiva na categoria das enfermidades comuns a várias espécies e se estima que ocorram cerca de 55.000 óbitos de raiva humana ao ano, a maioria transmitida por cães, principalmente na África e Ásia (5).

Alguns avanços foram obtidos no controle dessa doença, a exemplo da redução dos casos humanos e caninos devido, principalmente, às atividades direcionadas ao controle da raiva em cães (4), a partir da obrigatoriedade da vacinação antirrábica canina pelas prefeituras municipais, em 1973, pelo Ministério da Agricultura. Apesar de medidas profiláticas para seu controle, a raiva vem se mantendo endêmica em algumas regiões do Brasil, pois há diferentes espécies animais, com características biológicas do vírus da raiva menos estudadas, e pode-se citar o envolvimento cada vez maior dos morcegos na transmissão da doença para os animais domésticos e para os humanos. Assim, é importante estudar o comportamento de amostras do vírus da raiva, isoladas destas espécies, bem como a proteção conferida pelas vacinas utilizadas no controle da doença (6).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose causada por protozoário do gênero *Leishmania* e sua transmissão ocorre pela picada do mosquito flebotomíneo. Os cães são os reservatórios primários, porém o parasita pode se manter também em animais silvestres, e o ser humano e gatos são hospedeiros acidentais (7). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a LVC é uma das principais zoonoses, com notificações de casos em 88 países e potencialmente letal para os humanos se não for devidamente tratada (8,9).

A brucelose canina é uma antropozoonose infecciosa crônica de distribuição mundial. É causada principalmente pela *Brucella canis*, sendo a principal causa de infertilidade em canídeos domésticos em todo o mundo (10). Foi isolada pela primeira vez por Leland Carmichael em 1966 (11). Caracteriza-se pela sua transmissão venérea e também oral. Causa abortos tardios nas fêmeas, epididimite e prostatite em machos, levando à infertilidade em ambos os sexos, bem como linfadenite e discoespondilite como sinais extragenitais (12).

A toxoplasmose é uma das doenças mais prevalente mundialmente, acometendo as espécies de sangue quente, incluindo humanos. É causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, e tem como hospedeiro definitivo os felinos, sendo humanos, mamíferos e aves hospedeiros intermediários (13).

Os felinos são os únicos que eliminam os oocistos nas fezes, pois fazem o ciclo enteroepitelial. Esses se tornam infectantes mediante temperatura e condições ambientais ideais para sua esporulação no meio ambiente. Os demais animais apenas transmitem o parasita se houver ingestão de sua carne contendo cistos com bradizoítos ou por via congênita a partir dos taquizoítos (14). As principais formas de infecção são, portanto, pela ingestão de tecidos contendo cistos com bradizoítos, ingestão de oocistos esporulados, e pela transmissão transplacentária (15).

Pode causar sinais neurológicos graves em pequenos animais, como ataxia, convulsões, parestesia, além de comprometimento dos locais de replicação do parasita, como pulmões, fígado, olhos, sistema nervoso, fígado e tecido muscular esquelético (16). Considerando-se as formas de infecção, a maneira mais eficaz de combater a doença é pela orientação da população quanto aos hábitos de higiene como lavar as mãos, lavar hortaliças e frutas, não ingerir carne crua e/ou mal passada entre outros (17).

A leptospirose é outra zoonose de caráter mundial, prevalecendo em países da Ásia e América do Sul. É causada principalmente pelos sorovares da bactéria *Leptospira interrogans*, podendo afetar diversas espécies de mamíferos, incluindo cães e gatos, apesar da última espécie ser mais resistente. Entre os animais domésticos, o cão tem papel epidemiológico importante, eliminando leptospiros pela urina por períodos prolongados, contaminando o ambiente (18). O agente sobrevive em água de rios e ambientes úmidos e a infecção se dá por contato direto com a urina de animais infectados ou indireta a partir da água contaminada com a bactéria (19). Leptospiros patogênicas têm alta motilidade e

capacidade de sobreviver e se multiplicar nos tecidos escapando dos mecanismos de defesa naturais (20).

Apesar dos cães serem hospedeiros de manutenção do sorovar *Canicola*, frequentemente, são hospedeiros acidentais do sorovar *Icterohaemorrhagiae*, cujos hospedeiros permanentes são os ratos, principalmente *Rattus norvegicus* (19).

Em humanos, ocorrem desde a forma assintomática, casos simulando quadro gripal, com febre, dores de cabeça e mialgia, a casos mais severos com sepse e falência múltipla de órgãos, incluindo disfunções hepáticas e renais associadas à hemorragia pulmonar (20).

Quanto aos animais domésticos, cães e cavalos apresentam a forma aguda da doença incluindo a síndrome ictero-hemorrágica. Outras espécies, principalmente animais de produção, apresentam a forma reprodutiva da doença, caracterizada por abortos e partos prematuros, natimortos e mumificação fetal, e outros problemas reprodutivos, levando a perdas substanciais (21).

Em condições experimentais, demonstrou-se que gatos podem adquirir leptospirose pela ingestão de roedores infectados, bem como pela ingestão de água contaminada. Embora não haja relatos de leptospirose clínica em condições naturais nessa espécie, estudos sorológicos conduzidos em diversas regiões apontaram frequências de soropositividade que chegam a 33,3% (22).

A Febre Maculosa Brasileira, conhecida também como febre petequial, foi reconhecida no Brasil pela primeira vez em São Paulo em 1929. Causada pela bactéria gram negativa, intracelular obrigatória *Rickettsia rickettsii* (23), é uma zoonose na qual o agente etiológico circula entre vetor e hospedeiro independente da participação de humanos. A maior incidência ocorre na região Sudeste do país, onde há maior ocorrência do carrapato, responsável pela transmissão, o *Amblyomma cajennense*. Ainda estão relacionados com a transmissão o *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma dubitatum* (24,25).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Raiva

O vírus da raiva pertence ao Gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae* e ordem *Mononegavirales*. Sua morfologia característica lembra o aspecto de uma “bala de revólver”, com diâmetro médio de 75 nm e comprimento entre 100 e 300 nm (26). Trata-se de um vírus envelopado, composto por uma dupla membrana fosfolipídica, na qual são inseridas glicoproteínas denominadas “G”, com aproximadamente 9 nm projetadas para o exterior. O nucleocapsídeo possui conformação helicoidal e é composto de um filamento único de RNA negativo, não segmentado, fortemente unido à nucleoproteína “N” e associados à presença de outras três proteínas estruturais (P, M e L). A partícula completa do vírus rábico é chamada de vírion (27).

Acredita-se que o lissavírus dos quirópteros seja mais antigo que o dos carnívoros e que provavelmente o vírus da raiva tenha se originado por eventos de troca entre lissavírus de hospedeiros morcegos. O gênero *Lyssavirus* é atualmente subdividido em sete genótipos, sendo o genótipo “1” classificado como o vírus da raiva (28,29).

Por ser envelopado é pouco resistente fora do organismo animal, sendo rapidamente inativado por agentes químicos (éter, clorofórmio, detergente, ácidos e álcalis fortes), aos agentes físicos (calor, luz ultravioleta) e às condições ambientais, como dessecação, luminosidade e temperatura excessiva (27).

A raiva está presente em todos os continentes, com exceção da Oceania e da Antártica, e de alguns países insulares que conseguiram sua erradicação, como o Reino Unido e Japão. Esta ampla distribuição pode ser atribuída à alta capacidade do vírus de se adaptar em

diferentes reservatórios, sendo o genótipo tipo “1” o representante das amostras do vírus da raiva nas Américas (30).

Calcula-se na Ásia a ocorrência de 35.000 a 55.000 casos humanos de raiva anualmente e de, aproximadamente, 5.000 a 15.000 mortes na África. Na América Latina, o número de casos de raiva humana se limita a menos de 100 por ano, já na América do Norte e Europa, este número é inferior a 50 (31).

No Brasil, a raiva é considerada uma doença endêmica, com distribuição bastante heterogênea. Por suas características continentais e sua diversidade de fauna é de difícil erradicação, sendo que as regiões Nordeste e Norte apresentam maiores incidências da doença, enquanto que a região Sul é considerada uma área de raiva controlada, não apresentando novos casos desde 1990 (32).

A transmissão se dá pela inoculação percutânea do vírus contido na saliva de um animal infectado, pela mordedura, arranhadura ou lambadura, sendo também possível a infecção por feridas ou soluções de continuidade já existentes na pele, quando em contato com a saliva contaminada (33,34). A possibilidade de sangue, leite, urina ou fezes conter uma quantidade de vírus suficiente para desencadear a raiva é remota. Há estudos experimentais e relatos de casos da transmissão por via aérea e oral, assim como em procedimentos médicos, a exemplo dos transplantes de córnea e outros, porém não apresentam significância epidemiológica importante no ciclo da doença (35-37).

O vírus se replica no local da inoculação, frequentemente o da mordedura, depois é conduzido via terminações nervosas motoras, aos nervos periféricos e pelas junções sinápticas célula-célula e/ou conexões intercelulares diretas, atinge o sistema nervoso central, de onde se dissemina via nervos periféricos de forma centrífuga para os tecidos não neuronais para todo organismo, tendo sido detectado seus antígenos na epiderme, retina, pulmões, miocárdio, mucosa gástrica, bexiga e uretra, porém o principal local de sua replicação são as glândulas salivares (38).

O período de incubação viral é variável, sendo a média em cães de três a oito semanas, com extremos variando de dez dias a seis meses, porém já foram relatados períodos mais longos. Pode se manifestar de formas variadas nas diferentes espécies atingidas, dependendo da localização da lesão. Porém podem ser observadas apresentações clássicas da doença, conhecidas como a forma furiosa e a forma paralítica (39).

No início do quadro, ou fase prodrômica, que antecede as manifestações clássicas, pode se observar sinais clínicos gerais e ainda pouco sugestivos, como apatia, inapetência, alterações de comportamento e incoordenação motora. A fase inicial pode ser seguida pela forma furiosa, frequentemente presente nos cães e caracterizada principalmente por um quadro de intensa agressividade, dificuldade de deglutição e intensa salivação, podem estar presentes ainda sinais de depressão, insônia e/ou febre. Na forma paralítica, o sinal mais observado é a paralisia da mandíbula e dos membros posteriores, podendo haver morte súbita por paralisia dos músculos respiratórios. A paralisia evolui por todo corpo na fase terminal e a morte acontece em alguns dias (7 a 10 dias), entretanto esta forma é comum em bovinos, secundária a lesões na medula, troco encefálico e cerebelo (40).

O vírus da raiva se mantém na natureza por meio de quatro ciclos interligados: o ciclo urbano, com os cães e gatos domésticos como transmissores, o ciclo silvestre, o ciclo aéreo, tendo os morcegos como vetores, e o ciclo rural, onde entram os herbívoros, principalmente bovinos e equinos. O ciclo urbano, com o cão doméstico como hospedeiro natural, tem grande importância zoonótica pela relação próxima deste com os seres humanos. Porém, o ciclo aéreo tem se apresentado como segundo principal meio de transmissão da doença para humanos (40).

Houve uma significativa diminuição do número de casos de raiva humana transmitidas por cães e gatos domésticos, por outro lado observa-se a constante participação dos morcegos na contabilidade do total dos casos nacionais, tendo como principal ocorrência o surto de

raiva humana transmitida por morcegos hematófagos na região da Amazônia, em 2004 e 2005 (41). Recentemente, foi confirmado um caso de raiva humana na cidade de Corumbá-MS, com transmissão pela mordida de um cão de rua infectado e foram reportados 45 casos de raiva animal no estado, sendo este o único caso de raiva humana a nível nacional em 2015 (42).

Os morcegos encontrados no Brasil correspondem a quase 50% dos morcegos encontrados em todo continente americano em um total de 144 espécies, sendo a grande maioria de hábito alimentar insetívoro, com 87 espécies; seguidos pelos frugívoros, com 35 espécies; nectarívoros com 14 espécies; carnívoros com 5 e hematófagos com 3 espécies. Entre elas, a espécie de morcego hematófago mais estudada é a *Desmodus rotundus*, por ser o principal transmissor da raiva aos herbívoros, pois é a espécie mais abundante e tem nesses animais a sua maior fonte de alimento (43,44).

O encéfalo é o tecido de eleição para o diagnóstico de raiva, associado ao tronco e medula no caso de equinos. Os fragmentos a serem enviados para o laboratório são porções do cerebelo, córtex e hipocampo, já animais pequenos, como morcegos, gambás e saguis, devem ser encaminhados inteiros. Todas as amostras devem ser enviadas refrigeradas.

A detecção citológica dos corpúsculos de Negri é um rápido diagnóstico laboratorial, porém, apresenta baixa sensibilidade. A técnica de imunofluorescência direta (IFD) é amplamente utilizada como técnica de eleição para o diagnóstico de raiva por possuir alta sensibilidade e especificidade e pela sua rapidez. A IFD é acompanhada por um teste biológico pela inoculação em camundongos (45), de acordo com orientações da OMS.

Em humanos o diagnóstico sorológico também pode ser utilizado, onde a elevação de títulos de anticorpos soroneutralizantes no líquido de pacientes suspeitos é considerada diagnóstico, entretanto no caso de óbito é sempre recomendado o diagnóstico pela IFD e pela bioprova a partir da inoculação intracerebral em camundongos.

A prevenção da raiva tem se baseado na vacinação, com vacinas inativadas, e no controle de transmissores, principalmente de cães e gatos, com a eliminação de animais errantes. O controle de morcegos hematófagos é feito aplicando-lhes uma pasta com uma substância anticoagulante nos animais capturados, seguida de sua soltura para posterior disseminação do produto para demais animais da colônia (44).

2.2 Leishmaniose Visceral Canina

Existem dois grupos de leishmanias, um que causa a leishmaniose tegumentar (leishmaniose cutânea, mucocutânea e cutânea difusa) e, o grupo que causa a leishmaniose visceral. No Brasil, o agente etiológico da leishmaniose em sua forma visceral é a *Leishmania chagasi* (46). Os cães geralmente desenvolvem a forma visceral da doença. São infectados pela picada das fêmeas dos mosquitos da família dos flebotomíneos, do gênero *Lutzomya*, durante seu repasto sanguíneo. No Brasil, o principal vetor é a *Lutzomyia longipalpis*, também conhecida como mosquito-palha, birigui ou tatuquira. As formas imaturas dos vetores desenvolvem-se em locais úmidos, ricos em matéria orgânica e com baixa luminosidade (46).

As formas promastigotas se desenvolvem nos flebotomíneos e são inoculadas no hospedeiro vertebrado quando o vetor se alimenta, transformando-se em amastigota. É fagocitada pelos macrófagos e se disseminam. O período de incubação é variável, entretanto é longo entre 3 a 7 meses, podendo chegar a mais de um ano.

Os cães com leishmaniose visceral podem apresentar perda de peso, poliúria, polidipsia, debilidade muscular, depressão, vômito, diarreia, tosse, epistaxe, espirro e melena (47). Dentre os achados de exame físico, merecem destaque a linfadenomegalia, caquexia, hipertermia, esplenomegalia, onicogrifose, uveíte e conjuntivite. A principal causa de morte dos cães com LVC é a insuficiência renal. As manifestações cutâneas na LVC ocorrem entre 50% a 90 % dos cães infectados. O sinal dermatológico mais comum é a dermatite esfoliativa

com escamas esbranquiçadas, normalmente mais evidentes na cabeça, orelhas e extremidades (48).

Anteriormente, até a década de 90, a região Nordeste correspondia a 90% dos casos de LV do país. Porém, a doença expandiu para as regiões Centro Oeste, Sul, Sudeste e Norte, modificando esta situação. No estado de São Paulo, foi diagnosticada em 1998 com o primeiro caso de LVC no município de Araçatuba (49).

O diagnóstico da LVC pode ser realizado a partir de exames parasitológicos, sorológicos e moleculares. O diagnóstico parasitológico ocorre pela demonstração de amastigotas no aspirado de linfonodos, de medula óssea ou em impressões dérmicas coradas com Giemsa e Wright, fornecendo um diagnóstico definitivo. Os testes sorológicos evidenciam a presença de anticorpos circulantes, mas podem falhar, por exemplo, no período pré-patente e antes da soroconversão (50). Pode realizar-se também, os métodos moleculares, como PCR de aspirados da medula óssea e linfonodos (51).

O tratamento da LVC pode propiciar uma melhora dos sinais clínicos da doença, porém, o prognóstico é muito variável, e na maioria das vezes os casos são recorrentes. Além disso, o tratamento não impede que o cão se mantenha infectante para o vetor, ou seja, o cão continua como reservatório (52), apesar de com carga parasitaria menor. Em 11 de julho de 2008, criou-se a Portaria Interministerial do Governo Federal, de número 1.426, que proíbe os médicos veterinários de realizarem tratamento da LVC em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano para o tratamento da doença, ou não registrados no MAPA e recomenda-se o sacrifício dos cães infectados ou doentes (53). Assim sendo, qualquer médico veterinário que desrespeitar a portaria, ou ainda que omita a notificação, poderá sofrer penalidade por parte do Conselho Federal de Medicina Veterinária, já que a LVC é uma doença de notificação compulsória (54).

No Brasil, muitos proprietários de cães se recusam a eutanasiar o animal positivo para LVC. Este fato é relatado por profissionais ligados ao setor público e responsáveis pelo controle da doença. Desta forma, há profissionais recomendando protocolos de tratamento, com medicamentos alternativos com o que tem se observado melhora no quadro clínico. Enfatiza-se a importância de se discutir com o proprietário prós e contras do tratamento, pois se trata de um sério problema de saúde pública (55), considerando-se que mesmo com o tratamento, o animal continua sendo uma fonte de infecção, pois não ocorre a eliminação completa do parasita, apenas a melhora aparente do animal.

Apesar da polêmica a respeito da vacina, ela é uma ferramenta importante e pode ser utilizada associada a outros métodos de controle como a utilização de coleiras repelentes, principalmente nas regiões hiperendêmicas (56).

2.3 Brucelose

Apesar dos relatos de casos de brucelose em cães causados por quatro das seis espécies do gênero *Brucella*, três delas (*Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus*) produzem infecções apenas ocasionais, enquanto *B. canis* é a espécie de maior importância epidemiológica. *B. canis* é um cocobacilo gram-negativo que se diferencia das demais espécies do gênero *Brucella* (exceto *Brucella ovis*) na medida em que forma colônias rugosas (57). Ela se desenvolve em meios de cultura comum, incluindo agar triptose e não necessita de gás carbônico para o seu isolamento. Ela ocorre em todas as raças de cães, bem como em humanos.

A principal forma de contágio com *Brucella canis* é a partir do contato com a mucosa genital, oronasal e conjuntival, mas pode também contaminar os cães por meio de lesões de pele. O modo mais comum de transmissão é a venérea, embora os cães também possam se infectar quando expostos à secreção vaginal, placenta, urina, fetos e natimortos e secreções provenientes de aborto (58). Os machos eliminam o agente pelo sêmen. Apesar de ambos os

sexos excretarem bactérias na urina, as concentrações na urina dos machos são mais elevadas, atingindo entre 10^3 e 10^6 bactérias/mL de urina (59). Para o ser humano a transmissão se dá principalmente pelo contato com o agente.

Por esta razão, a urina do macho é mais perigosa como via de transmissão do que a da fêmea. A excreção de bactérias pela urina inicia em 4 a 8 semanas após a infecção. A concentração bacteriana no leite contaminado é alta, entretanto alguns autores não consideram uma importante via de transmissão, uma vez que os filhotes se infectam no útero (58). Pode-se pensar que a partir do leite pode ocorrer contaminação ambiental podendo ser importante do ponto de vista epidemiológico.

A infecção também pode ocorrer via fômites, tais como vasilhas de água e alimentos, equipamentos e roupas. O agente pode sobreviver no ambiente por vários meses em condições de alta umidade, temperaturas baixas, e abrigadas da luz solar, especialmente se houver a presença de material orgânico. *B. canis* pode resistir à secagem e sobreviver em poeira (60), podendo se considerar, portanto, a sua resistência frente às condições ambientais.

Após sua penetração, são fagocitadas por macrófagos e outras células fagocíticas de defesa, atingindo órgãos linfáticos (gânglios linfáticos e baço) e órgãos genitais, onde se multiplicam. A bacteremia ocorre de 1 a 4 semanas após a infecção, persistindo por pelo menos 6 meses. A seguir pode ocorrer bacteremia intermitente, por até 64 meses (58). Inicialmente o organismo se sensibiliza e só após 4 a 6 semanas desenvolve anticorpos humorais das classes IgM e a seguir IgG.

A orquite e epididimite são as principais manifestações em machos. Pode haver ainda atrofia testicular, infertilidade e linfadenopatia generalizada, tanto nos machos como nas fêmeas (10). Nestas, ocorre aborto e metrite, com possibilidade de disseminação, sendo isoladas do sangue e outros órgãos, além dos genitais. Nos machos, as brucelas podem se alojar na próstata e serem eliminadas juntamente com a urina por período de tempo prolongado, sendo importante via de transmissão para os humanos e sério problema em saúde pública (11).

O diagnóstico definitivo da brucelose canina se dá pelo isolamento bacteriano do micro-organismo, no entanto, isso nem sempre é possível (60). Os vários diagnósticos sorológicos variam em sensibilidade e especificidade, conduzindo a falsos positivos e negativos, dependendo da fase da doença e o antígeno ou o método utilizado (61). Os dados clínicos e da anamnese devem ser usados em associação com a sorologia e bacteriologia para se chegar a um diagnóstico definitivo (60).

Os anticorpos contra o agente podem ser detectados após duas semanas de infecção. Eles são produzidos em resposta aos antígenos presentes na parede bacteriana e também às suas proteínas citoplasmáticas. Os métodos utilizados para a detecção variam em sensibilidade, especificidade e complexidade. Atualmente há vários métodos sorológicos utilizados na prática: prova do antígeno tamponado acidificado (Card Test); reação de soroaglutinação lenta (SAL); prova do 2-mercaptoetanol (2-ME); fixação de complemento (FC), ELISA e imunodifusão em gel de ágar. Para a detecção de anticorpos contra *B. canis* e *B. ovis*, é recomendada a técnica de imunodifusão em gel de ágar.

O cultivo bacteriano é a melhor maneira de confirmar a infecção por *B. canis* e o melhor método para o diagnóstico precoce de infecção em cães que não receberam tratamento com antibióticos. Infelizmente, um resultado negativo não confirma a ausência de infecção, pois pode ter havido cura da doença, uma vez que as bactérias podem estar temporariamente ausentes no tecido cultivado.

O material mais utilizado para cultura é o sangue, uma vez que, além da fácil obtenção, é "estéril", o que permite que as culturas não sejam contaminadas. Meios aeróbicos são usados para a hemocultura, incubando – se por nove dias a 37°C. Subculturas em ágar triptose, geralmente adicionando polimixina B e bacitracina aos meios para inibir o

crescimento de possíveis contaminantes, devem ser realizadas nos dias 3, 6 e 9 de incubação (62).

Frequentemente, o sêmen é contaminado, assim como as secreções vaginais durante o estro e após abortos. Uma alta concentração de micro-organismos pode ser encontrada na placenta, apesar dos fetos abortados poderem não conter o agente. Pesquisas mostram que amostras de urina foram positivas para o cultivo bacteriano mesmo em animais nos quais bactérias não foram encontradas no sangue, entretanto, este teste é mais confiável em machos, uma vez que a urina das fêmeas pode estar frequentemente contaminada por outros patógenos (63). Os melhores órgãos para isolamento são gânglios linfáticos, próstata, baço, medula e, às vezes, fígado e testículos (64).

Por se tratar de bactéria intracelular, os antibióticos não conseguem alcançá-la adequadamente. Além disso, é sensível a relativamente poucos antibióticos (65). Muitos deles têm sido testados, sozinhos ou em combinação, porém nenhum foi 100% eficaz na eliminação do agente. A bacteremia pode ser eliminada em alguns casos e não se encontrar resposta sorológica, especialmente, daqueles contra a parede celular bacteriana. No entanto, as bactérias podem permanecer viáveis nos tecidos na maioria dos casos (66).

Frequentemente, os títulos reaparecem tardiamente após a infecção e em diferentes momentos após o término do tratamento. Nas fêmeas, pode ocorrer muitas vezes durante o estro ou após situações estressantes. Mesmo as fêmeas não tratadas podem dar à luz, mas os filhotes nascem infectados, mantendo assim a doença nos casos de canis. Os machos normalmente permanecem estéreis devido às lesões testiculares, mas, mesmo assim, podem continuar a transmitir a doença. A resposta ao tratamento é melhor quando há associação com outro antibiótico. O tratamento de 105 cães com tetraciclina oral (30 mg/kg) duas vezes ao dia, durante 28 dias, e estreptomicina (20 mg/kg) uma vez por dia, por 14 dias consecutivos revelou negatividade na sorologia de 81 animais (67).

Todos os novos animais (machos ou fêmeas) que entram no canil devem ser criteriosamente examinados e mantidos em quarentena por 8 a 12 semanas (10). Machos e fêmeas utilizados como reprodutores devem ser submetidos a teste sorológico semestralmente para minimizar o risco de infecção e propagação da doença (10). A incidência da doença em seres humanos não é exatamente conhecida, pois apesar da *B. canis* afetar humanos, há poucos relatos da doença, que ocorre geralmente a partir do contato direto com material de abortos ou de secreções durante o estro (68). Foram relatados casos de infecção relacionados às atividades laboratoriais (69). A doença inicia com febre prolongada, gânglios linfáticos aumentados, faringite, dor nas articulações tremores e perda de peso, entretanto, a clínica é muito polimorfa com quadro clínico muito variado sendo o diagnóstico laboratorial importante para elucidação (70). As pessoas infectadas respondem rapidamente a tratamentos com antibióticos, incluindo as tetraciclina isoladamente, ou em combinação com estreptomicina ou ampicilina.

2.4 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença de caráter multissistêmico, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, agente intracelular que parasita, praticamente, todos os mamíferos e as aves. O ciclo reprodutivo do *T. gondii* inclui a presença de taquizoítos, que ocorrem na fase aguda, de bradizoítos que se localizam em cistos teciduais e são detectados na fase crônica da doença, e de esporozoítos que estão presentes em oocistos, formados no trato digestivo de felinos (71).

Os felinos são os hospedeiros definitivos pois são os únicos que desenvolvem o ciclo enteroepitelial. Os oocistos são eliminados pelas suas fezes, e esporulam no ambiente, sendo então infectantes, e também mais resistentes às condições ambientais. Humanos, demais mamíferos e aves são hospedeiros intermediários, nos quais ocorre apenas a reprodução

assexuada do protozoário, sendo encontrado, portanto, na forma de bradizoítos ou de taquizoítos.

É uma doença que traz prejuízos devido às grandes perdas econômicas nos animais de produção, principalmente em ovinos. É causada principalmente pela ingestão de carne crua e/ou mal cozida contendo cistos teciduais, ou pela ingestão de água e alimentos contaminados pelos oocistos provenientes das fezes de felinos. Outra forma de transmissão é a vertical, que se dá da mãe para o feto durante a gestação pela passagem transplacentária de taquizoítos.

A infecção nos felinos ocorre pelo seu hábito de predador, a partir da caça de roedores ou passeriformes que contenham cistos de bradizoítos, ou pela ingestão direta de taquizoítos presentes na carne crua e/ou mal passada, ou pela ingestão de oocistos presentes no ambiente. Três a 10 dias após a ingestão de tecido contendo cistos, os felinos começam a eliminar os oocistos. Após 3 a 5 dias no ambiente, com temperatura e condições ideais para seu desenvolvimento, é que os oocistos se tornam infectantes. A eliminação ocorre por 7 a 15 dias pelas fezes em grande quantidade. Normalmente esse fato ocorre apenas após a primo - infecção, adquirindo resistência e tornando-se imunes praticamente por toda a vida (17).

Quando o hospedeiro intermediário ingere os cistos ou oocistos, sua parede se rompe liberando as formas infectantes no intestino. Ocorre rápida multiplicação dentro das células e passagem para a forma evolutiva de taquizoítos, que acabam por romper estas células e se difundem para o tecido linfóide do trato intestinal, se disseminando para outras partes do organismo (17).

Os sinais clínicos que se desenvolvem após a infecção dependem da necrose tecidual que lesa e destrói as células devido à ação intracelular do agente. Os locais de maior replicação são pulmões, fígado, olhos, sistema nervoso, fígado e tecido muscular esquelético (16). As infecções agudas ocorrem de forma generalizada, podendo levar o animal a óbito em um curto período de tempo, e os principais sinais clínicos são vômito e diarreia, linfadenopatia, icterícia, uveíte, convulsões, opistótomos entre outros. Na infecção crônica, há presença de sinais neuromusculares, incluindo paresia, paralisia, ataxia, convulsão, em alguns casos miosite. Caso a transmissão ocorra via intrauterina, os filhotes podem apresentar miosite e/ou radiculoneurite (17).

Em cães, há uma maior prevalência da doença conforme aumenta a sua idade devido as maiores chances de exposição, estando muitas vezes associada ao vírus da cinomose ou outras enfermidades imunossupressoras (72,73).

Os felinos normalmente não apresentam sinais clínicos, porém, se apresentarem doenças imunossupressoras concomitantes, podem desenvolver quadros de diarreia, hepatite, pneumonia, inflamação ocular e distúrbios neurológicos, sendo que a doença é mais grave em gatos recém-nascidos que podem desenvolver ascite, uveíte, depressão, letargia, encefalite, hipotermia podendo levar a óbito (16).

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser feito por testes diretos e indiretos, sendo visualizado o parasita desde esfregaço de conjuntiva ocular como por material proveniente de punção de linfonodo e fígado. A interpretação dos exames deve ser feita de forma correta para diferenciar infecção e doença. O diagnóstico mais utilizado é o sorológico. A sorologia pareada com intervalo de 15 dias entre uma amostra de soro e outra, com elevação do título em 4 vezes ou mais, determina se animal está infectado. Apesar de haver a possibilidade de encontrar oocistos nas fezes dos felinos, este método não é o mais confiável, pois a quantidade liberada nas fezes pode ser muito pequena e não detectada e os oocistos não se diferenciam de outros protozoários, havendo a necessidade de técnicas de esporulação.

A sorologia se baseia na detecção de IgG e IgM específicas, sendo que o rápido aumento de IgM sugere infecção recente, enquanto a IgG detecta a cronicidade da infecção. Há vários testes sorológicos que são recomendados como a reação de imunofluorescência indireta – RIFI, ELISA e a reação de aglutinação modificada – MAD, entre outras (74).

O tratamento para a toxoplasmose é possível tanto em animais como em humanos, visando evitar a progressão da doença. O tempo de duração vai depender do estado imunológico. Os fármacos, de modo geral, apenas suprimem a multiplicação do protozoário, mas não são efetivos em inativá-los (74).

Em pequenos animais, o tratamento instituído geralmente é com clindamicina por este ultrapassar a barreira hemato-encefálica e vascular (16,74) conferindo melhora clínica do paciente em até 24 horas após início do tratamento, com restabelecimento do apetite e do funcionamento dos nervos cranianos (16). A dose recomendada é de 25 mg/kg a cada 12 horas por 14 a 30 dias (74). Não há medicamento disponível para a eliminação de cistos teciduais (17).

A prevenção contra a toxoplasmose humana é a forma mais eficaz de combatê-la, sendo fundamental incentivar hábitos de higiene, não ingestão de carne crua e/ou mal passada, lavagem de frutas e vegetais, manter as caixas de areia dos felinos sempre limpas, usando luvas para a retirada diária das fezes para se evitar esporulação, lavar as mãos após manipulação de carne crua, ingerir apenas leite pasteurizado, alimentar os felinos com produtos industrializados, e se possível, evitar que os felinos saiam de casa. É interessante também o controle populacional de gatos errantes para diminuir a contaminação ambiental por oocistos (75).

2.5 Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial, causada por diferentes sorovares de *Leptospiras* que são espiroquetas de aproximadamente 0.1µm de diâmetro por 6-20 µm de comprimento, e incluem espécies saprófitas e patogênicas. São micro-organismos, anaeróbios e móveis. Possuem, em cada uma de suas extremidades, dois flagelos, podendo estar acompanhados de um gancho típico. O encontro do Subcomitê de Taxonomia realizado em Quito, Equador, em 2007 concedeu o status de espécie, pois anteriormente as leptospiras eram consideradas como genomoespécies 1, 3, 4 e 5, o que resultou em uma família compreendendo 13 espécies patogênicas de *Leptospira* (76). Mais de 250 sorovares, identificados com base em antígenos de superfície, são conhecidos, e cada um deles tem um hospedeiro preferencial. Os sorovares predominantes na infecção canina parecem ser o *canicola*, adaptado à espécie, e o *Icterohaemorrhagiae*, que tem o rato doméstico (*Rattus norvegicus*) como principal reservatório e o cão como hospedeiro acidental (77).

Cada sorovar é adaptado a um ou mais mamíferos como hospedeiro primário ou reservatório. Este hospedeiro pode abrigar o patógeno sem demonstrar sinais clínicos, além de disseminar o micro-organismo pela urina por meses após a infecção (78). As bactérias se alojam nos túbulos renais do animal reservatório e são excretadas pela urina. Há também o hospedeiro secundário ou acidental, que tende a desenvolver a doença clínica e, ou se curam, ou vão a óbito. O cão serve de hospedeiro acidental para a *Leptospira interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae*, cujos reservatórios são comumente roedores, gambás e animais de fazenda (79).

As leptospiras podem ser transmitidas diretamente entre hospedeiros pelo contato com urina, transferência placentária, mordidas ou ingestão de tecidos infectados, uma vez que o micro-organismo penetra as mucosas ou pele lesada. A transmissão indireta ocorre com a exposição de animais ou humanos susceptíveis a ambientes contaminados com urina de animais infectados. Água contaminada é a forma mais comum de disseminação, uma vez que ambientes alagados favorecem a sua sobrevivência.

Após penetração da pele ou mucosas, multiplicam com a entrada na corrente sanguínea. Isso dá início à fase leptospirêmica, que dura até 7 dias com rápida replicação bacteriana e lesão tecidual. Após essa fase há a invasão de vários órgãos, incluindo o rim, baço, fígado e sistema nervoso central, além de olhos e trato reprodutivo. Devido a multiplicação e produção

de citocinas e células inflamatórias há lesão tecidual, inicialmente células endoteliais e, mais tardiamente, os rins e fígado (80).

Após essa fase ocorre colonização renal, principalmente no epitélio dos túbulos renais com liberação de citocinas, recrutamento de células inflamatórias e nefrite aguda; hepática, com necrose centrolobular e obstrução do ducto biliar, podendo causar icterícia. A lesão endotelial origina edema tissular e coagulação intravascular disseminada (CID) nos primeiros dias. Em cães pode haver manifestação pulmonar com tosse e distrição respiratória. Essas alterações estão associadas à hemorragia devido à lesão endotelial e vasculite (78).

Os sinais clínicos são variáveis e estão associados ao sorovar envolvido. Sorovares adaptados à espécie hospedeira, como é o caso do sorovar canicola em cães, podem levar a infecção inaparente, enquanto outros sorovares podem levar a quatro síndromes no cão: icterícia, hemorrágica, urêmica (doença de Stuttgart) e reprodutiva. Tipicamente há ocorrência de febre, icterícia, vômito e diarreia, podendo evoluir para CID, uremia por falência renal, hemorragias e morte (76). Em felinos, apesar de serem mais resistentes, o sorovar mais comumente encontrado parece ser o *Pomona* (81,82), embora estudos conduzidos na França mostrem prevalência do sorovar *Canicola* (83). Gatos com altos títulos de anticorpos têm tendência a desenvolverem doença renal e eliminarem leptospiras na urina (84). Nessa espécie não há sinais clínicos agudos, embora 48% dos animais soropositivos apresentem poliúria e polidipsia (85).

Durante o estágio inicial da doença, pode haver leucopenia seguida de leucocitose com trombocitopenia, o que pode explicar a hemorragia. Durante a leptospirose crônica, os parâmetros hematológicos são normais, havendo necessidade da dosagem de enzimas hepáticas para investigação de hepatite crônica, além de sorologia e cultura bacteriológica (85) a partir do sangue ou da urina (78). Detecção de anticorpos específicos pelo teste de microaglutinação microscópica (MAT) e imunoenaios como o ELISA são comumente utilizados, além de microscopia de campo escuro e PCR. O MAT é o mais utilizado por possuir a vantagem de ser específico para sorovares (ou ao menos sorogrupos), porém não diferencia anticorpos resultantes de infecção ou vacinação. O animal é considerado positivo para leptospirose se houver um título na MAT ≥ 400 , associado com sinais clínicos, ou um aumento de quatro vezes na sorologia pareada.

O tratamento do paciente com leptospirose compreende tratar as manifestações renais ou hepáticas da doença, além do uso de antimicrobianos via oral como a doxiciclina a 5mg/kg/BID ou amoxicilina 22mg/kg/12h, ou ampicilina 22mg/kg/IV, e deve ser iniciado assim que haja suspeita da doença para eliminar a bacteremia e, conseqüentemente, o risco zoonótico (80).

O controle e a prevenção começam, idealmente, limitando o contato dos animais de estimação com animais-reservatório e com água contaminada. O controle de roedores é importante para a prevenção da exposição dos animais às leptospiras e, conseqüentemente, para diminuir os riscos de transmissão do agente aos seres humanos (22). Devem-se retirar vasilhas de água e comida durante a noite para evitar a presença de roedores.

Tendo em vista que a leptospirose é disseminada por diferentes espécies de animais selvagens e as leptospiras podem viver por longos períodos em água limpa, a vacinação canina com vacinas contendo os sorovares mais importantes para a espécie esta indicada pelo menos anualmente, lembrando que a proteção é sorovar específica.

2.6 Febre Maculosa

A febre maculosa é uma zoonose bacteriana causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, de ampla distribuição. No Brasil, a maioria dos casos ocorre na Região Sudeste, devido a maior concentração do carrapato transmissor, com casos esporádicos em outros estados brasileiros, em especial no Sul do país (86). É uma doença com caráter sazonal com maior incidência nos

meses de julho a setembro, o que coincide com o aumento de ninfas do carrapato *A. cajennense*, seu principal vetor. Essa sazonalidade é mais marcante no interior do estado, com pequena variação do número de casos na região metropolitana de São Paulo, durante todo o ano (25).

Cavalos e capivaras tem grande importância na transmissão da febre maculosa por serem os principais reservatórios do carrapato transmissor. Equinos mantidos em pastos sujos, com presença de rios ou córregos e vegetação alta tem ainda maior predisposição à infestação pelo *A. cajennense* (25).

Ressalta-se o aumento do número de casos da doença em humanos, na Região Sudeste do país a partir de 2000 até o ano de 2005. De 2005 até junho de 2015, a notificação de casos não apresentou grandes alterações. Segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica, CVE, no estado de São Paulo em 2000 foram notificados apenas 41 casos e em 2005, 90 casos. De 2005 a 2014, foram notificados entre 62 e 104 casos no estado, e em 2015 até o mês de julho já haviam sido notificados 21 casos da doença no estado (87). Verifica-se que a doença tem-se tornado mais importante, havendo a necessidade de maior vigilância e ações de controle.

A transmissão da *R. rickettsii* se dá pela picada do carrapato em qualquer fase, sendo mais frequente na infecção humana a transmissão pelas ninfas, que tem uma picada menos dolorida, diminuindo o incômodo no momento do repasto sanguíneo (23). O carrapato ixodídeo, se alimenta uma vez em cada estágio de sua vida, fazendo isso em vários hospedeiros, podendo transmitir a doença caso esteja infectado. Para que haja transmissão é necessário no mínimo de 8 a 10 horas de fixação do carrapato na pele do paciente humano ou do animal (23).

A transmissão pode ocorrer também no momento da retirada do carrapato que está fixado na pele, de forma inadequada, promovendo o seu esmagamento com refluxo de conteúdo estomacal no momento da retirada, facilitando a inoculação da bactéria (23). A contaminação do ixodídeo transmissor pode ocorrer de duas formas: a primeira é pela fixação e repasto em mamíferos infectados, principalmente, na fase de larva e ninfa, a segunda forma é a transmissão transtesticular e ovariana, podendo ocorrer ainda à transmissão venérea, quando carrapatos adultos copulam (88).

A *R. rickettsii* infecta o hospedeiro a partir da picada do carrapato e se multiplica em células endoteliais de vasos de menor calibre. Ocorre lesão das células endoteliais, promovendo ativação plaquetária e do sistema de coagulação. Há diminuição dos níveis de trombina III e o aumento da degranulação do fibrinogênio. Origina-se assim uma vasculite necrosante progressiva, devido à ativação da coagulação, quimiotaxia celular levando a necrose vascular. A necrose juntamente com o extravasamento sanguíneo e a ativação da coagulação são responsáveis pela trombocitopenia, observada em animais naturalmente infectados (89).

O período de incubação varia entre 2 a 14 dias após fixação do carrapato. O primeiro sinal clínico em cães e humanos naturalmente infectados é a febre, que aparece geralmente 2 a 3 dias após a fixação do carrapato. Outros sinais são êmese, diarreia, sinais oculares como congestão de esclera e uveíte, linfadenomegalia, edema, necrose cutânea, icterícia, hepatomegalia, petéquias e equimoses, rigidez articular e sinais neurológicos como hiperestesia, tetraparesia e sinais vestibulares (90).

O diagnóstico é baseado nos sinais clínicos associando-se com os resultados hematológicos sugestivos da infecção. O animal pode apresentar no início da doença hemograma com leucopenia discreta, que logo é substituída por leucocitose, geralmente caracterizada como leucocitose por estresse com um mínimo desvio a esquerda. Observa-se também uma queda no número de plaquetas, que na maioria dos casos não é inferior a 75.000 plaquetas por microlitro de sangue. Achados bioquímicos são principalmente a hipoalbuminemia, hiperbilirrubinemia discreta, aumento discreto de ureia e creatinina, sendo mais acentuados nos estágios terminais da doença (91). Deve haver associação com histórico

epidemiológico no caso de doença em humanos, como, por exemplo, o contato com animais com carrapato.

Para confirmação da doença a principal ferramenta é a sorologia, sendo eficiente o método de ELISA e imunofluorescência indireta. A PCR é mais utilizada para detecção da doença em humanos, mas é também eficiente para utilização em cães (92). É utilizada também para a pesquisa de DNA do parasita na hemolinfa de carrapatos.

O seu tratamento é realizado com o uso de antibióticos bacteriostáticos, como as tetraciclinas, sendo a doxiciclina a mais recomendada (92). A duração do tratamento é de no mínimo 7 dias. O uso de cloranfenicol também se mostrou eficiente, devendo ser evitado em cães com menos de 6 meses (93).

Não há vacina para proteção de cães, nem de humanos. O melhor método de profilaxia é evitar acesso a áreas endêmicas, realizar a inspeção para detecção de carrapatos em cães, assim como de roupas, e do próprio corpo, após exposição a áreas que possam conter o carrapato transmissor (94). O ideal é que a observação do corpo ocorra a intervalos regulares de tempo para se evitar a inoculação do agente. Sugere-se a utilização de botas em atividades de campo e também que se coloque o cano das meias sobre a calça, e que se utilize fita gomada dupla, evitando-se assim a subida de carrapatos pelas pernas.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão reuniu informações sobre as zoonoses de animais de companhia, de impacto na saúde pública. A conscientização e a prática da guarda responsável, por meio da vacinação e cuidados da saúde de cães e gatos, além do bem estar animal, tem um papel essencial na prevenção das zoonoses, pois os animais de estimação conquistaram espaço no seio das famílias e a relação entre eles e humanos é muito estreita. O fato de compartilharem o mesmo ambiente, é um fator condicionante para a ocorrência das zoonoses. Programas de educação em saúde são fundamentais para o esclarecimento da população visando à prevenção dessas zoonoses.

4. REFERÊNCIAS

1. Vasconcellos SA. Zoonoses e saúde pública: riscos causados por animais exóticos. *Biológico*. 2001;63:63-5.
2. Lima AM, Alves LC, da Glória Faustino MA, de Lira NM. Percepção sobre o conhecimento e profilaxia das zoonoses e posse responsável em pais de alunos do pré-escolar de escolas situadas na comunidade localizada no bairro de Dois Irmãos na cidade do Recife (PE). *Rev Cienc Saude Coletiva*. 2010;2:15.
3. Pfuetzenreiter MR, Zylbersztajn A, Pires FDA. Evolução histórica da medicina veterinária preventiva e saúde pública. *Cienc Rural*. 2004;34(5):1661-8.
4. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de vigilância em saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Caderno 13: Raiva. 7a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. (série A Normas e Manuais Técnicos).
5. Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, Fèvre EM, Meltzer MI, Miranda ME, et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ*. 2005;83(5):360-8.

6. Schneider MC, Souza LM, Moraes NB, Diaz RC. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. Rev Saude Publica. 1996;30(2):196-203.
7. Costa CHN. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44(2):232-42.
8. Julião FS, Souza BM, Freitas DS, Oliveira LS, Laranjeira DF, Dias-Lima AG, et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. Pesqui Vet Bras. 2007;27(8):319-24.
9. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America: a systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(1):584.
10. Hollet RB. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. Theriogenology. 2006;66(3):575-87.
11. Carmichael LE. Abortion in 200 Beagles. J Am Vet Med Assoc. 1966;149(8):1126.
12. Wanke MM. Canine brucellosis. Anim Reprod Sci. 2004;82(83):195-207.
13. Avila VPF. Toxoplasmose felina: revisão de literatura. Porto Alegre: Universidade Rural do Semi-Árido – UFRSA; 2009. p.1-27.
14. Millar PR. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em trabalhadores de um matadouro-frigorífico na cidade de Palmas, Paraná, Brasil [dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2005.
15. Marques JM, Isbrecht FB, Lucas TM, Guerra IMP, Dalmolin A, Da Silva RC, et al. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de uma comunidade rural do Mato Grosso do Sul, Brasil. Semina Cienc Agrar. 2009;30(4):889-98.
16. Galvão ALB, Vasconcelos AL, Navarro IT, Bresciani KDS. Aspectos da toxoplasmose na clínica de pequenos animais. Semina Cienc Agrar. 2014;35(1):393-410.
17. Prado AAF, De Almeida GF, Gontijo LS, Torres MLM. Toxoplasmose: o que o profissional da saúde deve saber. Encicl Biosfera. 2011;7(12):1-30.
18. Modolo JR, Langoni H, Padovani CR, Shimabukuro FH, Mendonça AO, Vitoria C, et al. Investigação soropidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. Braz J Vet Res Anim Sci. 2006;43(5):598-604.
19. Caldart ET, Constantino C, Pasquali AKS, Benitez NA, Hamada FN, Dias RCF, et al. Zoonoses em cães e gatos atendidos em Projeto de Controle de Natalidade: *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp. e *Leptospira* spp., sorodiagnóstico e epidemiologia. Semina Cienc Agrar. 2015;36(1):253-66.
20. Marinho M, Táparo CV, Oliveira-Júnior IS, Perri SHV, Cardoso TC. Tissue apoptosis in mice infected with *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2015;21:22. doi: 10.1186/s40409-015-0022-y.

21. Martins G, Lilenbaum W. The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions. *BMC Vet Res*. 2013;9:237.
22. Brasil AWL, Parantoni RN, Feitosa TF, Vilela VLR, Alves CJ, Vasconcellos AS, et al. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em gatos do semiárido do Estado da Paraíba. *Semina Cienc Agrar*. 2014;35(6):3215-20.
23. Del Fiol FS, Junqueira FM, Rocha MCP, Toledo MI, Barberato Filho S. A febre maculosa no Brasil. *Rev Panam Salud Publica*. 2010;27(6):461-6.
24. Ribeiro MD, Furtado MA, Ferraudo AS, Cesario M, da Andrade Morraye M. Fatores ambientais envolvidos na epidemiologia da febre maculosa no estado de São Paulo. *Hygeia*. 2013;9(16):103.
25. Katz G, Neves VL, Angerami RN, Nascimento EM, Colombo S. Situação epidemiológica e importância da febre maculosa no Estado de São Paulo. *Bepa, Bol Epidemiol Paul*. 2009;6(69):4-13.
26. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. California: Academic Press; 2000. p.563-83.
27. Iseni F, Barge A, Baudin F, Blondell D, Ruigrok RWH. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol*. 1998;79(Pt 12):2909-19.
28. Badrame H, Tordo N. Host switching in lyssavirus history from the chiroptera to the carnivore orders. *J Virol*. 2001;75(17):8096-104.
29. Tordo N, Poch O. Structure of rabies vírus. In: Campbell JB, Charlton KM. Rabies. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1988. p.25-45.
30. Bernardi F, Nadim-Davis SA, Wandeler AI, Armstrong J, Gomes AAB, Lima FS, et al. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 11):3153-62.
31. Belotto AJ. Situação epidemiológica da raiva: panorama mundial. In: Anais do Simpósio Internacional Programa de Treinamento “Controle de zoonoses e as interações homem-animal”; 2001; São Paulo. São Paulo: Embu; 2001. p.26-8.
32. Reichmann MLAB. Considerações sobre áreas geográficas de raiva controlada: experiência do estado de São Paulo, Brasil, 1995 a 2003. In: Anais do Seminário Internacional de Raiva; 2003; São Paulo. São Paulo: Instituto Pasteur; 2003. p.28.
33. Fundação Nacional da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Funasa; 2002. p.673-704. v.II.

34. Reichmann MD, Pinto HD, Arantes MB, Santos MB, Viaro O, Nunes VD. Educação e promoção da saúde no Programa de Controle da Raiva. do 2000 (No. 5). São Paulo: Instituto Pasteur; 2000. (Manual técnico; nº 5).
35. Hellenbrand W, Meyer C, Rasch G, Steffens I, Ammon A. Cases of rabies in Germany following organ transplantation. *Euro Surveill.* 2005;10(2):213-6.
36. Kusne S, Smilack J. Transmission of rabies virus from an organ donor four transplantation recipients. *Liver Transplant.* 2005;11(10):1295-7.
37. Constantine DG. Rabies transmission by nonbite route. *Public Health Rep.* 1962;77(4):287-9.
38. Tsiang H. Pathophysiology of rabies virus infection of nervous system. *Adv Virus Res.* 1993;42:375-412.
39. Baer GM, Lentz TL. Rabies pathogenesis to the central nervous system. In: Baer GM. *The natural history of rabies.* 2nd ed. Boca Raton: RCR Press; 1991. p.105-20.
40. Corrêa WM, Corrêa CN. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.* São Paulo: Varela; 1983.
41. Rosa ES, Kotait I, Barbosa TF, Carrieri ML, Brandão PE, Pinheiro AS, et al. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(8):1197-202.
42. Ministério da Saúde (BR) [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2015 [cited 2015 Aug 10]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/752-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/raiva/11431-situacao-epidemiologica-dados>.
43. Taddei VA. Sistemática de quirópteros. *Bol Inst Pasteur.* 1996;1(2):3-15.
44. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). *Controle da raiva dos herbívoros.* Brasília: MAPA/SDA/DAS; 2005. (Manual técnico).
45. Reichmann MLAB, Pinto HBF, Nunes VFP. *Controle de populações animais de estimação.* São Paulo: Instituto Pasteur; 2000. (Manual técnico; nº 6).
46. Camargo JB, Troncarelli MZ, Ribeiro MG, Langoni H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. *Clin Vet.* 2007;12(71):86-92.
47. Nelson RW, Couto CG. *Medicina interna de pequenos animais.* 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.1037-8.
48. Marcondes CB, Pirmez C, Silva ES, Laurentino-Silva V, Steindel M, Santos AJ, et al. Levantamento de leishmaniose visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(4):499-501.
49. Camargo-Neves V. A leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo: situação atual. *Bepa, Bol Epidemiol Paul.* 2007;4(48):12-4.

50. Ikeda-Garcia FA, Marcondes M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Clin Vet. 2007;12(71):34-42.
51. Camargo JB, Langoni H, Troncarelli MZ, Machado JG, Lucheis SB, Padovani CR. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2010;16(3):414-20.
52. Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniasis. Vet Parasitol. 2002;106(4):315-24.
53. Ministério da Saúde (BR). Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de Julho de 2008. Brasília: Ministério da Saúde; 2008 [cites 2015 Aug 14]. Available from: http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras_normas/porta1426.pdf.
54. Amaral T. Leishmaniose visceral canina: um alerta para saúde pública. Rev Cães Gatos. 2009;123:20-5.
55. Feijão AMM, Lima, JWO, Vieira, F, Nations, MK. O significado do cachorro para a família: estudo qualitativo sobre a estratégia de eliminação de cães infectados com *Leishmania* para o controle do calazar. 37o Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34 Supl 1:230.
56. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev Inst Med Trop. 2006;48(3):151-6.
57. Berthelot X, Garin BB. Brucelloses canines. Point Vet. 1993;25:125-9.
58. Carmichael LE, Green EG. Canine brucellosis. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: WB Saunders; 1990. p.573.
59. Serikawa T, Muraguchi T, Yamada J. Long-term observation of canine brucellosis: excretion of *Brucella canis* into urine of infected male dogs. Jikken Dobutsu. 1981;30(1):7-14.
60. Johnson CA, Walker RD. Clinical signs and diagnosis of *Brucellacanis* infection. Compend Contin Educ PractVet. 1992;14(763/767):770-2.
61. Carmichael LE, Joubert, JC. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucellacanis* infection that employs a variant (M) organism as antigen. Cornell Vet. 1987;77(1):3-12.
62. Nicoletti P. Diagnosis and treatment of canine brucellosis. In: Kirk RW. Current veterinary therapy X. Philadelphia: WB Saunders; 1989. p.1317-20.
63. Serikawa T, Muraguchi T, Nakao N, Irie Y, Erikawa T, Muraguchi T. Significance of urine-culture for detecting infection with *Brucella canis* in dogs. Jpn. J Vet Sci. 1978;40:353-5.
64. Weber A, Schliesser T. Serologischer und kultureller nachweis von *Brucella canis* bei beagle-hundeneiner versuchstierhaltung. Zentralbl Veterinarmed. 1975;22:403-10.

65. Nicoletti P, Chase A. The use of antibiotics to control canine brucellosis. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1987;9:106366.
66. Wanke MM, Monachesi NE, Loza ME, Rutter B, Baldi PC, Fossati CA. Determinacion de anticuerpos contra proteínas citoplasmáticas de *Brucella* por ELISA para la detección de casos crónicos de brucelosis canina. *Selec Vet.* 2000;8:308-11.
67. Nicolleti P. Further studies on the use of antibiotics in canine brucellosis. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1991;13:944.
68. Shin SJ, Carmichael LE. Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. In: Carmichael L. Recent advances in canine infectious diseases. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service; 1999.
69. Godoy AM, Neves J, Peres JN, Barg L. Sobre um caso de infecção humana por *Brucella canis* em laboratório. *Arq Esc Vet.* 1979;31:141-5.
70. Munford RS, Weaver RE, Patton C, Feeley JC, Feldman RA. Human disease caused by *Brucella canis*. A clinical and epidemiologic study of two cases. *J Am Med Assoc.* 1975;231(12):1267-9.
71. Bresciani KD, Da Costa AJ, Navarro IT, Toniollo GH, Sakamoto CA, Arantes TP, et al. Toxoplasmose canina: aspectos clínicos e patológicos. *Semina Cienc Agrar.* 2008;29(1):189-202.
72. Giraldi JH, Bracarense APFRL, Vidotto O, Tudury EA, Navarro IT, Batista TN. Sorologia e histopatologia do *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães portadores de distúrbios neurológicos. *Semina Cienc Agrar.* 2002;23(1):9-14.
73. Baldotto SB, Oliveira PP, Antunes RM, Oliveira PD, Feitosa PP, Pereira DA. Toxoplasmose com repercussão neurológica: relato de caso. *Rev Cient Eletronica Cienc Soc FAIT.* 2014;5:1-34.
74. Moretti LD, Silva AV, Ribeiro MG, Paes AC, Langoni H. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006;48(6):359-63.
75. Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Cunha ELP, Cutolo AA. Prevalência da Toxoplasmose em gatos dos estados de São Paulo e Paraná. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2001;38(5):243-4.
76. Adler B, Moctezuma AP. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):287-96.
77. Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, Dellagostin AO. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(4):294-300.
78. Goldstein RE. Canine Leptospirosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2010;40(6):1091-101. doi:10.1016/j.cvsm.2010.07.008.

79. Freire IMA, Vargas A, Lilenbaum W. Níveis séricos de uréia e creatinina em cães com leptospirose aguda determinada por amostras do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Cienc Rural. 2008;38(4):1172-5.
80. Paes AC. Leptospirose canina. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca; 2016. p.356-377.
81. Jamshidi S, Akhavizadegan MA, Bokaie S, Maazi N, Ghorban ALI A. Serologic study of feline leptospirosis in Tehran, Iran. Iran J Microbiol. 2009;1(2):32-6.
82. Markovich JE, Ross L, McCobb E. The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in Worcester County, Massachusetts. J Vet Internal Med. 2012;26(3):688-9.
83. Luciani O. Receptivité et sensibilité du chat aux leptospires [thesis]. Nantes, France: École Nationale Vétérinaire de Nantes; 2004.
84. Rodriguez J, Blais MC, Lapointe C, Arsenault J, Carioto L, Harel J. Serologic and Urinary PCR Survey of Leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. J Vet Int Med. 2014;28(2):284-93.
85. Baldwin CJ, Atkins CE. Leptospirosis in dogs. Compend Contin Educ Pract Vet. 1987;9:499-507.
86. Neves MAT, Guerschman TM, Sakata UM. Febre maculosa na região do grande abc (Região Metropolitana de São Paulo, Brasil), de 1998 a 2011. Bol Epidemiol CVE [Internet]. 2012 [cited 2015 Aug 10];2(11):189-95. Available from: http://www.cve.saude.sp.gov.br/boletim/txt/bol1112_febre_maculosa.htm.
87. Secretaria da Saúde (BR). Febre Maculosa. São Paulo; 2015 [cited 2015 Aug 15]. Available from: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/>.
88. Sexton DJ, Keith SK. "Rocky Mountain spotted fever". Med Clin North Am. 2002;86(2):351-60.
89. Grindem CB, Breitschwerdt EB, Perkins PC, Cullins LD, Thomas TJ, Hegarty BC. Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. J Am Anim Hosp Assoc. 1999;35(1):56-61.
90. Anderson BE, McDonald GA, Jones DC, Regnery RL. A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has been tandemly repeated, near identical sequences. Infect Immun. 1990;58(9):2760-9.
91. Davidson MG, Breitschwerdt EB, Walker DH, Nassisse MP, Sussman WE. Identification of rickettsiae in cutaneous biopsy specimens from dogs with experimental Rocky Mountain spotted fever. J Vet Intern Med. 1989;3(1):8-11.
92. Labruna MB, Horta MC, Aguiar DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, et al. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis 2007;7(2):249-55.

93. Nicholson WL, Gordon R, Demma LJ. Spotted fever group rickettsial infection in dogs from eastern Arizona. How long has it been there? Ann NY Acad Sci. 2006;1078:519-22.
94. Nicholson WL, Paddock CD, Demma L, [Traeger M](#), [Johnson B](#), [Dickson J](#), et al. Rocky Mountain spotted fever in Arizona: documentation of heavy environmental infestations of *Rhipicephalus sanguineus* at an endemic site. Ann NY Acad Sci. 2006;1078:338-41.

Recebido em: 04/07/2016

Aceito em: 24/02/2017

AGENESIA EM FELINOS DOMÉSTICOS: ESTUDO RETROSPECTIVO DE DIAGNÓSTICO NO HCV-UFPEL

Gabriela de Almeida Capella¹
Stella Falkenberg Rausch
Taiane Rita Carnevali
Claudia Giordani
Luiz Paiva Carapeto
Marlete Brum Cleff

RESUMO

A hemimelia ou agenesia é uma anomalia que se caracteriza pela ausência parcial ou total de um ou mais ossos, sendo considerada de rara ocorrência na clínica veterinária felina. Nesse sentido, o estudo objetiva relatar a ocorrência de hemimelia em felinos atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária (HCV-UFPEL) nos últimos dez anos. No presente estudo constam nove felinos, pertencentes a três ninhadas, os quais foram encaminhados para atendimento clínico e radiológico entre os anos de 2003 e 2013. Os animais apresentavam deformidades na extremidade dos membros torácicos, sendo essas alterações observadas desde o nascimento. O exame radiográfico revelou ausência total e/ou parcial do rádio com diferentes graus de encurvamento da ulna. Dentre as opções terapêuticas disponíveis, os proprietários optaram pela não realização de procedimentos cirúrgicos, realizando-se dessa forma conduta terapêutica conservativa. Com os resultados obtidos concluiu-se que a agenesia óssea felina, não é tão rara em nossa região, sendo que o diagnóstico precoce, a orientação do proprietário e instituição de terapêutica adequada pode melhorar o prognóstico e qualidade de vida dos animais afetados.

Palavras-chave: hemimelia, rádio, gatos, má formação.

AGENESIS IN DOMESTIC CATS: DIAGNOSTIC RETROSPECTIVE STUDY IN HCV-UFPEL

ABSTRACT

The hemimelia or agenesis is an anomaly characterized by partial or complete absence of one or more bones, and is considered a rare occurrence in feline veterinary clinic. In this sense, the study aims to report the occurrence of hemimelia in cats treated at the Veterinary Clinical Hospital (HCV-UFPEL) in the last ten years. The present study includes nine cats, belonging to three different litters, which were referred to clinical and radiological service between the years 2003 and 2013. The animals had deformities at the end of the forelimbs, and these malformations were observed from birth. Radiographic examination revealed total or partial absence of radius with varying degrees of curvature of the ulna. Among available treatment options, owners opted out of surgical procedures, performing thus conservative therapy administration. With the obtained results, it was concluded that feline bone agenesis is not so rare in our region. In addition, early diagnosis, owner guidance and appropriate therapeutic institution can improve the prognosis and life quality of affected animals.

Keywords: hemimelia, radius, cats, deformity.

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Correspondência.

AGENESIA EN GATOS DOMÉSTICOS: ESTUDIO RETROSPECTIVO DIAGNÓSTICO EN EL HCV-UFPEL

RESUMEN

La hemimelia agenesia es una anomalía que se caracteriza por la ausencia parcial o completa de uno o más huesos, y se considera de ocurrencia poco frecuente en la clínica veterinaria felina. En este sentido, el estudio tiene como objetivo informar la existencia de hemimelia en los gatos tratados en el Hospital Clínico Veterinario (HCV-UFPEL) en los últimos diez años. En este estudio están incluidos nueve gatos, de tres camadas, que ingresaron al servicio clínico y radiológico entre 2003 y 2013. Los animales presentaban deformidades en las extremidades de los miembros anteriores, cambios que se han observado desde el nacimiento. El examen radiográfico reveló la ausencia total y \ o parcial del radio y distintos grados de curvatura del cúbito. Entre las opciones de tratamiento disponibles, los propietarios optaron por no hacer procedimiento quirúrgico, realizando así el tratamiento conservador. Con los resultados obtenidos se concluyó que la agenesia de huesos en felinos no es rara en nuestra región, y que con el diagnóstico temprano, el conocimiento del propietario y la institución de un plan terapéutico correcto pueden mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los animales afectados.

Palabras clave: hemimelia, radio, gatos, mala formación.

INTRODUÇÃO

No Brasil estima-se que a população de felinos seja de 22,1 milhões, e que a cada cinco casas uma possui ao menos um animal (1). Devido a crescente popularidade dos felinos como animais de estimação, essa população vem aumentando, especialmente, nas grandes áreas urbanas (2). Entretanto, a falta de controle reprodutivo e a facilidade de procriação têm acarretado grande número de animais nas ruas, sendo considerada uma preocupação em diversas localidades (3). Nesse contexto, os acasalamentos descontrolados possibilitam cruzamentos consanguíneos e contribuem para uma maior ocorrência de anormalidades congênitas nesta espécie, sendo estas anomalias ainda pouco relatadas nos felinos, e em sua maioria de etiologia não totalmente compreendida (4).

Dentre as anomalias dos felinos estão a agenesia ou hemimelia, que são consideradas raras na espécie (5,6,7). A enfermidade é caracterizada por ausência parcial ou total de um ou mais ossos, podendo ser classificada como terminal ou intercalar, e ainda como transversa ou longitudinal (8). Quando estiverem afetados ossos pareados como rádio e ulna, a hemimelia pode ser classificada como pré-axial ou pós-axial, com ausência do osso medial ou lateral respectivamente (7). A agenesia leva a deformidade angular do membro afetado, acarretando severas limitações funcionais aos animais portadores da má formação (6,9).

A etiologia da enfermidade ainda é incerta, sendo apontados fatores genéticos, ambientais ou mesmo a combinação de ambos (7). A causa hereditária da hemimelia tem sido associada à presença da afecção em mais de um animal (6), outras hipóteses seriam a compressão intrauterina, agentes teratogênicos, deficiências nutricionais maternas e aplicação de fármacos durante a gestação (9).

Os pacientes com agenesia óssea podem apresentar sintomas nos primeiros dias de vida, com sinais de deformidade angular, claudicação e diminuição da amplitude de movimento das articulações adjacentes (10). O diagnóstico definitivo é estabelecido por exames radiográficos, em que é possível visualizar encurvamentos, ausência parcial ou completa de ossos eluxação ou sub-luxação das articulações (6).

As medidas terapêuticas restringem-se a imobilização com bandagem de Robert-Jones em posição de apoio, amputação do membro afetado nos casos unilaterais e artrodose de cotovelo com enxerto ósseo autógeno, entretanto, em caso do tratamento conservativo, os animais em geral, desenvolvem lesões e/ou espessamento da pele na região de apoio (11).

No sentido de acrescentar informações acerca dessa patologia em felinos criados no sul do Brasil, e no intuito de contribuir com a condução de pacientes com a deformidade, o estudo descreve a ocorrência de hemimelia na espécie felina, diagnosticados nos últimos dez anos no HCV – UFPel.

RELATO DOS CASOS

Os primeiros casos registrados no HCV-UFPel foram de três felinos diagnosticados em 2003. Neste relato os filhotes tinham 44 dias de idade, sem raça definida, sendo um macho e duas fêmeas provenientes e uma mesma ninhada de pai Himalaio e mãe sem raça definida (SRD). Os pacientes foram levados para consulta por apresentarem deformidades em membros torácicos, sendo um com incidência unilateral (n=1) e dois com incidência bilateral (n=2). A segunda ocorrência registrada foi no ano de 2010, em quatro felinos, sendo dois machos e duas fêmeas, provenientes de felina da raça Siamês. Os pacientes tinham 34 dias de idade e apresentavam deformidade na extremidade dos membros torácicos unilateral (n=2) e bilateral (n=2), conforme figura 1. O terceiro diagnóstico ocorreu em 2013, sendo dois filhotes felinos, fêmeas, SRD, com idade de 40 dias, apresentando deformidades bilaterais nos membros torácicos (n=1), e o outro apenas na extremidade do membro torácico direito (n=1).



Figura 1. Fotografias de felinos da mesma ninhada, atendidos em 2010 no Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, os membros torácicos afetados pela hemimelia radial bilateral apresentam-se curtos, com deformidade vara e limitações funcionais.

Após exame clínico completo e hemograma, os felinos foram encaminhados ao Setor de Diagnóstico por Imagem do HCV-UFPel, sendo realizados exames ultrassonográfico abdominal e radiológico, nas projeções latero-lateral e crânio-caudal dos membros torácicos, para auxílio no diagnóstico definitivo. Em relação às fêmeas progenitoras, não havia história prévia de qualquer procedimento durante a gestação e nem qualquer relato pelos tutores de alterações perceptíveis.

No exame físico de todos os animais relatados, ficou evidente a flexão dos membros afetados com desvio no sentido medial. Dos nove filhotes, quatro apresentavam alterações com incidência bilateral e cinco com incidência unilateral. Os animais não apresentavam escoriações de pele, não demonstravam dor, nem crepitação durante a manipulação, além de apresentarem-se com boas condições corporais. Os felinos tinham encurvamento dos membros torácicos e alteração de deambulação, além de apoio lateral dos membros com os carpos flexionados e redução da amplitude de movimento dos cotovelos. Os parâmetros

clínicos de temperatura, tempo de preenchimento capilar, coloração de mucosas, ausculta cardíaca e pulmonar, além do hemograma dos pacientes, estavam dentro dos padrões estabelecidos para a espécie. Os sinais clínicos observados nos animais atendidos no HCV-UFPEL foram semelhantes com os relatos anteriores de hemimelia em felinos (7,12). As principais complicações clínicas nesses casos são decorrentes de lesões continuadas ou repetitivas, devido à má postura que os animais adotam durante a locomoção (6).

No primeiro diagnóstico, realizado no ano de 2003, foi evidenciado ausência óssea em diferentes regiões de membros. No macho foi diagnosticado ausência dos ossos rádio, carpo-ulnar, primeiro metacarpiano, falange proximal e distal do primeiro dígito e sesamóide do músculo abductor longo do primeiro dígito. As fêmeas apresentavam, além de ausência do rádio, ossos da camada carpiana proximal, primeiro e segundo metacarpianos, falanges proximal e distal do primeiro e segundo dígito, falange medial do segundo dígito, sesamóide do músculo abductor longo do primeiro dígito, sesamóide proximal do segundo dígito, subluxação carpo-ulnar e alterações degenerativas da articulação do cotovelo de ambas extremidades torácicas. A outra fêmea diagnosticada apresentou ausência dos ossos primeiro metacarpiano, falange distal e proximal do primeiro dígito, encurvamento da ulna, e alterações degenerativas da articulação do cotovelo de ambas as extremidades, sendo que no membro torácico esquerdo havia também a ausência do osso carpo-ulnar, engrossamento da ulna e subluxação da articulação do cotovelo e articulação carpiana. Já no membro torácico direito havia uma desorganização sem possível identificação dos ossos da camada proximal e distal dos ossos carpianos e uma subluxação da articulação carpo-ulnar. Estes dois pacientes também apresentavam fusionamento das vertebrae coccígeas.

No diagnóstico de 2010, o exame radiográfico dos quatro animais evidenciou: dois animais com ausência total e bilateral do rádio e um leve encurvamento da ulna; o terceiro animal apresentou ausência parcial unilateral do rádio, além de um grave encurvamento da ulna; e o quarto paciente com ausência unilateral total do rádio, e leve encurvamento da ulna (Figura 2). Nenhum dos felinos apresentou subluxação ou luxação das articulações adjacentes. Nesses felinos também foi realizado ultrassom para avaliação de órgãos internos, onde não foram observadas alterações significativas nos animais.

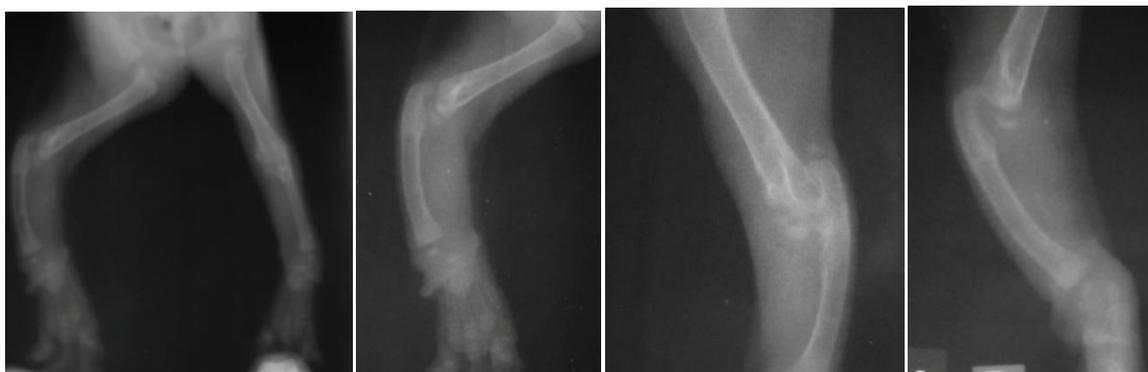


Figura 2. Radiografias simples dos membros torácicos dos felinos da mesma ninhada, atendidos em 2010 no Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, demonstrando agenesia radial e encurvamento de ulna.

No terceiro diagnóstico (2013), o exame radiográfico de um dos filhotes evidenciou ausência parcial do rádio, apresentando apenas vestígio da epífise proximal radial, subluxação úmero-ulnar e ulna-cárpica, o outro felino apresentava deformidades unilateral, com agenesia de metacarpo e falanges proximal e distal do primeiro dígito.

Os gatos siameses e os de pêlo curto doméstico (13), têm sido considerados como os mais acometidos, o que concorda com os dados relatados, pois as fêmeas que geraram os filhotes eram da raça siamesa ou SRD. Em relação à classificação da agenesia, esta é feita de

acordo com a localização e definição dos ossos ausentes, sendo que nos animais do estudo confirmou-se agenesia uni e bilateral de rádio, sendo estas classificadas como longitudinal pré-axial intercalar, apresentando ainda deformidade e encurtamento ulnar em diferentes graus, assim como em outros ossos. Esses achados foram semelhantes a estudos prévios, em que geralmente o rádio está ausente de forma total ou parcial, sendo que os membros afetados se apresentam curtos, com deformidade vara e limitações funcionais (8).

Segundo as informações dos proprietários os filhotes apresentavam-se desde o nascimento com deformidade nos membros torácicos. Em virtude de o diagnóstico de agenesia ser realizado em mais de um felino pertencentes a uma mesma ninhada, reforça-se a hipótese da má formação hereditária, podendo ou não estar associada a fatores maternos e ambientais. Não sendo descartada a hipótese de ocorrência de compressão intrauterina, inflamações, e nutrição materna deficiente. Especialmente no terceiro relato que foi de 2013, a fêmea progenitora foi atendida no ambulatório veterinário, que presta assistência a um público de baixa renda, e a felina apresentava-se magra, desidratada e anêmica, o que poderia reforçar a ocorrência de má nutrição aos fetos durante a gestação. Mas os dados de nutrição precária não foram confirmados na fêmea progenitora no caso diagnosticado em 2010, pois esta apresentava-se em boa condição corporal e clinicamente saudável, o que descartaria, nesse caso, a problemática da nutrição, além disso no diagnóstico de 2003 não foi possível o acompanhamento da fêmea parturiente. Outra informação que chamou a atenção foi que em dois relatos (2010 e 2013) havia o hábito do tutor de utilizar injeções de contraceptivos nas fêmeas, o que poderia ser uma provável causa. Visto que diversos autores relacionam má formação congênitas com a utilização, durante a gestação, de agentes teratogênicos, assim como vacinas e drogas (7,9), levando a hipótese de que a agenesia possa ser multifatorial.

Como causas de agenesia, ainda, pode ser considerado lesões da crista neural na fase inicial da organogênese, o que poderia impedir a proliferação, migração e diferenciação normal de células nervosas, interferindo em sua função trófica e acarretando na hipoplasia, ausência ou deformidades (9). Avasculogênese precede normalmente a condrogênese e amiógênese, o qual sugere que uma vasculogênese anormal, ruptura de vasos, ou ambas as situações, poderiam resultar em uma agenesia (14). Ainda é possível, que o desenvolvimento anormal do raio medial, seja responsável pela má formação do rádio, ossos intermediários do carpo e primeiro dígito (6).

Em todos os felinos atendidos no HCV-UFPEL, optou-se pelo tratamento conservativo, instituído pela colocação de talas, porém, não se obteve sucesso com a utilização desta técnica, sugerindo-se aos proprietários a amputação cirúrgica dos membros dos animais com incidência unilateral, além de orquiectomia e ovariosterectomia de todos felinos acometidos. Estudos demonstram que o tratamento das deformidades pode ser realizado com amputação, cirurgias corretivas e implante ósseo, além da possibilidade de terapêutica conservativa. Nos casos em que o tratamento conservativo é utilizado sugere-se manter os animais em pisos lisos e macios para evitar complicações como ulcerações na região do carpo em decorrência do atrito com o solo (7,8,12).

Nos casos de agenesia diagnosticados nos últimos dez anos, por decisão dos proprietários, não foi realizada a amputação, sendo que todos os felinos se adaptaram bem à condição e não demonstraram incômodo, nem apresentaram lesões secundárias, devido à agenesia, até retorno em consulta no HCV-UFPEL. A etiologia desta deformidade não está totalmente definida, devido à baixa ocorrência, sendo escassos os dados de literatura sobre o assunto (12). Considerando o fato de que os animais afetados podem ter uma boa qualidade de vida sem haver a necessidade de eutanásia (15), devem ser realizados estudos mais aprofundados abordando condutas terapêuticas para o quadro, permitindo, assim, o aperfeiçoamento de técnicas de correção ou até mesmo a manutenção da terapia conservativa (12).

CONCLUSÃO

Os casos de hemimelia em felinos ainda não têm uma causa bem definida, podendo estar envolvidos diferentes fatores, sendo diagnosticados com frequência não tão rara, dentro da casuística felina do HCV-UFPEL. Os pacientes felinos se adaptam bem à condição, sendo plausível a opção pela terapia conservativa, entretanto, técnicas cirúrgicas avançadas devem ser consideradas, pois podem auxiliar na melhora da condição de vida dos felinos acometidos.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional de saúde: 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação/ IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE; 2015.
2. Genaro G. Gato doméstico: futuro desafio para controle da raiva em áreas urbanas? *Pesqui Vet Bras.* 2010;30:186-9.
3. Frias DFR, Lages SLS, Grupo PET, XLIII Turma de Alunos do Curso de Medicina Veterinária FCAVJ, Carvalho AAB. Nível de conhecimento sobre posse responsável de animais de estimação: diagnóstico da população de três bairros do município de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. *Hig Aliment.* 2007;21:418-9.
4. Martini-Santos BJ, Diefenbach A, Peixoto TC, Nóbrega Jr. JE, Anjos BL. Anomalias congênitas múltiplas em felinos domésticos neonatos. *Acta Sci Vet.* 2012;40:1087.
5. Pimentel AS, Lisboa PAV, Carvalho LA, Aurnheimer RCM, Tancredi IP. Agenesia bilateral de rádio em gato (*Felis catus*): relato de caso. *Rev Univ Rural Ser Cienc Vida.* 2007;27:209-10.
6. Dennis R, Kirberger R, Wrigley R, Barr F. *Handbook of small animal radiology and ultrasound.* 2a ed. Philadelphia: Elsevier Science; 2010.
7. Ferreira MP, Alievi MM, Nóbrega FS, Gonzales PC, Dal-Bó IS, Beck CAC. Agenesia bilateral de radio en gato (*Felis catus domesticus*): relato de caso. *Rev Clin Vet.* 2012;97:36-40.
8. Towle HA, Breur GJ. Dysostoses of the canine and feline appendicular skeleton. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;225:1685-92.
9. Alam MR, Heo HB, Lee JH, Kim JH, Park YJ, Lee KC, et al. Preaxial longitudinal intercalary radial hemimelia in a dog: a case report. *Vet Med.* 2006;51:118-23.
10. Jonson AL. Growth deformities. In: Olmstead ML. *Small animal orthopedics.* St Louis: Mosby Year Book Ink; 1995. p.293-309.
11. Burk RL, Feeney DA. *Small animal radiology and ultrasonography.* St Louis: Elsevier Science; 2003.
12. Peres TPS, Ruiz T, Campos WNS, MeirelesYS, Néspoli PEB, SouzaRL. Hemimelia bilateral de rádio em canino: relato de caso. *Semin Cienc Agrar.* 2013;34:2381.

13. Hoskins JD. Congenital defects of cats. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1995;17:385-405.
14. Murciano J, Agut A, Laredo EG, Carrillo JM, Soler M, Corzo N. Agenesia de radio en una gata. *Clin Vet Pequi Anim.* 1999;19:47-50.
15. Barrand KR, Cornillie PK. Bilateral hindlimb adactyly in an adult cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008;49:252-3.

Recebido em: 11/06/2016

Aceito em: 04/01/2017

DOENÇA DE VON WILLEBRAND TIPO 1 GRAVE EM CÃO DA RAÇA SÃO BERNARDO – APRESENTAÇÃO CLÍNICA E PERFIL DE HEMOSTASIA

Magnus Larruscaim Dalmolin¹
Camila Serina Lasta²
Luciana de Almeida Lacerda²
Vanessa Camargo²
Mariana Loner Coutinho¹
Itabajara da Silva Vaz Junior³

RESUMO

A doença de von Willebrand (DvW) resulta de uma deficiência quantitativa e/ou qualitativa do fator de von Willebrand (FvW). É classificada como um defeito extrínseco à plaqueta, em que a falha da resposta hemostática é atribuída à deficiência de um fator plasmático necessário para a função plaquetária normal. Este estudo visa descrever de maneira sistemática o diagnóstico da doença de (DvW) tipo 1 exemplificada em um relato de caso de um cão atendido em hospital veterinário de ensino devido a uma intensa epistaxe bilateral.

Palavras-chave: canino, doença congênita, fator VIII, hemorragia, transfusão sanguínea.

TYPE 1 VON WILLEBRAND DISEASE IN ST. BERNARD DOG - CLINICAL PRESENTATION AND HEMOSTASIS PROFILE

ABSTRACT

The von Willebrand disease (vWD) results from a quantitative and / or qualitative deficiency of von Willebrand factor (vWF). It is classified as a platelet- extrinsic defect, wherein the hemostatic response failure is attributed to deficiency of a plasma factor required for normal platelet function. This study aims to describe systematically the diagnosis of vWD type 1 exemplified in a case report of a dog treated at a veterinary teaching hospital due to intense bilateral epistaxis.

Keywords: canine, congenital disease, factor VIII, bleeding, blood transfusion.

ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND DE TIPO 1 EN UN PERRO DE LA RAZA DE SAN BERNARDO - PRESENTACIÓN CLÍNICA Y EL PERFIL DE LA HEMOSTASIA

RESUMEN

La enfermedad de von Willebrand (EvW) es el resultado de una deficiencia cuantitativa y/o cualitativa del factor de von Willebrand (FvW). Esta clasificado como un defecto extrínseco de las plaquetas, donde el fallo de respuesta hemostática se atribuye a la deficiencia de un factor del plasma necesario para la función normal de las plaquetas. Este estudio tiene como objetivo describir sistemáticamente el diagnóstico de la EvW tipo 1, tomando como ejemplo

¹ Centro de Biotecnologia Imunologia, Clínica Veterinária e Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

² Faculdade de Veterinária, Clínica Veterinária Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

³ Centro de Biotecnologia Imunologia e Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre 91540-000, RS, Contato principal para correspondência.

el reporte de un caso de un perro que presenta intensa epistaxis bilateral tratado en el hospital veterinario.

Palabras clave: canino, enfermedad congénita, factor VIII, sangrado, transfusión de sangre.

DESCRIÇÃO DO CASO

Um canino, fêmea, da raça São Bernardo, seis meses de idade foi atendido em Hospital Veterinário com epistaxe bilateral contínua (Figura 1), apatia, hiporexia e melena. Ao exame clínico observaram-se mucosas hipocoradas, desidratação de 8%, taquicardia (148 bpm), hipertermia (40,5°C), apatia, dispneia grave, estertores e condição corporal magra. Uma amostra de sangue com anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético dipotássico (EDTA K2, BD Brasil, São Paulo, Brasil) foi colhida para hemograma e teste de compatibilidade sanguínea e outra em anticoagulante citrato de sódio 3,2% (BD Brasil, São Paulo, Brasil) para testes de coagulação.



Figura 1: Epistaxe contínua em cão com doença de von Willebrand tipo 1.

A avaliação laboratorial demonstrou anemia macrocítica e hipocrômica grave (hematócrito de 13% e hemoglobina de 3,7 g/L), leucocitose neutrofílica e hipoproteinemia; TP, TTPA e contagem de plaquetas dentro dos valores normais para a espécie (Tabela 1). O tempo de sangramento da mucosa bucal (TSMB) foi determinado conforme Sato e colaboradores (1), e apresentou-se prolongado (17 minutos). Uma alíquota de plasma em citrato de sódio 3,8% foi armazenada a -70°C para a determinação do antígeno FvW (Ag:FvW) e da atividade coagulante do fator VIII (FVIII:C). Após prova de compatibilidade pelo método da hemaglutinação em tubo de ensaio (2), foram administrados 15mL/kg de concentrado de hemácias para correção da anemia. Para promover a hemostasia, plasma fresco congelado foi administrado na dose de 15mL/kg, porém o paciente apresentou piora do quadro respiratório e veio a óbito após 18 horas da internação.

O Ag:FvW e FVIII:C do paciente foram determinados em relação a um pool de plasma canino normal. Para a produção do pool, foram colhidos sangue em anticoagulante citrato de sódio 3,8% de 24 cães clinicamente saudáveis. O pool foi produzido adicionando-se volumes iguais de cada plasma, separado em alíquotas e armazenado a -70°C até o momento das análises. Esta amostra foi considerada com 100% de FvW e de FVIII:C. O Ag:FvW foi determinado por ELISA (3), e a mensuração do FVIII:C foi realizada conforme previamente descrito (4), em analisador semiautomático S^Tart[®] (Diagnóstica Stago). O paciente apresentou um valor de 4% de Ag:FvW e 43% de FVIII:C.

Tabela 1. Resultados dos exames de hemostasia do paciente.

Exame	Resultado	Valor de referência*
TP (s) #	7	< 10
TTPA (s) #	17	10 – 20
TSMB (s)	1020	128 – 186
Plaquetas (x10 ³ /μL)	318	200 – 500
Concentração do Ag:FvW (%) §	4	< 50: deficiente 50 – 70: suspeito > 70: livre
Atividade do FVIII (%) §	43	60 – 140

* (9); # Metodologia: coagulação; § Metodologia: ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay);

§ Metodologia: TTPA modificado com plasma deficiente em FVIII.

A doença de von Willebrand (DvW) resulta de uma deficiência quantitativa e/ou qualitativa do fator de von Willebrand (FvW). O FvW é uma glicoproteína plasmática multimérica que possui importantes funções no processo da hemostasia (5). Após injúria vascular, o FvW liga-se ao colágeno subendotelial e passa por mudanças estruturais que facilitam a sua interação com a glicoproteína de membrana plaquetária Ib, permitindo a adesão das plaquetas ao local de hemorragia. O FvW também participa da agregação plaquetária pela interação com as proteínas de membrana plaquetária Iib/IIIa. Devido a sua relação com o fator VIII (o FvW interage com o fator VIII, estabilizando o mesmo), em alguns pacientes a DvW está associada a uma deficiência plasmática de fator VIII (6). É a doença hemorrágica hereditária mais comum em cães, e afeta mais de 50 raças, sendo transmitida como uma herança autossômica (7). É classificada em três tipos, de acordo com sua patofisiologia: DvW tipo 1 (deficiência parcial do FvW), tipo 2 (deficiência qualitativa do FvW) e tipo 3 (deficiência absoluta do FvW). Os três tipos já foram identificados em cães, sendo o tipo 1 de maior ocorrência (8-10).

A DvW se manifesta com sinais clínicos típicos de um transtorno de hemostasia primária, com hemorragias principalmente nas superfícies mucosas – gengivorragia, epistaxe, melena, hematúria e hemorragia uterina. Algumas vezes, hemorragia prolongada após cirurgia ou trauma pode ser o primeiro sinal apresentado (9). Outras manifestações clínicas observadas na DvW incluem claudicação, hemorragia intracraniana e cicatrização deficiente (10).

Testes de triagem como contagem de plaquetas, TP e TTPA normais em paciente jovem com histórico de sangramento sugerem distúrbio de função plaquetária (11,12). Neste caso, a contagem de plaquetas e o perfil de coagulação do paciente apresentavam-se normais, indicando que o distúrbio hemorrágico não estava ligado a coagulopatia ou trombocitopenia. Uma característica importante da DvW é o prolongamento do TSMB. O resultado deste exame demonstrou um valor muito prolongado (17 minutos), mas como este teste pode estar alterado na DvW e também em casos de trombocitopatias, exames confirmatórios são necessários para o diagnóstico definitivo. Além disso, deve-se ter cautela ao interpretar o TSMB em pacientes anêmicos, pois a desmarginalização das plaquetas pode induzir um prolongamento do resultado do teste (1).

As principais complicações da DvW são as hemorragias, que dependendo da intensidade e do local podem levar a anemias graves, hipóxia tecidual, hipovolemia, hipoproteinemia ou comprometimento de sistemas como SNC ou urinário, por exemplo (9). A severa redução do hematócrito e das proteínas plasmáticas neste caso demonstra a extensão da hemorragia, que quando externa leva a uma perda importante de proteínas e ferro (13). Anemias hemorrágicas são classicamente regenerativas, e apresentam-se inicialmente macrocíticas e hipocrômicas, pois os depósitos de ferros são geralmente suficientes. Quando a perda sanguínea não é controlada, com o tempo a anemia pode se apresentar normocítica e normocrômica e mais tarde microcítica e hipocrômica - quando os estoques de ferro são

depletados, diminuindo assim a capacidade de regeneração eritróide, pois para cada mililitro de sangue perdido, perde-se 0,5 mg de ferro (14).

O paciente apresentava epistaxe bilateral contínua, sem traumatismo aparente ao exame clínico. A severidade, o tipo de anemia (macrocítica e hipocrômica) e a hipoproteïnemia refletem um processo agudo com duração de mais de 3 dias, o tempo mínimo para se observar uma resposta regenerativa na anemia hemorrágica (13). O aspecto das fezes indicava hemorragia gastrointestinal concomitante, o que contribui para a perda externa de ferro e proteínas.

A manifestação clínica da DvW é variável e depende de diversos fatores. A extensão da deficiência e o tipo de DvW são as variáveis mais importantes para determinar a probabilidade e a severidade da hemorragia. Como regra geral, quanto menor a concentração de FvW maior a probabilidade de hemorragia (8,10). No presente caso, a baixa quantidade de FvW (4%) foi determinante para a ocorrência de sangramentos severos. O resultado do Ag:FvW demonstrou que o paciente apresentava uma deficiência do tipo I, a forma mais comum da doença, caracterizada por uma deficiência quantitativa parcial grave na concentração da proteína, com funções normais dos múltímeros.

O FVIII é uma proteína de coagulação essencial para a fase de propagação da hemostasia (6). É sintetizado no fígado e no sistema retículo-endotelial e uma parcela é armazenada associada ao fator de von Willebrand nos corpúsculos de Weibel-Palade nas células endoteliais e nos grânulos α plaquetários. A ligação ao FvW aumenta a estabilidade plasmática e intracelular do FVIII, o que faz com que em alguns pacientes a deficiência do FvW seja associada a baixos níveis circulantes de FVIII, o que pode resultar em leve prolongamento do TTPA (11). Apesar do resultado de FVIII:C (43%) do paciente apresentar-se abaixo dos valores de referência, não foi observado um prolongamento no TTPA, pois isto só ocorre quando algum fator de coagulação está abaixo de 30% (10). Estes resultados demonstram que a redução dos níveis de FvW afetou a estabilidade do FVIII:C do cão, mas não o suficiente para induzir um prolongamento do TTPA.

De acordo com o quadro clínico respiratório e com os achados hematológicos foi iniciado tratamento para infecção pulmonar concomitante. O quadro respiratório, associado à anemia contribuiu para a gravidade da hipóxia do paciente, e provavelmente este fato levou o mesmo ao óbito. Ainda, aspiração de sangue pode ter contribuído para o colapso respiratório.

O tratamento da DvW é paliativo, e o objetivo central é a prevenção ou o controle da hemorragia. O produto de escolha para prevenir ou cessar a hemorragia é o crioprecipitado, uma forma concentrada de FvW e FVIII. Este hemocomponente fornece grandes quantidades destes fatores em um pequeno volume, e está associado a menores efeitos colaterais. Além disso, também é mais efetivo para aumentar a concentração do Ag:FvW e encurtar o TSMB (10). Plasma fresco ou plasma fresco congelado são boas alternativas ao crioprecipitado, mas estão associados a uma maior ocorrência de reações transfusionais não hemolíticas (15). A desmopressina, um medicamento que induz a liberação do FvW armazenado nas células endoteliais também pode ser utilizada em pacientes com DvW tipo 1. No entanto, os melhores resultados são alcançados com a infusão de produtos plasmáticos que contenham elevadas concentrações de FvW (12,15). No caso desse paciente, optou-se pela administração de plasma fresco congelado devido à indisponibilidade de crioprecipitado no dia da internação.

Conclui-se que doenças hereditárias devem constar no diagnóstico diferencial de pacientes jovens com distúrbios hemostáticos. Testes de triagem como contagem de plaquetas, TP e TTPA normais em paciente jovem com histórico de sangramento sugerem distúrbio de função plaquetária. A determinação do Ag:FvW é um teste essencial para pacientes com histórico de diátese hemorrágica sem coagulopatia e/ou trombocitopenia e pode ser conclusivo para o diagnóstico de DvW. Diagnóstico precoce, intervenção terapêutica adequada e reposição de FvW são essenciais para o controle da DvW. Com base nos achados clínicos e exames laboratoriais o paciente foi diagnosticado com DvW tipo I.

APOIO E FINANCIAMENTO

Agências CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

1. Sato I, Anderson GA, Parry BW. An interobserver and intraobserver study of buccal mucosal bleeding time in Greyhounds. *Res Vet Sci.* 2000;68:41-5.
2. Wardrop KJ. Clinical blood typing and crossmatching. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's veterinary hematology.* 6a ed. Ames: Wiley-Blackwell; 2010. p.1101-5.
3. Dalmolin ML. Avaliação da hemostasia em cães: fator de Von Willebrand e tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2015.
4. Mischke R. Optimization of coagulometric tests that incorporate human plasma for determination of coagulation factor activities in canine plasma. *Am J Vet Res.* 2001;62:625-9.
5. Sadler JE. New concepts in Von Willebrand disease. *Annu Rev Med.* 2005;56:173-85.
6. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg and Crit Care.* 2009;19:3-10.
7. Riehl J, Okura M, Mignot E, Nishino S. Inheritance of von Willebrand's disease in a colony of Doberman Pinschers. *Am J Vet Res.* 2000;61:115-20.
8. Johnstone I. Bleeding disorders in dogs: inherited disorders. In *Pract.* 2002;24:2.
9. Brooks MB, Catalfamo JL. von Willebrand Disease. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary hematology.* 6th ed. Ames: Wiley-Blackwel; 2010. p.612-8.
10. Stokol T, Trepanier L, Parry BW, Finnin BC. Pharmacokinetics of von Willebrand factor and factor VIII in canine von Willebrand disease and haemophilia A. *Res Vet Sci.* 1997;63:23-7.
11. Barr JW, McMichael M. Inherited disorders of hemostasis in dogs and cats. *Top Companion Anim Med.* 2012; 27:53-8.
12. Brooks MB, Catalfamo JL. Current diagnostic trends in coagulation disorders among dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2013;43:1349.
13. Naigamwalla DZ, Webb JA, Giger U. Iron deficiency anemia. *Can Vet J.* 2012;53:250-6.

14. Mills J. Anemia. In: Day MJ, Kohn B. Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine. 2a ed. Gloucester: BSAVA; 2012. p.31-44.
15. Gibson G, Abrams-Ogg ACG. Canine transfusion medicine. In: Day MJ, Kohn B. Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine. 2a ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2012. p.289-307.

Recebido em: 31/06/2016

Aceito em: 13/01/2017

PRIMARY RENAL LYMPHOMA IN DOMESTIC CAT (*Felis catus*): CASE REPORT

Igor Mansur Muniz¹
Evelyn Rabelo Andrade¹
Patricia Regina Voigt¹

ABSTRACT

Renal primary neoplasms in cats are rare and account for less than 2% of all cancers, the majority of malignant feature. Hematopoietic tumors are the most common in cats and 90% are diagnosed as lymphoma, being between 30 and 50% of all malignant tumors found in this species. This cancer originates in lymphoid cells found in solid organs such as lymph nodes, liver and intestine, and is currently the most common cancer in domestic cats with an average age of 11 years. The most common forms of presentation are mediastinal, nodal, extranodal and digestive. Clinical signs are diverse and related to the anatomical site in which the disease develops. Chemotherapy is the treatment for systemic forms, while radiotherapy and surgery associated or not with chemotherapy treatments are indicated for localized forms. The prognosis of this disease is variable, depending on the clinical condition of the animal, the type and stage of lymphoma and response to treatment. The objective of this study was to conduct a case report of a cat, male, mixed breed, neutered, 13 years old, who presented the following clinical signs: cachexia, increased abdominal volume, dehydration, polyuria, polydipsia and loss of appetite. The pathology and clinical findings confirmed the renal lymphoma; the primary renal lymphoma was confirmed primarily by the lack of involvement of other sites of cancer.

Keywords: cats, hematopoietic cancer, lymphoma.

LINFOMA RENAL PRIMÁRIO EM GATO DOMÉSTICO (*FELIS CATUS*): RELATO DE CASO**RESUMO**

Neoplasias primárias renais em gatos são raras e representam menos de 2% de todos os tipos de câncer, sendo a maioria maligna. Tumores hematopoiéticos são os mais comuns em gatos e 90% são diagnosticados como linfoma, estando entre 30 e 50% de todos os tumores malignos encontrados nesta espécie. Esse tipo de câncer se origina nas células linfóides encontrados em órgãos sólidos, como gânglios linfáticos, fígado e intestino, e atualmente é o câncer mais comum em gatos domésticos com idade média de 11 anos. As formas mais comuns de apresentação são mediastinal, nodal, extranodal e digestiva. Os sinais clínicos são variados e relacionados com a localização anatômica em que a doença se desenvolve. A quimioterapia é o tratamento indicado para as formas sistêmicas, enquanto a radioterapia e a cirurgia associada ou não à quimioterapia são indicados para formas localizadas. O prognóstico desta doença é variável e depende da condição clínica do animal, o tipo e estágio de linfoma e da resposta ao tratamento. O objetivo deste trabalho foi realizar o relato de caso de um gato macho, sem raça definida, castrado, de 13 anos, que apresentava os seguintes sinais clínicos: caquexia, aumento do volume abdominal, desidratação, poliúria, polidipsia e perda de apetite.

¹ Departamento de Medicina Veterinária - Campus Rolim de Moura Universidade Federal de Rondônia. Contato principal para correspondência.

Os achados clínicos e patológicos confirmaram o linfoma renal; o linfoma renal primário foi confirmado principalmente pela falta de envolvimento de outros tipos de câncer.

Palavras-chave: gatos, câncer hematopoiético, linfoma.

LINFOMA RENAL PRIMARIO EN GATO DOMÉSTICO (*FELIS CATUS*): REPORTE DE CASO

RESUMEN

Neoplasias primarias renales en los gatos son raros y representan menos del 2% de todos los tipos de cáncer, siendo el más maligno. Tumores hematopoyéticos son las más comunes en los gatos y el 90% son diagnosticados de linfoma, siendo entre el 30 y el 50% de todos los tumores malignos en esta especie. Este tipo de cáncer que se origina en células linfoides de órganos sólidos, como los ganglios linfáticos, el hígado y los intestinos, y en la actualidad es el tipo de cáncer más común en los gatos domésticos con una edad promedio de 11 años. Las formas más comunes de presentación son nodal, mediastínica, extranodal y digestivo. Los signos clínicos son muy variados y relacionados con la localización anatómica donde se desarrolla la enfermedad. La quimioterapia es el tratamiento dado a la forma sistémica, mientras que la radioterapia y la cirugía asociada o no a quimioterapia están indicadas para formas localizadas. El pronóstico de esta enfermedad es variable y depende de la condición clínica del animal, el tipo y la etapa del linfoma y respuesta al tratamiento. El objetivo de este trabajo fue describir el caso clínico de un gato macho, raza mezclada, castrado, de 13 años, que tenía los siguientes signos clínicos: caquexia, aumento de volumen del abdomen, deshidratación, poliuria, polidipsia y pérdida de apetito. Los hallazgos clínicos y patológicos confirmaron linfoma renal; el linfoma renal primario fue confirmado principalmente por la falta de participación de otros tipos de cáncer.

Palabras clave: gatos, cáncer hematopoyético, linfoma.

INTRODUCTION

Hematopoietic tumors are most common in domestic cats and 90% are classified as lymphoma (1). In this species lymphoma acquires several presentations, including the digestive form, mediastinal, nodal and extranodal. The etiology of lymphoma is multifactorial, since many factors can influence the development of this cancer; for example, Bertone et al. (2) shows a significant risk in cats living at home with exposure to smoke from their owners.

Cats with feline leukemia virus (FeLV) correspond to 14% to 25% of cases of feline lymphoma and infection by Feline Immunodeficiency Virus (FIV) can increase the incidence of disease. Contrary to direct role in tumor genesis of FeLV, FIV plays an indirect role, causing immunosuppression body. Lymphomas associated with FIV are likely to be B cells (B lymphocytes), whereas FeLV-associated lymphomas are predominantly T-cells (T lymphocytes). Genetic and molecular factors involved in the development of feline lymphoma include altering the expression of the tumor suppressor gene, changes in cell proliferation and apoptosis (3).

The average age in cases of feline lymphoma is 11 years although there are cases of animals between 1 and 16 years old. There is also a reference of bimodal presentation, mostly in cats infected with FeLV, with one peak at 2 years of age and another between approximately 10 and 12 (4).

The feline lymphoma can be classified according to their anatomical shape. The digestive lymphoma is characterized by involving gastric, intestinal or lymph nodes, or a combination thereof. It may be present in the form of isolated or diffuse infiltrative mass in large areas. For the colon tumors, lymphoma is the second most common - 41% (5). The mediastinal lymphoma may involve the thymus and the mediastinal or sternal lymph nodes. In cats with thymic pathology, about 63% have lymphoma, and 17% of cats with pleural effusion suffer from the same disease. An uncommon presentation in cats is the nodal involving initially only a peripheral lymph node - represents approximately 4% to 10% of cases. Finally, extranodal form can develop in kidney, nasal cavity, eyes, retrobulbar space, central nervous system, skin, among others (3).

Cats with renal lymphoma, either primary or associated with digestive lymphoma, have an average age of 7.5 years and most animals is FeLV-negative. The cases of renal lymphoma are usually B cells, representing about 5% of all lymphomas (6). A frequent sequel of this form is the neoplastic invasion of the central nervous system. Renal lymphoma is, in most cases, bilateral; the kidneys are uniformly increased and may be presented irregular palpation. More than half of cats with this condition have signs consistent with renal failure, including polyuria and polydipsia, weight loss, anorexia and depression. The cat with renal lymphoma may present increase in unilateral or bilateral kidneys (7).

The physical examination should always be part of the diagnostic approach besides being made CBC, biochemical profile and animals tested for FIV and FeLV (8).

The imaging diagnostic methods are important not only to obtain a diagnosis, but also to assess the clinical status and then characterize the response to treatment (9). Radiography allows identifying lung and abdominal changes like hepatomegaly, splenomegaly, changes in renal silhouette, abdominal lymphadenopathy with a possible displacement of other organs, intestinal occlusion, presence of a mass and ascites; ultrasound has advantages such as noninvasive assessment of the internal structure of organs and lack of exposure to ionizing radiation (10).

In some cases, a biopsy is required for histopathological analysis, allowing observation of the biological behavior of the tumor. The biopsy may be incisional, excisional or performed through the use of a punch in the case of cutaneous lymphoma (3).

Due to the wide range of histological types and anatomical locations observed in cats with lymphoma, treatment is not consensual or predictable. Generally, the percentage of cats with lymphoma who enjoys a complete response to chemotherapy is between 50% and 70%, the average remission time is 4 months and the median survival is 6 months (7,8).

CASE PRESENTATION

At the veterinary clinic Pet Safe in Teresópolis – RJ - Brazil was attended a male cat, neutered, 13 years old, 3 kg body weight. The main complaint from the owner was weight loss and lack of appetite, polydipsia and polyuria that was going on for five months. Clinical examination showed the animal thinness, apathy, halitosis, pale mucous membranes, dehydration, hypothermia, increased abdominal volume, with the presence of a mass the size of an apple, causing the animal discomfort on palpation. By palpation was not possible to identify the involved organ due to the large volume. It was request a lateral radiograph of the abdomen and chest, complete blood count, urea, creatinine, ALT (alanine aminotransferase), alkaline phosphatase and serology for FIV and FeLV. After the examinations, the animal has been forwarded to fluid therapy and it was recommended that the animal to return the next day for further hydration.

The next morning the owner returned with the animal in shock, coming died an hour later. Necropsy was performed with collection of material for histopathology. The left kidney

was greatly increased and the right kidney atrophied. Furthermore, the presence of serous fluid in the thoracic cavity was observed.

The result of the blood count showed anemia normocytic, normochromic nonregenerative, lymphocytosis and leucopenia, in biochemistry, urea 342mg/dl, creatinine 7 mg/dl, 90UI ALT and alkaline phosphatase 208UI; negative results in serology for FeLV (feline leukemia), and positive serology for FIV (feline immunodeficiency virus).

The radiographic image showed intense enlarged left kidney and atrophy of the right kidney. The material collected for biopsy showed renal lymphoma. In microscopy was observed the massive infiltration of pleomorphic and polygonal neoplastic cells with little cytoplasm, being supported by stromal beams replacing parenchymal cells. The nucleous were presented in various forms, ovoid, fusiform or round, with dense chromatin; showed high mitotic index with atypical mitosis.

Faced with the histopathological features and the absence of involvement of other neoplastic sites, it was confirmed the primary renal lymphoma.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Hematopoietic tumors occur frequently in domestic cats and is greatly evidenced lymphoma (1). The etiology of lymphoma is not unique, being classified as multifactorial and may have different clinical forms (2), so it is difficult to determine the precise cause, even if you have a good anamnesis.

It is possible to have a relationship between the presence of lymphoma and animals infected with FIV and FeLV viruses. Bridgeford et al. (11) demonstrated an association between the presence of infection with *Helicobacter* spp and feline gastric lymphoma, taking the hypothesis of these infectious agents as the cause of this neoplasia. Furthermore, it is known that genetic and molecular factors are involved in neoplasia, thus indicating another contributing factor to the onset of disease (3).

Most of the animals showing the disease are elderly animals as reported by Vezzali et al. (4), which was also observed in our clinical case. Lymphomas have various clinical presentations, and among them, renal lymphoma representing 5% of cases and can be unilateral or bilateral (6) however, some authors, such as Dalek et al. (12) claim that the renal lymphoma in cats is always bilateral, which was not observed in the clinical case where the cat had the unilateral renal lymphoma.

Imaging studies are important in the diagnosis of lymphoma, although an accurate result is not possible; in this case it was demonstrated a large increase in kidney volume, suggesting neoplastic process. Although there are some treatments that will improve the quality of life and survival of animals (8), this is not always possible because the advanced stage of the disease to which the owners will seek help.

Lymphoma is the hematopoietic cancer most commonly found in cats and should be established a suitable therapeutic protocol, aimed at animal welfare, quality of life and the choice of the owner.

Rarely cured, the treated lymphoma can provide quality of life for a while and increased animal survival. Based on the clinical and histopathological findings, and especially in the absence of other neoplastic sites, we could confirm the diagnosis of primary renal lymphoma in cats.

REFERENCES

1. Haney SM, Beaver L, Turrel J, Clifford CA, Klein MK, Crawford S, et al. Survival analysis of 97 cats with nasal lymphoma: a multi institutional retrospective study (1986-2006). *J Vet Intern Med.* 2009;23:287-94.

2. Bertone ER, Snyder LA, Moore AS. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *Am J Epidemiol.* 2002;156:268-73.
3. Vail DM. Feline Lymphoma and leukaemia. In: Withrow SJ, Vail DM. *Small animal clinical oncology.* 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Elsevier; 2007. p.733-56.
4. Vezzali E, Parodi AL, Marcato OS, Bettini G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol.* 2010;8:38-49.
5. Gieger T. Alimentary lymphoma in cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2010;41:419-32.
6. Moore AS, Frimberger AE. Anticancer drugs and protocols: traditional drugs. In: Bonagura JD, Twedt DC. *Kirk's current veterinary therapy XIV.* 14th ed. Missouri: Saunders Elsevier; 2009. p.309-11.
7. Taylor SS, Goodfellow MR, Browne WJ, Walding B, Murphy S, Tzannes S, et al. Feline extranodal lymphoma: response to chemotherapy and survival in 110 cats. *J Small Anim Pract.* 2009;50:584-92.
8. Vail DM. Hematopoietic tumours. In: Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of veterinary internal medicine.* 7th ed. Missouri: Saunders Elsevier; 2010. p.2148-57. vol.2.
9. Kano R, Sato E, Okamura T, Watanabe S, Hasegawa A. Expression of Bcl-2 in feline lymphoma cell lines. *Vet Clin Pathol.* 2008;37:57-60.
10. Zwingenberger AL, Marks SL, Baker TW, Moore PF. Ultrasonographic evaluation of the muscularis propria in cats with diffuse small intestinal lymphoma or inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med.* 2010;24:289-92.
11. Bridgeford EC, Marini RP, Feng Y, Parry NMA, Rickman B, Fox JG. Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;123:106-13.
12. Dalek CR, Calazans SG, Nardi AB. *Oncologia em cães e gatos.* 1a ed. São Paulo: Roca; 2009.

Recebido em: 04/08/2016

Aceito em: 27/01/2017

FIBROMA VAGINAL EM CADELA (*Canis familiaris*) - RELATO DE CASO

Igor Mansur Muniz¹
Evelyn Rabelo Andrade^{1*}

RESUMO

Depois das neoplasias de glândula mamária em cadelas, os tumores de vulva e vagina são os mais comumente observados na rotina oncológica, correspondendo aproximadamente 2,4 a 3% das neoplasias caninas. O presente trabalho descreve um caso de fibroma vaginal em uma cadela sem raça definida, de doze anos de idade. O animal pertencia a um abrigo de animais e exibiu um aumento acentuado de volume na região vaginal. Os resultados do exame clínico e laboratorial permitiram a realização de extirpação cirúrgica com sucesso e diagnóstico histopatológico de fibroma, com ótima recuperação e sobrevivência da paciente. Apesar da literatura relatar que fibromas vaginais e vulvares são incomuns em cadelas, fica claro a necessidade da realização de diagnósticos específicos na presença de massas tumorais nesta região.

Palavras-chave: cão, neoplasia, sistema genital.

VAGINAL FIBROMA IN BITCH (*Canis familiaris*) - CASE REPORT**ABSTRACT**

After the mammary gland neoplasms in bitches, tumors of vulva and vagina are the most commonly observed in cancer routine, representing approximately 2.4 to 3% of canine tumors. This paper describes a case of vaginal fibroma in a mongrel dog, twelve years old. The patient belonged to an animal shelter and exhibits a volume increase in the vaginal region. The results of clinical examination and laboratory allowed the realization of successful surgical excision and histopathological diagnosis of fibroma, with excellent recovery and survival. Although the literature report that vaginal and vulvar fibroids are uncommon in dogs, it is clear the need to carry out specific diagnosis in the presence of tumor masses in this region.

Keywords: dog, neoplasia, genital system.

FIBROMA VAGINAL EN PERRA (*Canis familiaris*) – REPORTE DE CASO**RESUMEN**

Después de las neoplasias de las glándulas mamarias en las perras, los tumores de vulva y de la vagina son los más comúnmente observados en la rutina de cáncer, lo que representa aproximadamente el 2,4 al 3% de los tumores caninos. En este trabajo se describe un caso de fibroma vaginal en una perra mestiza, doce años de edad. El animal pertenecía a un refugio de animales y mostró un fuerte aumento de volumen en la zona vaginal. Los resultados del examen clínico y de laboratorio permitieron la realización de la extirpación quirúrgica exitosa y diagnóstico histopatológico de fibroma, con excelente recuperación y supervivencia. Aunque el informe de la literatura que los fibromas vaginales y vulvares son poco comunes en

¹ Docente do Departamento de Medicina Veterinária - Campus Rolim de Moura – Universidade Federal de Rondônia.

* Contato principal para correspondência: evelyn.andrade@unir.br

los perros, es evidente la necesidad de llevar a cabo un diagnóstico específico en la presencia de masas tumorales en esta región.

Palabras clave: perro, neoplasia, aparato genital.

INTRODUÇÃO

Os tumores vulvares e vaginais são os mais comumente observados na rotina oncológica, depois das neoplasias de glândula mamária em cadelas, correspondendo a aproximadamente 2,4 a 3% das neoplasias caninas (1); em gatas esta enfermidade é mais rara (2). A idade de ocorrência varia em animais de 2 a 18 anos, dependendo do tipo tumoral, mas observa-se maior ocorrência em animais com idade avançada, com exceção dos tumores venéreos transmissíveis (TVT), que ocorrem principalmente em animais jovens devido à maior atividade reprodutiva (2). Também já foi relatado (3), que a raça boxer apresenta maior predisposição aos tumores vulvares e vaginais em relação às outras.

As neoplasias de vulva e vagina mais comuns são os leiomiomas, mas também podem ocorrer fibromas, fibrossarcomas, lipossarcomas, carcinomas, mastocitomas, linfossarcomas e neurofibromas (2). Podem ocorrer de forma intra ou extraluminais, onde os primeiros costumam estar aderidos ao vestíbulo ou à parede vaginal por um fino pedículo, sendo firmes e ovoides. A mucosa geralmente está intacta, mas podem ocorrer ulcerações e serem múltiplos (1). Já os extraluminais possuem crescimento lento, provocam edema na região perineal, são normalmente bem encapsulados e pobremente vascularizados (2). Não é incomum a ulceração dos tumores, em função de sua exposição ao meio externo com auto-traumatismo e inflamações secundárias (1).

Fêmeas caninas com neoplasias vaginais costumam apresentar como sinais clínicos mais comuns edema perineal, prolapso tecidual pela vulva, corrimento vaginal sanguinolento à purulento, disúria, polaciúria, incontinência urinária, tenesmo e obstrução à cópula em fêmeas inteiras (2,4); se o tumor se torna inflamado, infeccionado, ou necrótico, pode estar presente corrimento vaginal sanguinolento ou purulento (5). O diagnóstico deve ser realizado o mais precocemente possível por combinação de técnicas que vão desde o toque vaginal, passando pelo exame vaginoscópico, até citologia vaginal e biópsias, e o seu estadiamento deve ser realizado de acordo com a Organização Mundial de Saúde pelo método TNM (tumor primário, linfonodos regionais e metástase à distância) (1,2). Além do diagnóstico clínico e laboratorial, deve-se levar em conta o comportamento da neoplasia e sua capacidade de produzir metástase (6).

O tratamento de eleição é a retirada cirúrgica, juntamente com a ovariossalpingohisterectomia, com técnicas de acordo com a necessidade de extirpação do mesmo e correção anatômica por vulvoplastias. Felizmente a grande parte dos tumores vaginais possui comportamento benigno, favorecendo o prognóstico, que será excelente em casos de tumores benignos e bom nos tumores malignos, se não houver nenhuma evidência de metástase ou infiltração local (7).

O objetivo do presente trabalho é descrever um caso de fibroma intraluminal na vagina de uma cadela.

RELATO DE CASO

Uma cadela sem raça definida, com cerca de doze anos de idade, castrada, de pelagem dourada e 14 quilos, pertencente a um abrigo de animais, no estado do Rio de Janeiro, foi encaminhada para atendimento. Seu estado corporal era adequado e o tratador dos animais do local se queixava que o cão apresentava uma massa protraída na vulva. Ao exame clínico foi constatado aumento de volume na região de vestíbulo vaginal (Fig. 1). À palpação local, foi

identificada uma massa grande de aspecto firme, liso e brilhante que preenchia toda a cavidade vaginal e estava presa à parede da mesma. Com base no diagnóstico clínico de neoplasia, com obstrução parcial da vagina, optou-se pela realização da extirpação cirúrgica da massa.

Os exames laboratoriais de sangue apresentaram resultados de normalidade, permitindo então a realização do procedimento cirúrgico. Como medicação pré-anestésica, utilizou-se acepromazina (Acepran 0,2% - Vetnil[®]/0,2mg/kg) e midazolam (Dormonid - Roche[®]/Dr=1mg/kg).

Foi realizada vulvectomy em função do tamanho da massa (Fig. 2) e constatou-se que a mesma estava aderida ao fundo do assoalho do vestíbulo por um fino pedúnculo. A massa era única e foi extirpada apresentando ao corte cor esbranquiçada, de aspecto colagenoso e firme. No transoperatório utilizou-se isofluorano (Isoforine - Cristália[®]).

No pós-operatório (Fig. 3), utilizou-se a associação de penicilina e estreptomicina injetável (Pen & Strep - Norbrook[®]/1ml/10kg de peso vivo) como antibioticoterapia por dez dias e meloxicam comprimidos (Maxicam - Ouro Fino[®]/1mg/kg) para dor por cinco dias. O animal apresentou ótima recuperação.

O material excisado foi armazenado em formalina tamponada 10% e encaminhado para avaliação histopatológica e caracterizou-se o fibroma.



Figura 1. Aumento de volume acentuado na vagina, período pré-operatório.

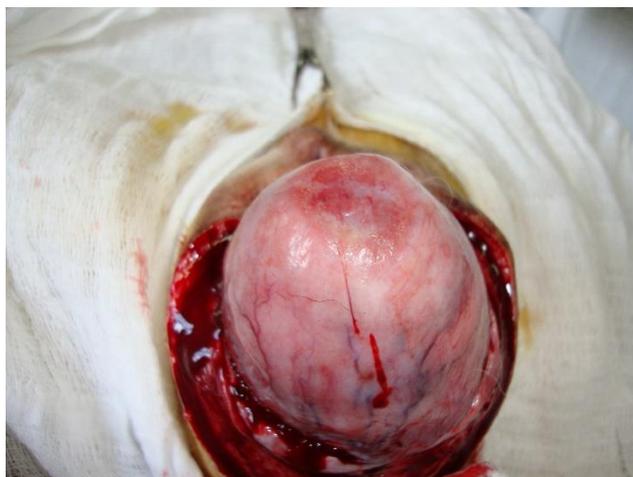


Figura 2. Aspecto da massa após realização da episiotomia.



Figura 3. Período pós-operatório.

DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS

A pele e os tecidos moles são locais comumente afetados por neoplasias no cão (8). No trato genital de cadelas, são comuns os tumores vaginais e vulvares, que em sua maioria se apresenta na forma benigna e fibrosa ou na musculatura lisa, como no leiomioma, leiomiofibroma e pólipos. Esses tumores podem ocorrer de forma hormônio dependente, visto ocorrerem mais comumente em fêmeas idosas e não castradas (9). No presente caso, pelo fato do animal ser de um abrigo de animais, acredita-se que o mesmo tenha sido castrado já com a doença, mas em fase muito inicial, sem diagnóstico clínico. A biologia tumoral é bastante complexa e pode envolver desde fatores genéticos (relacionados à espécie, raça e família), agentes infecciosos (retrovírus), condições ambientais adversas (asbestos, inseticidas e fumantes passivos) e até mudanças de comportamento (desregulação hormonal em cadelas) (8).

Os fibromas são um tipo de neoplasia benigna que pode acometer a derme ou o tecido subcutâneo e raramente ulceram, sendo caracterizados por produzirem grande quantidade de estroma colagenoso, sendo considerado incomum em cães. Acomete principalmente animais idosos, sendo as fêmeas as mais acometidas. Macroscopicamente apresentam-se firmes a moles, bem delimitados, pedunculados ou em forma de domo, estando mais presentes nas extremidades da cabeça, flancos e região inguinal. Seu tamanho varia muito e, geralmente, não são invasivos ou metastáticos (10). No presente caso, não foram identificados sinais de metástase, além de serem mantidas as características macroscópicas. A ocorrência na vagina pode estar relacionada ao fato de ser um animal errante e em condições nutricionais e sanitárias indevidas, além da idade ser favorável ao seu surgimento.

Os tumores benignos possuem crescimento relativamente lento e expansivo, apresentando limites bem definidos entre o tecido neoplásico e o normal, podendo inclusive estar em encapsulados, compatível com os achados do presente relato. Diversos estudos mostram que os animais sem raça definida ocupam o primeiro lugar nos índices de aparecimento de tumores no Brasil, o que ocorre provavelmente por este grupo ser o mais numeroso no país (8).

Nossos achados microscópicos corroboram com a literatura, onde foram identificadas células uniformes em tamanho e forma, de formato espinal bem característico, com moderada quantidade de citoplasma que se afila na direção contrária ao núcleo. Os fibroblastos estavam arrançados em camadas entrelaçadas com diferentes quantidades de colágeno, de acordo com a classificação utilizada por Beveridge and Sobin (11).

Apesar da literatura relatar que fibromas vaginais e vulvares são incomuns em cadelas, fica claro a necessidade da realização de diagnósticos específicos na presença de massas

tumorais nesta região. Isso pode auxiliar os levantamentos epidemiológicos destas enfermidades, assim como melhorar os prognósticos de muitos casos. A histopatologia é uma poderosa ferramenta nestes casos, melhorando a eficácia dos diagnósticos, assim como os prognósticos; a extirpação cirúrgica nestes casos continua sendo o melhor tratamento, pois os resultados demonstram ser mais rápidos e benéficos.

REFERÊNCIAS

1. Whitrow SJ, MacEwen EG. Small animal clinical oncology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1989.
2. Daleck CR, Nardi AD, Rodasky S. Oncologia em cães e gatos. 1a ed. São Paulo: Roca; 2009.
3. Thacher C, Bradley RL. Vulvar and vaginal tumors in the dog: a retrospective study. J Am Vet Med Assoc. 1983;183:690-2.
4. Maia AAS, Costa FVA. Particularidades do ciclo estral e doenças reprodutivas da fêmea felina. Medvop Rev Cient Med Vet. 2010;8:270-7.
5. Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 2a ed. São Paulo: Manole; 1998. p.1545-9.
6. Jark PC, Grandi F, Rossetto VJV, Machado LHA, Amorim RL, Ranzani JJT. Aspectos gerais das neoplasias perineais em cães. Medvop Rev Cient Med Vet. 2010;8:116-22.
7. Fossum TW. Cirurgia de pequenos animais. 3a ed. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier; 2008.
8. Martins DB, Teixeira LV, França RT, Lopes STA. Biologia tumoral no cão: uma revisão. Medvop Rev Cient Med Vet. 2011;9:630-7.
9. Ettinger SJ, Feldman EG. Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
10. Pagnoncelli M, Martins DF, França RT, Zimpel CK, Anjos ST, Mazzanti CMA. Citologia nas neoplasias cutâneas de cães. Medvop Rev Cient Med Vet. 2012;10:72-88.
11. Beveridge WI, Sobin L. International histological classification of tumors of domestic animals. Bull World Health Organ. 1976;53:137-304.

Recebido em: 18/08/2016

Aceito em: 02/02/2017

ATROPHY OF THE SUPRA AND INFRASPINATUS MUSCLES DUE TO INJURY OF THE SUPRASCAPULAR NERVE IN HORSE (SWEENY)

Joandes Henrique Fontequé¹
Anderson Fernando de Souza²
Thiago Rinaldi Muller¹
Jackson Schade³
Paulo Eduardo Ferian¹

ABSTRACT

This is a case report of atrophy of the shoulder muscles (sweeny) – supra and infraspinatus due to suprascapular nerve injury in a horse, cross breed, male, with 15 years of age, weigh 350 kg, used for traction, seen at the Veterinary Hospital (HCV) from the Santa Catarina State University (UDESC), Agroveterinary Sciences Center (CAV) from Lages, SC, Brazil. The animal showed clinical signs such as muscle atrophy of the scapular region and moderate instability of the shoulder joint of the left forelimb. Due to chronic and irreversible changes in the musculature, with no further complications to the animal, treatment was based on reducing workload and suitability of tack used in the animal. This is the first clinical description in Brazil of atrophy of the supra and infraspinatus muscles due to injury of the suprascapular nerve with chronic presentation.

Keywords: sweeny, muscle atrophy, suprascapular nerve, horse.

ATROFIA DOS MÚSCULOS SUPRA E INFRA ESPINHOSO POR LESÃO DO NERVO SUPRAESCAPULAR EM EQUINO (SWEENY)

RESUMO

Relata-se um caso de atrofia dos músculos supra e infraespinhoso por lesão do nervo supraescapular comumente denominada “Sweeny”, em um equino, mestiço, macho, castrado, de 15 anos de idade, pesando 350 kg, utilizado para tração, atendido no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil. O animal apresentava como sinais clínicos a atrofia muscular da região delimitada pelos músculos que preenchem as fossas escapulares e moderada instabilidade da articulação escapulo umeral do membro torácico esquerdo, constatado durante inspeção em movimento. Devido à cronicidade, as alterações irreversíveis na musculatura e ao quadro estável, não trazendo maiores prejuízos ao animal, optou-se por não instaurar qualquer tratamento e recomendou-se ao proprietário a redução da carga de trabalho e adequação do arreamento utilizado no animal. Trata-se da primeira descrição clínica no Brasil de atrofia dos músculos supra e infraespinhoso por lesão ao nervo supraescapular de evolução crônica em equino.

Palavras-chave: sweeny, atrofia muscular, nervo supraescapular, equino.

¹ Professor Doutor, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC.

² Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Clínica Médica de Grandes Animais. Correspondência.

³ Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC

ATROFIA DE LOS MÚSCULOS SUPRA Y INFRASPINOSO DEBIDO LESIONES EN EL NERVIOS SUPRAESCAPULAR EN EQUINO (SWEENY)

RESUMEN

Se presenta un caso de atrofia de los músculos supra y infraespinosos por el daño del nervio supraescapular comúnmente llamado "Sweeny" en un caballo, mestizo, macho, castrado, de 15 años de edad, con un peso de 350 kg, que se utiliza para la tracción, asistimos en el Hospital Clínicas veterinarias (HCV) de Centro de Ciencias Agroveterinarias (CAV) de la Universidad del Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil. El animal mostró signos clínicos tales como la atrofia muscular de la región limitada por los músculos que se llenan los tanques de la escápula y la inestabilidad moderada de la articulación del hombro del húmero de la extremidad anterior izquierda, que se encuentran en movimiento durante la inspección. Debido a los cambios crónicos e irreversibles en la musculatura y estable, no traen más daño al animal, se decidió no iniciar ningún tratamiento y recomendó al propietario reduce la carga de trabajo y la adecuación de guarnicionería utilizado en el animal. Esta es la primera discreción clínica en Brasil atrofia de la lesión muscular arriba y infraespinoso al nervio supraescapular con evolución crónica en equinos.

Palabras clave: sweeny, atrofia muscular, nervio supraescapular, equino.

INTRODUCTION

Peripheral nerves are susceptible to the onset of trauma, due to compressive, stretching and avulsion forces leading to incomplete or complete interruption of nerve impulses, resulting in decreased or lack of sensitivity and/or motor function of the innervated region (1). The atrophy of certain muscle group is the main clinical sign observed in the neuropathies of neural motors branches. Suprascapular nerve dysfunction is associated with atrophy of the muscles of the scapular (shoulder) region, and more precisely to the supra and infraspinatus muscles, promoting instability of the shoulder joint in horses. This disease is also called sweeny (2,3,4). The susceptibility of injury of this nerve can be attributed to its anatomical location, so that cranial trauma on the brachial region can be extremely harmful (4).

Sweeny is a rare condition without predisposition of gender, breed or age (3). The present report aims to describe the first case of atrophy of the supra and infraspinatus muscles due to suprascapular nerve injury by a chronic injury in horse from Lages, State of Santa Catarina, Brazil.

CASE REPORT

A horse, male, crossbreed, 15 year old gelding, weight 350 kg, used for traction, was admitted in the Veterinary Hospital (HCV) from the Santa Catarina State University (UDESC) from Lages, SC, Brazil. The owner had recently purchased the animal not knowing about the past history of the animal. Physical examination revealed muscular atrophy of the scapular region of the left forelimb, no recent history. The infra and suprascapular fossas were evident with clear demarcation of the scapular spine (Figure 1 A, B and C). The animal did not show any change on physical examination, except for muscle atrophy. In specific examination of the musculoskeletal system, through inspection at rest no swelling, scarring or alopecia throughout the length of the member was identified. No presence of pain or sensitivity to palpation was observed. Motion inspection revealed moderate abduction of the scapulohumeral of the left forelimb. The flexion tests performed were negative.

The diagnosis of suprascapular nerve injury was made based on location of the muscle atrophy and altered motion pattern without pain or alternative systemic source for the atrophy. Even having no associated history reported by the owner, there was inadequate tack with support point just above the shoulder joint, concurring with nerve topography. Because it is a chronic condition in which there was adaptation and compensation, not bringing further damage to the animal, no treatment was performed, since the most effective option in this case would be a surgical investigation in order to confirm possible injury or compressive agent.

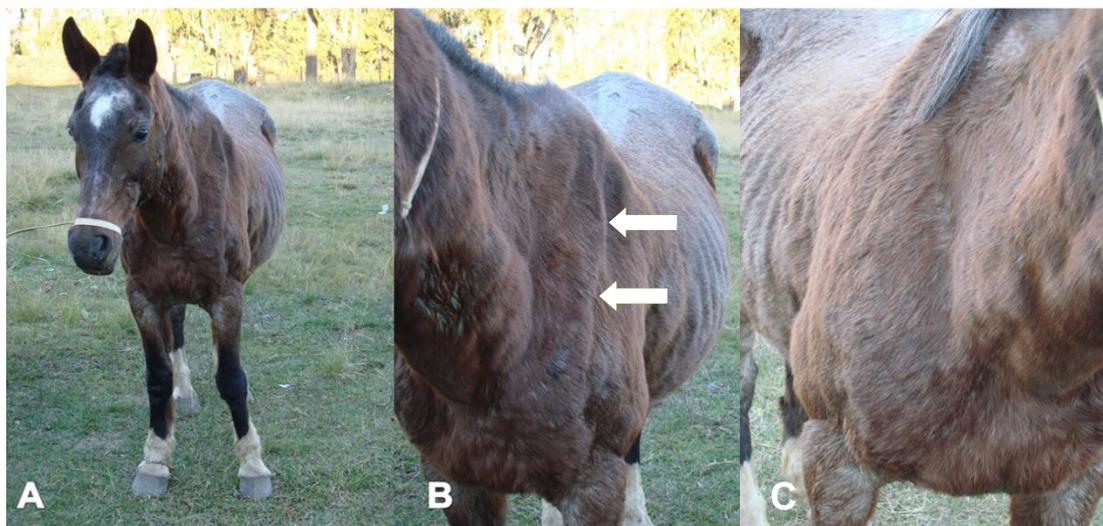


Figure 1. Equine, cross breed, 15 year old gelding used for traction work with atrophy of the infra and supraespinatus muscles with evident scapular spine (arrows) (A and B). Contralateral forelimb with normal musculature of the scapular region (C).

DISCUSSION AND CONCLUSION

The first observations of atrophy of the scapular muscles occurred in animals used for traction, mainly due to the inappropriate use of tacks, especially those shaped collar like, so that the intense and prolonged contact on the cranial region of the scapula would eventually promote friction and consequent injury (5). Currently this condition is linked to situations where the animal suffers excessive and/or violent retraction of the member or any direct trauma to the brachial region (3).

The main clinical sign in this condition is the atrophy of the muscles overlying the scapula. Low lameness may reflect muscle atrophy due to the support in the limb insufficiency, in which case we also observed reduction in muscle mass of the triceps. Fractures of the scapula, humerus, biceps bursitis, osteoarthritis and osteochondrosis of the shoulder joint, among other causes may mimic similar clinical and pathologic signs (6).

Intense lameness is seen in acute events, so the disease progresses and the animal consistently supports in the limb, or in those situations where a chronic process is established, there is lateral displacement of the humeral shoulder joint. This instability is due to the biomechanical malfunction of infra and supraespinatus muscles that act as stabilizers of the joint are as well as the collateral ligaments.

According to Dyce et al. (7), Getty et al. (8) the predisposition of the injury of the suprascapular nerve is its anatomical location. The nerve usually originates from the convergence of branches from the sixth and seventh cervical vertebrae components of the brachial plexus, following a proximal to the medial aspect of this scapular region to a more

lateral direction between supraespinatus and subscapularis muscles ensuing the suprascapular artery, bypassing the cranial neck of the scapula, about seven inches above the supraglenoid tuber and then reaches the distal end of supraespinous fossa, in which reaches the shoulder muscles.

Precisely at the time that the nerve travels from medial to lateral in the member, one small strip of tendon overlies the nerve and the muscle provides considerable coverage with the subclavius and supraspinatus muscles, which exert pressure on the cranial border of the scapular notch. There is no significant interstitial tissue between the nerve and scapula in the region, which could have a damping function, leaving it vulnerable to trauma. Histologically, it was observed in animals without clinical signs, some demyelination process to a chronic level of the nerve, this suggests that there is a natural anatomical condition in which exerts chronic nerve compression, but with only subclinical implications which would make it more vulnerable to acute trauma, or even the appearance of clinical signs without a history of trauma nerve (9).

As proposed by Stashak (3), surgical treatment is advised when preceded the failure of conservative treatment after 10 to 12 weeks. This relates to the time rate of peripheral axonal growth that is 1mm/day, depending on the extent of supraescapular nerve which usually occurs somewhere around 7-8cm. The removal of a wedge-shaped piece of the cranial border of the scapula in the area where the nerve pierces can be beneficial as the pressure relief and reestablishment of innervation. In the long term, there is no significant difference in conservatively treated horses to those who underwent surgical exploration and resection of a scapular notch (2).

Conservative treatment is generally based on repose for a sufficiently long period with systemically therapy with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's), daily showers with cold water and/or compression and topical anti-inflammatory products such as dimethyl sulfoxide (DMSO) (3,10). The regeneration of injured nerve fibers is influenced by numerous factors such as the nature and level of the lesion, denervation time, type and diameter of nerve fibers affected, the individual's age and other individual variables. Another problem observed in chronic cases is the establishment of irreversible changes in muscle tissue by replacement of fibrous tissue in cases of neurogenic muscular atrophy (3).

The diagnosis was based on standard topographic and location of the muscle atrophy, in which only the supra and infraespinatus muscles presented atrophy. This is due to the fact that the suprascapular nerve function is to provide motor innervation of these muscles. Electromyography is described as a diagnostic tool and should be performed with at least seven days after the injury (11). Surgical exploration of the region could be beneficial to elucidate the possible cause of compression, but would not produce a significant effect on the recovery of the muscle, since the time of disuse presents a degree of irreversible degeneration of muscle fibers with replacement by connective and adipose tissue.

Literature regarding regeneration of nerve tissue proposes therapies that have satisfactory results experimentally. Conservative and surgical treatments are described with variables clinical outcomes (10,12,13). Literature suggest physiotherapy alone or combined with drug therapy to be more effective for functional recovery (14).

To date, this is the first report of Sweeny in Brazil, but not necessarily indicates an unusual and unprecedented condition but perhaps a mere oversight and / or inattention to the diagnosis, since the large number of horses that are used for traction and are subject to this condition. Veterinarians should be aware of sweeny and include on the list of differential diagnoses in cases of muscular atrophy of the scapular region.

REFERENCES

1. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VPS. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Rev Bras Fisioter.* 2006;10(1):113-9.
2. Mayhew J. *Large animal neurology.* 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009.
3. Stashak TS. Lesão do nervo supra-escapular (Sweeny). In: Stashak TS. *Claudicação em equinos segundo Adams.* 5a ed. São Paulo: Roca; 2006. p.864-7.
4. Adams OR. Atrophy of the supraspinatus and infraspinatus muscles (Sweeny). In: Adams OR. *Lameness in horse.* 3rd ed. Philadelphia: Lea e Febiger; 1974. p.162-3.
5. Furr M. Disorders of the peripheral nervous system. In: Furr M, Reed S. *Equine neurology.* Iowa: Blackwell Publishing; 2008. p.331-2.
6. Carmona JU, López C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. *J Equine Vet Sci.* 2011;31(9):506-10.
7. Dyce KM, Wensing CJG, Sack WO. *Tratado de anatomia veterinária.* 3a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
8. Getty R, Rosenbaum CE, Ghoshal NG, Hillmann D. Sisson e Grossman: *anatomia dos animais domésticos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986.
9. Duncan ID, Schneider RK, Hammang JP. Subclinical entrapment neuropathy of the equine suprascapular nerve. *Acta Neuropathol.* 1987;74(1):53-61.
10. Dutton DM, Honnas CM, Watkins JP. Non-surgical treatment of suprascapular nerve injury in horses: 8 cases (1988-1998). *J Am Vet Med Assoc.* 1999;214(11):1657-9.
11. Baxter GM. *Manual of equine lameness.* Oxford: John Wiley and Sons; 2011.
12. Adams OR, Schneider RK, Bramlage LR, Easley KJ, Schneider JE. A surgical approach to treatment of suprascapular nerve injury in the horse. *J Am Vet Med Assoc.* 1985;187(10):1016-8.
13. Schneider JE, Adams OR, Easley KJ, Schneider RK, Bramlage LR, Peter J, et al. Scapular notch resection for suprascapular nerve decompression in 12 horses. *J Am Vet Med Assoc.* 1985;187(10):1019-20.
14. Rattenhuber S, Benz H, Gajewski Z, Carstanjen B. Swim training as therapy of neurogenic induced unilateral shoulder instability in three horses. *Pferdeheilkunde.* 2012;28(6):665-7.

Recebido em: 08/05/2016

Accito em: 10/02/2017

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DE TEMPERATURA COMO MÉTODO DE ESTUDO DA MICROBIOTA CECAL DE FRANGOS DE CORTE

João Carlos Zamae Rodrigues¹
Adriano Sakai Okamoto²
Josias Rodrigues³
Tarcísio Macedo²
Raphael Lúcio Andreatti Filho²

RESUMO

Exigem-se atualmente das aves de produção um desenvolvimento acelerado e máxima eficiência produtiva, o que só pode ser obtido tendo-se como base uma homeostase fisiológica intestinal, a qual só será possível mediante o estabelecimento de uma microbiota saudável. É de consenso geral que a microbiota afeta tanto o sistema imune, local e sistêmico, quanto o aproveitamento da dieta, por isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a composição da microbiota cecal das aves ao longo dos 42 dias de vida, utilizando-se da Técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (TGGE), ainda não explorada pela avicultura. Os resultados demonstraram uma estabilidade da composição da microbiota ao longo do período avaliado, entretanto, um refinamento da técnica e outros estudos podem trazer informações complementares.

Palavras chave: *Salmonella*, frangos, TGGE, microbiota intestinal, imunidade.

EVALUATION OF THE TEMPERATURE GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS AS STUDY METHOD OF THE BROILER CHICKEN CECAL MICROBIOTA

ABSTRACT

They are currently required of the poultry of production an accelerated development and maximum productive efficiency, which can only be provided taking as the basis an intestinal physiological homeostasis, which can only be achieved by establishing a healthy microflora. It is generally agreed that the microbiota affects both the immune system, local and systemic, as the use of diet, so the aim of this study was to evaluate the composition of the cecal microbiota of birds over the 42 days of life, using the electrophoresis technique Gel with temperature gradient (TGGE), not yet exploited by poultry. The results demonstrated a stable microbiota composition throughout the study period, however, a refinement of technical and other studies can provide additional information.

Keywords: *Salmonella*, broiler, TGGE, intestinal microbiota, immunity.

¹ Patologia aviária, FMVZ - Unesp de Botucatu. Correspondência.

² Setor de Ornitopatologia, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ - Unesp de Botucatu.

³ Departamento de Microbiologia, IBB – Unesp.

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DE TEMPERATURA COMO UN MÉTODO DE ESTUDIO DE LA MICROBIOTA CECAL DE POLLOS DE ENGORDE

RESÚMEN

En la actualidad se requiere la producción de aves de corral acelerado desarrollo y la eficiencia productiva máxima, que sólo puede ser proporcionado tomando como base una homeostasis fisiológica intestinal, que sólo se puede lograr mediante el establecimiento de una microflora saludable. En general, se acordó que la microbiota afecta tanto al sistema inmunológico, local y sistémica, como el uso de la dieta, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la composición de la microbiota cecal de las aves durante la vida útil de 42 días, utilizando la técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), aún no explotado por la avicultura. Nuestros resultados demostraron una composición de la microbiota estable durante todo el período de estudio, sin embargo, un refinamiento de los estudios técnicos y de otro puede proporcionar información adicional.

Palabras clave: Salmonella, pollos, TGGE, microbiota intestinal, inmunidad.

INTRODUÇÃO

As bactérias do trato gastrintestinal interagem entre si e com seus hospedeiros, e muitas dessas interações permanecem indefinidas devido à falta de conhecimento sobre a completa composição desta microbiota, a qual já se sabe, pode alterar profundamente a saúde e produtividade do hospedeiro (1).

Na produção comercial, as aves são incubadas em ambiente limpo, ocasionando a falta de provedores naturais de uma microbiota (2), assim, seu trato intestinal passa a ser um local de multiplicação irrestrita de patógenos (3). Por isso os eventos que ocorrem logo após a incubação são fundamentais para o desenvolvimento de uma microbiota saudável (2).

Devido às limitações das técnicas de cultivo e biologia molecular convencionais no estudo de comunidades bacterianas, desenvolveu-se a *temperature gradient gel eletrophoresis* (TGGE) (4). Essa técnica consiste em um gel de poliacrilamida submetido a um gradiente de temperatura paralelo a uma corrente elétrica aplicada ao gel (5). O DNA é atraído pelo eletrodo positivo e migra pelo gel, enquanto as pontes de hidrogênio que ligam seus pares de base são separadas pelo gradiente de temperatura, causando sua desnaturação e diminuição do tempo de migração (6). Assim, variação na sequência das bases resultará em diferentes pontos de desnaturação no gel (4). Essas bandas podem ser extraídas, reamplificadas e sequenciadas (7).

Sendo assim, o objetivo do presente experimento foi avaliar a eficácia da técnica de TGGE como ferramenta de estudo da composição da microbiota cecal de frangos de corte ao longo do período de criação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 frangos de corte, com um dia de idade, da linhagem Cobb, alojados em gaiolas de arame com fornecimento de água e ração padrão *ad libitum*. Aos 10, 20, 30 e 42 dias de vida, foram selecionadas 6 aves ao acaso para eutanásia e coleta do conteúdo cecal.

As amostras das 6 aves nos respectivos momentos foram misturadas e esse *pool* submetido à extração de DNA com o kit *Stool DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp®)*. O produto resultante foi submetido à PCR sendo 5µl deste acrescido de 40µl de água ultrapura, 10µl de *Taq 5X Mastermix (Biolabs®)* e 0,5µL de cada um dos *primers, forward* U968GC

(CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC) e *reverse* L1401 (GCG TGT GTA CAA GAC CC) totalizando 50 μ L. A amplificação seguiu-se conforme Zoetendal et al. (8): desnaturação inicial de 95°C/5min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C/40s, anelamento a 55°C/40s e extensão a 72°C/1min, complementos por uma extensão final de 72°C/7min.

Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1,5%, corado com *GelRed 10000x* (BIOTIUM®), por 40min a 70V, tendo como referência um marcador de 100pb. A banda correspondente ao *amplicon* (~433bp) foi purificada utilizando o kit *GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare®) e submetida à eletroforese em gel nas mesmas condições previamente citadas.

Por fim, 1 μ L de cada um dos produtos foi disposto em poços distintos de um gel consistindo de 6% de poliacrilamida (37,5:1), 8M de uréia, 2% de glicerol e 20% de formamida sob um gradiente de 32,5 a 45,4°C, em 130V por 2h. Este gel foi corado com nitrato de prata, observado em transiluminador de luz branca e fotografado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar na figura 1 que o padrão de bandas para G1 se manteve semelhante ao longo dos quatro momentos de coleta e, assim, conclui-se que não houve variação da microbiota.

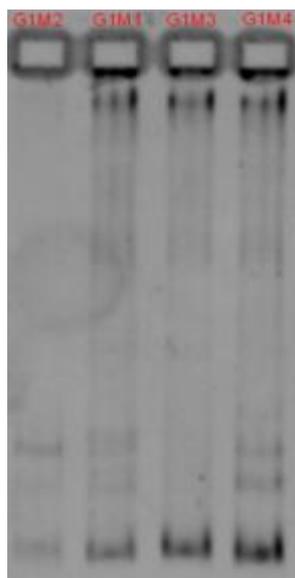


Figura 1. Gel resultante da técnica de TGGE revelando as bandas geradas pelos diferentes amplicons da PCR do conteúdo cecal das aves aos 10 (G1M1), 20 (G1M2), 30 (G1M3) e 42 dias (G1M4).

Os resultados do presente estudo diferem dos de Van der Wielen et al. (9) que reportaram um aumento na complexidade da microbiota, ao longo dos 38 dias de vida das aves, evidenciado pelo aumento do número de bandas no gel de eletroforese. Os autores afirmam ainda que aves mais velhas apresentam padrões de banda mais distintos em relação às outras, diferente das aves jovens que apresentam padrões semelhantes. Os resultados desse estudo não revelaram essa variação, estando de acordo com Apajalahti et al. (10).

Cabe ressaltar que estudos prévios da microbiota intestinal das aves mostraram uma diversidade de espécies, mas, ao se regredir na escala filogenética, observa-se que eles são pertencentes a basicamente 5 famílias, sendo as mais frequentes Enterobacteriaceae, Clostridiaceae e Lactobacillaceae (11).

Pode ser que as variações tenham ocorrido ao nível de gênero, as quais a técnica utilizada no presente estudo não foi eficaz em revelar. Nesse contexto, comunidades bacterianas que apresentam poucos grupos e dominantes, gerarão padrões de banda mais simples e aqueles grupos de menor abundância podem não ser adequadamente representados (4).

Também em discordância com a diversidade da microbiota relatada em literatura está o estudo de Pedroso et al. (12). Simpson et al. (13) ressaltam que os amplicons gerados por comunidades com contagens inferiores a 10^8 UFC/g de fezes não são capturados pela densitometria.

Outra possibilidade é a comigração de alguns fragmentos com poucos pares de base de diferença (14). Nessas situações, há bandas que não representam espécies ou gêneros, mas até famílias ou grupos (13).

CONCLUSÕES

A TGGE é uma ferramenta promissora para o estudo da microbiota entérica das aves e ainda pouco explorada, visto que até o fechamento deste trabalho não se encontraram na literatura estudos similares em frangos de corte. Por isso, esperamos progredir na sua utilização e fornecer dados robustos para a confecção de produtos probióticos e combate aos patógenos intestinais, gerando assim, melhor desempenho produtivo.

Aprovado pelo Comitê de experimentação de Ética da FMVZ, UNESP- Botucatu, conforme Protocolo 43/2013

Apoio e Financiamento FAPESP.

REFERÊNCIAS

1. Lyte M. The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. *Med Hypotheses*. 2010;74(4):634-8.
2. Crhanova M, Hradecka H, Faldynova M, Matulova M, Havlickova H, Sisak F, et al. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. *Infect Immun*. 2011;79(7):2755-63.
3. Methner U, Barrow PA, Gregorova D, Rychlik I. Intestinal colonisation-inhibition and virulence of *Salmonella* phoP, rpoS and ompC deletion mutants in chickens. *Vet Microbiol*. 2004;98(1):37-43.
4. Muzyer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGT) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998;73(1):127-41.
5. Chadalavada DM, Bevilacqua PC. Analyzing RNA and DNA folding using temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) with application to in vitro selections. *Methods Enzimol*. 2009;468:389-408.
6. Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods*. 2004;56(3):297-314.

7. Seidavi A. Molecular approaches for the study of genetic diversity in microflora of poultry gastrointestinal tract. In: Caliskan M. Analysis of genetic variation in animals. Rijeka: InTech; 2012. p.83-104.
8. Zoetendal EG, Akkermans ADL, de Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(1):3854-59.
9. Van der Wielen PWJJ, Lipman LJ, Van Knapen F, Biesterveld S. Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactatifermentans* in a sequencing fed-batch culture. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(3):555-9.
10. pajalahti JH, Särkilahti LK, Mäki BR, Heikkinen JP, Nurminen PH, Holben WE. Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanine-plus-cytosine-based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):4084-8.
11. Amit-romach E, Sklan D, Uni Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult Sci.* 2004;83(7):1093-8.
12. Pedroso AA, Menten JF, Lambais MR, Racanicci AMC, Longo FA, Sorbara JOB. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. *Poult Sci.* 2006;85(4):747-52.
13. Simpson JM, McCracken VJ, White BA, Gaskins HR, Mackie RI. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Methods.* 1999;36(3):167-79.
14. Jackson S, James M, Abrams P. The effect of oestradiol on vaginal collagen metabolism in postmenopausal women with genuine stress incontinence. *BJOG.* 2002;109(3):339-44.

Recebido em: 16/08/2015

Aceito em: 27/01/2017

AValiação DOS PARâMETROS FISIOLÓGICOS DE EQUINOS DA RAÇA PANTANEIRA SUBMETIDOS A CAVALGADA TURÍSTICA

Denise Senna¹
Michele Angelo Luiz¹
Felipe Gomes Ferreira Padilha¹
Ana Beatriz M Fonseca²
Regina de Cássia Veronezi³
Ana Maria Reis Ferreira^{1,4}

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência cardíaca e respiratória de equinos da raça Pantaneira submetidos a cavalgadas turísticas no Pantanal matogrossense. Foram analisados 15 equinos machos castrados da raça Pantaneira utilizados em cavalgadas turísticas. São mantidos em piquetes e suplementados com ração comercial farelada e sal mineral. A mensuração da frequência respiratória, utilizou-se um estetoscópio na base da traqueia e para a análise da frequência cardíaca utilizou-se estetoscópio na base do coração, sendo aferido em repouso e logo após a chegada da cavalgada turística. A média das frequências respiratórias e cardíacas foram, respectivamente, de $25,87 \pm 1,5$ mpm e de $26,4 \pm 1,50$ mpm e $41,07 \pm 1,38$ bpm e $41,60 \pm 1,34$ bpm. Foi observada correlação positiva da frequência respiratória ($p \leq 0,01$) e frequência cardíaca ($p \leq 0,05$) antes e após a cavalgada. O Cavallo Pantaneiro possui a frequência respiratória superior à citada para a espécie equina. O exercício não acarretou, estatisticamente, diferenças das frequências respiratórias e cardíacas antes e após cavalgada turística na região do Pantanal Matogrossense, indicando a adaptação dos equinos da raça Pantaneira ao ambiente e ao exercício imposto.

Palavras-chave: Cavallo Pantaneiro, frequência cardíaca, frequência respiratória, cavalgada.

EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF PANTANEIRO HORSES UNDERGOING TOURIST RIDE

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cardiac and respiratory frequencies of Pantaneiro horses undergoing tourist horseback riding at Mato Grosso's Pantanal. There were used 15 Pantaneiro horses, geldings, used in tourist rides. They are kept in paddocks and supplemented with commercial concentrated and mineral salt. A stethoscope was used to measure the respiratory rate at the base of the trachea and at the heart base to evaluate the heart rate. The measurements were made prior immediately after the tourist ride. The average respiratory and heart rates before and after the tourist ride were, respectively, $25.87 \text{ mpm} \pm 1.5$ and $26.4 \text{ mpm} \pm 1.50$ and $41.07 \text{ bpm} \pm 1.38$ and $41.60 \text{ bpm} \pm 1.34$. A positive correlation between respiratory rate ($p \leq 0.01$) and heart rate ($p \leq 0.05$) before and after the ride was observed. The Pantaneiro horse has a higher respiratory rate compared to equine species. The exercise did not cause statistically differences in the respiratory and heart rates before and

¹Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária em Clínica e Reprodução Animal, Niterói - RJ, Brasil.

²Universidade Federal Fluminense, Instituto de Matemática e Estatística, Niterói - RJ, Brasil

³Universidade Federal do Mato Grosso, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Cuiabá - MT, Brasil

⁴Universidade Federal Fluminense, Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Niterói - RJ, Brasil.

after tourist horseback riding at the Pantanal region. This fact indicates the adaption of these horses to the environment and to the exercise.

Keywords: Pantaneiro horse, heart rate, respiratory rate, tourist ride

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE CABALLOS PANTANEIROS SOMETIDOS A CABALGADA TURÍSTICA

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la frecuencia cardíaca y respiratoria de caballos Pantaneiros sometidos a cabalgada turística en el Pantanal del Mato Grosso. Fueron evaluados 15 caballos machos castrados de la raza Pantaneira utilizados en cabalgadas turísticas. Ellos fueron mantenidos en piquetes y suplementados con pienso comercial y sal mineral. Para la medición de la frecuencia respiratoria se utilizó un fonendoscopio en la base de la tráquea, y para el análisis de la frecuencia cardíaca se utilizó el fonendoscopio en la base del corazón. Ambas mediciones se hicieron en reposo e inmediatamente después de la llegada de la cabalgada turística. El promedio de los índices respiratorios y cardíacos fueron, respectivamente, antes y después del ejercicio, de $25,87 \text{ mpm} \pm 1,5$ y $26,4 \pm \text{ mpm}$ $1,50$ y de $41,07 \pm 1,38 \text{ bpm}$ y $41,60 \text{ bpm} \pm 1,34$. Se observó una correlación positiva entre la frecuencia respiratoria ($p \leq 0,01$) y la frecuencia cardíaca ($p \leq 0,05$) antes y después de la cabalgada. El caballo Pantaneiro tiene la frecuencia respiratoria superior comparada a la de la especie equina en general. El ejercicio no causó, estadísticamente, diferencias en las tasas respiratoria y cardíaca antes y después de la cabalgada turística en la región del Pantanal, lo que indica la adaptación de caballos Pantaneiros al medio ambiente y al ejercicio.

Palabras-clave: Caballo Pantaneiro, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, cabalgada.

O cavalo Pantaneiro, ao longo dos anos, tornou-se um importante auxílio no fator socioeconômico da região do pantanal devido à sua adaptação ao bioma pantaneiro, sendo essencial na pecuária, no transporte de moradores e no ecoturismo. O ecoturismo, vem se consolidando, a cada ano, como uma atividade sustentável, que concilia o desenvolvimento econômico com a preservação do meio ambiente (1).

A região do Pantanal matogrossense apresenta grandes obstáculos naturais às cavalgadas, devido às características climáticas e topográficas (2). O despreparo de alguns animais é evidente durante este exercício, sendo demonstrado por sinais clínicos da síndrome da exaustão caracterizada por uma desidratação exagerada e dores musculares, levando o animal ao abandono do percurso (3).

A frequência cardíaca (FC) pode ser usada para avaliar o condicionamento físico dos animais sendo um do seu nível de adaptação ao exercício imposto determinando e a habilidade do cavalo de continuar o esforço (4). O aumento da atividade respiratória é um meio importante para a perda de calor por evaporação nos animais mantidos sob temperatura elevada (5).

Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência cardíaca e respiratória de cavalos Pantaneiros submetidos a cavalgadas turísticas no Pantanal matogrossense.

Foram utilizados 15 equinos machos castrados da raça Pantaneira, clinicamente saudáveis, com idade entre 6 a 18 anos, com peso médio de 357,38 kg. São mantidos em piquetes e alimentados com capim mimoso (*Axonopus purpusii*), humidícola (*Brachiaria humidicola*), leguminosas nativas e suplementados com dois quilos de ração comercial farelada após a cavalgada e são suplementados com sal mineral específico para espécie duas vezes por semana.

Estes cavalos são utilizados em cavalgadas turísticas, trabalhando aproximadamente seis horas diárias, com repouso de duas horas entre os períodos da manhã e da tarde. A cavalgada turística consiste em um percurso de, em média, 6 km por período, ao passo, com breves paradas para apreciação do Pantanal.

Para a mensuração da frequência respiratória (FR), foi utilizado um estetoscópio na base da traquéia para aferir o movimento da entrada e saída do ar, e para a análise da frequência cardíaca (FC) foi utilizado estetoscópio na base do coração do lado esquerdo do tórax, sendo aferido em dois momentos: o primeiro com os cavalos em repouso e o segundo logo após a chegada da cavalgada turística, sempre no período da manhã.

Para avaliação da homogeneidade dos parâmetros estudados, foi utilizado o Coeficiente de Variação. Para a avaliação da significância da relação entre o tempo médio das frequências respiratória e cardíaca antes e após a cavalgada turística, foi utilizado o Coeficiente de Correlação Linear de Pearson com seu índice de significância igual a 1% e 5%, respectivamente.

A média e o desvio padrão das frequências respiratórias e cardíacas no momento do repouso e após a cavalgada turística foram, respectivamente, de $25,87 \pm 1,5$ movimentos por minuto (mpm) e de $26,4 \pm 1,50$ mpm e $41,07 \pm 1,38$ batimentos por minuto (bpm) e $41,60 \pm 1,34$ bpm. Foi observada correlação positiva da FR ($p \leq 0,01$) e FC ($p \leq 0,05$) antes e após a cavalgada indicando que os valores encontrados são iguais estatisticamente.

A FR em cavalos Pantaneiros foi superior a citada pela referência na espécie equina que varia entre 10 a 20 mpm (1,5,6,7,8). Esses valores podem estar elevados, fisiologicamente, em animais que vivem há muito tempo sob elevadas temperaturas sem que isso prejudique seu desempenho (5)

Os valores mais altos de FR podem indicar que os cavalos Pantaneiros estão utilizando o trato respiratório para auxiliar na dissipação do calor (6).

Nos equinos, a FC normal em repouso pode variar entre 32 e 44 bpm (9). No presente estudo em cavalos Pantaneiros, a FC apresentou a média de 41 bpm, em repouso, estando dentro da normalidade para a espécie equina.

A FC demonstrada neste estudo em equinos da raça Pantaneira foi semelhante aos valores observados por Barbosa et al. (6) e Silva et al. (8) em estudos com cavalos Pantaneiros utilizados no trabalho com gado bovino, o qual estes animais apresentam um maior gasto energético. Entretanto Paludo et al. (10) em seu estudo com cavalos do exército demonstraram uma diferença na FC após o exercício discordando dos achados deste estudo em equinos Pantaneiros.

O Cavallo Pantaneiro possui a frequência respiratória superior à citada para a espécie equina. O exercício não acarretou, estatisticamente, diferenças das frequências respiratórias e cardíacas antes e após cavalgada turística na região do Pantanal Matogrossense, indicando a adaptação dos equinos da raça Pantaneira ao ambiente e ao exercício imposto.

Esta pesquisa foi analisada e aprovada no dia 13 de junho de 2013, pelo Comitê de Ética no uso de Animais, da Universidade Federal Fluminense sob o número de protocolo 277/2013.

REFERÊNCIAS

1. Santos SA, Mazza MCM, Sereno JRB, Abreu UGP, Silva JA. Avaliação e conservação do cavalo pantaneiro. Corumbá: Embrapa; 1995.
2. Ribeiro CR, Martins EAN, Ribas JAS, Germinaro A. Avaliação de constituintes séricos em equinos e muarens submetidos à prova de resistência de 76km, no Pantanal do Mato Grosso, Brasil. Cienc Rural. 2004;34(4):1081-6.

3. Martins EAN, Ribas JAS, Germinaro A, Fernandes WR, Santos MD, Carvalho L, et al. Concentrações séricas de uréia, creatinina, sódio, potássio e cálcio em eqüinos das raças Pantaneira e Árabe submetidos a esforço físico de longa duração no estado de Mato Grosso (cavalgada) – Brasil. *Rev Bras Cienc Vet.* 2004;11(1/2):32-6.
4. Ridgway KJ. Training endurance horses. In: Hodgson DR, Rose RJ. *The athletic horse: principles and practice of equine sports medicine.* Philadelphia: WB Saunders; 1994. p.409-28.
5. Silva LAC, Santos SA, McManus C, Silva RAMS, Costa ACO, Sereno JRD, et al. Tolerancia al calor de caballos Pantaneiros usados en la lidia diaria del ganado en el pantanal brasileño. *Arch Zootec.* 2005;54(206-207):515-21.
6. Barbosa BRP, Santos SA, McManus C, Egito AA, Juliano RS, Paiva SR. Índice de tolerância ao calor em cavalos pantaneiros na região do Pantanal, Brasil. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos; 2012; Belém, PA.* Belém: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos; 2012. p.1.
7. Santos AS. A importância do cavalo pantaneiro nos sistemas sustentáveis de produção animal na região do pantanal. In: *Anais do 1º Simpósio Internacional de Raças Nativas: sustentabilidade e propriedade intelectual; 2015; Teresina, PI.* Teresina: Raças Nativas; 2015.
8. Silva LAC, Santos SA, Silva RAS, McManus C, Petzold H. Adaptação do cavalo pantaneiro ao estresse da lida diária de gado no pantanal, Brasil. *Arch Zootec.* 2005;54(206-207):509-13.
9. Cunningham JG. Termorregulação. In: *Tratado de fisiologia veterinária.* São Paulo: Guanabara Koogan; 1999. p.507-14.
10. Paludo GR, McManus C, Melo RQ, Cardoso AG, Mello FPS, Moreira M, et al. Efeito do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do exército brasileiro. *Rev Bras Zootec.* 2002;31(3):1130-42.

Recebido em: 13/11/2015

Aceito em: 03/01/2017

COLINA PROTEGIDA DA DEGRADAÇÃO RUMINAL E SEU EFEITO NA PREVENÇÃO DA TOXEMIA DA GESTAÇÃO EM OVELHAS LEITEIRAS

Andressa Alaine Michailoff¹
Dom Diego Dall Agnol¹
Anderson Elias Bianchi²
Fabiano Samuel Balistieri³
Eliana Lucia Fiorentin⁴
Ricardo Xavier Rocha⁵
Jose Francisco Manta Bragança⁶

RESUMO

Neste trabalho, teve-se como objetivo avaliar a suplementação de colina protegida da degradação ruminal em ovelhas leiteiras e seu papel na prevenção de toxemia da gestação. Foram utilizadas 20 ovelhas da raça Lacaune, divididas em dois grupos experimentais, controle (GC, n = 10), que recebeu somente a dieta pré-parto e grupo tratado (GCP, n = 10), que, além da dieta pré-parto, recebeu 25g de colina protegida da degradação ruminal a partir do 110º dia de gestação até a última semana de antecedência da data prevista do parto. As coletas de sangue para mensuração de cetonas sanguíneas foram realizadas no 110º dia de gestação (dia zero), 117º dia de gestação (dia sete), 124º dia de gestação (dia 14), 131º dia de gestação (dia 21) e 138º dia de gestação (dia 28), e o nível de colesterol sérico foi avaliado no 124º dia de gestação (dia 14), 131º dia de gestação (dia 21) e 138º dia de gestação (dia 28). A ocorrência de doença clínica de cetose (Toxemia da Gestação) também foi acompanhada durante o período do experimento nos dois grupos. Os valores de cetonas sanguíneas foram inferiores no GCP a partir do dia 14 do experimento, enquanto que os valores de colesterol foram superiores nesse mesmo grupo no dia 28. Em relação à ocorrência da toxemia da gestação, nenhum animal manifestou sinais dessa doença no GCP, enquanto que no GC, um animal apresentou quadro clínico e dois, a forma subclínica da doença. Conclui-se que a suplementação de 25g/dia de colina protegida da degradação ruminal para ovelhas leiteiras a partir do 110º dia de gestação até a última semana de antecedência da data prevista do parto reduziu os efeitos do balanço energético negativo e a incidência de casos de cetose no terço final de gestação.

Palavras-chave: ovinos, cetose, suplementação, metabolismo energético.

RUMEN PROTECTED CHOLINE AND ITS EFFECT ON THE PREVENTION OF PREGNANCY TOXEMIA IN DAIRY EWES

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the supplementation of choline protected from ruminal degradation in dairy sheep and its role in the prevention of pregnancy toxemia. Twenty Lacaune ewes were used and divided into two groups, control group (GC, n =10) received only the diet pre-partum and treated group (GCP, n=10), which in addition to the pre-partum

¹ Acadêmico(a) do Curso de Zootecnia da Universidade do Oeste de Santa Catarina

² Zootecnista Cabanha Chapecó

³ Médico-veterinário

⁴ Laboratório de Análises Clínicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina

⁵ Setor de Grandes Animais, Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC. Correspondência

⁶ Setor de Ovinocultura, Universidade do Oeste de Santa Catarina

diet received 25g of rumen protected choline from the 110th day of pregnancy until the last week prior to the expected date of delivery. Blood samples for measurement the blood ketones performed in 110th of gestation (day zero), 117th days of gestation (day seven), 124th day of gestation (day 14), 131th days of gestation (day 21) and 138th day gestation (day 28) and serum cholesterol level was assessed at 124th days of gestation (day 14), 131th days of gestation (day 21) and 138 days of gestation (day 28). The occurrence of disease clinical ketosis (Pregnancy Toxemia) was also monitored during the experiment in both groups. The amounts of ketones in the blood were lower GCP from day14 of the experiment, while cholesterol values were higher in the same group on day 28. For the occurrence of pregnancy toxemia, no animal showed signs of this disease in the GCP, but in the control group, one animal showed clinical and two animals presents sub clinical ketosis. Concludes that the 25g/day choline supplementation protected from ruminal degradation for dairy sheep from the 110th day of pregnancy until the last week prior to the expected date of delivery reduced the effects of negative energy balance and the incidence of ketosis in the final third of gestation in sheep.

Keywords: sheep, ketosis, supplementation, energy metabolism.

COLINA PROTEGIDA DE LA DEGRADACIÓN RUMINAL Y SU EFECTO EN LA PREVENCIÓN DE LA TOXEMIA DE LA GESTACIÓN EN OVEJAS LECHERAS

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos del aporte alimentar de colina protegida de la degradación ruminal en ovejas lecheras y su papel en la prevención de la cetosis. Fueron empleadas 20 ovejas de la raza Lacaune con edad entre 3 a 5 años y divididas en dos grupos experimentales: control (GC, n=10) el cual recibió apenas la dieta pré parto y el grupo tratado (GCP, n=10) el cual además de dicha dieta los animales recibieron 25 g de colina protegida a partir del 110° día de gestación hasta la última semana anterior al parto. Las muestras de sangre para mensurar cetonas sanguíneas fueron realizadas en los días 110° (día cero), 117° (día 7), 124° (día 14), 131° (día 21) y 138° (día 28) de la preñez. Los niveles de colesterol sérico fueron avaluados entretanto en los días 124° (día 14), 131° (día 21) y 138° (día 28) de dicho período. La ocurrencia de la enfermedad clínica de Cetosis (toxemia de la gestación) también fue acompañada durante el período experimental en los dos grupos. Los valores para cetonas sanguíneas fueron inferiores en el grupo GCP a partir del día 14 del experimento, mientras que los valores de colesterol fueron superiores en este mismo grupo en el día 28. En relación a la ocurrencia de cetosis ningún animal manifestó señales de esta alteración en el grupo GCP, entretanto, en el grupo GC un animal manifestó el cuadro clínico y dos el sub clínico de la enfermedad. De esta forma, se puede concluir que el suplemento de 25 g /día de colina protegida de la degradación ruminal en la dieta para ovejas lecheras a partir del 110° día de gestación hasta la última semana anterior al parto redujo los efectos del balance energético negativo y la incidencia de casos de cetosis en el tercio final de la gestación.

Palabras clave: ovinos, cetosis, metabolismo energético.

INTRODUÇÃO

O final da gestação é o período mais crítico para a ovelha na regulação do metabolismo energético. Nesse período, principalmente nas últimas seis semanas, ocorre o maior desenvolvimento fetal associado a uma redução no consumo voluntário de alimentos e elevação das exigências nutricionais da ovelha gestante (1). O balanço energético negativo, no

final da gestação, é o responsável pelo desenvolvimento de uma doença chamada de toxemia da gestação (2). A toxemia da gestação é resultado da elevação da concentração sérica de corpos cetônicos, sendo o distúrbio metabólico de maior ocorrência no final dessa fase (1) e a principal causa de mortalidade de ovelhas no pré-parto (3). A doença é caracterizada por alterações no metabolismo da glicose e aumento dos níveis séricos de corpos cetônicos resultantes de uma incapacidade do animal em fazer a manutenção do equilíbrio do metabolismo energético (4). Ela ocorre, principalmente, em animais obesos devido ao depósito de gordura hepática, o que interfere no metabolismo do fígado (5). Van Sun (6) verificou que a toxemia da gestação ocorre em ovelhas com condição corporal excessiva no terço final da gestação. O acúmulo de gordura intra-abdominal e a presença dos fetos e/ou fetos grandes resulta em uma redução no consumo voluntário de alimentos. O balanço energético negativo nesse período resulta no aumento da lipólise, pela ação da lipase no tecido adiposo e, conseqüentemente, na elevação dos níveis séricos de ácidos graxos não-esterificados (AGNES). Esses AGNES são transportados ao fígado onde são oxidados, o que resultará na formação de corpos cetônicos (7) ou depósito de gordura nesse órgão, conhecido como esteatose hepática (8).

Da mesma forma como as ovelhas passam por estresse energético no final da gestação (2), as vacas leiteiras de alta produção também enfrentam desafio energético. No entanto, nas fêmeas bovinas, o momento mais crítico é o período de três semanas antes do parto e as três primeiras semanas de lactação, chamado de período de transição (8). Em vacas leiteiras, Piepenbrink e Overton (9) sugeriram que a suplementação de colina protegida da degradação ruminal pode aumentar a síntese de VLDL, o que resultaria em um menor depósito de gordura hepática e também uma menor formação de corpos cetônicos.

Assim, o objetivo neste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de colina protegida da degradação ruminal em ovelhas leiteiras no período pré-parto na cetogênese, colesterol sérico e risco de toxemia da gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em uma propriedade criadora de ovinos leiteiros, localizada no município de Chapecó, região oeste de Santa Catarina, e foi dividido em dois momentos: o primeiro, nos meses de dezembro de 2012 e janeiro de 2013 e o segundo, em maio e junho de 2013. Na primeira etapa, foi realizada a sincronização de estro das ovelhas com protocolo de curta duração, utilizando pessários vaginais de acetato de medroxi-progesterona (MAP), por um período de seis dias, e uma aplicação de análogo de prostaglandina na dose de 25µg retirada do pessário. Após a retirada dos pessários, as fêmeas foram expostas, por um período de cinco dias, a carneiros aprovados no exame andrológico. O diagnóstico de gestação foi realizado 35 dias após as coberturas. Na segunda etapa do experimento (maio-junho), utilizaram-se 20 ovelhas da raça Lacaune, com idade entre três e cinco anos e condição corporal (ECC) entre 3.5 e 4.0 (escala entre 1 e 5), divididas em dois grupos experimentais: controle (GC, n = 10), que recebeu somente a dieta pré-parto, e grupo tratado (GCP, n = 10), que recebeu 25g de colina protegida da degradação ruminal a partir do 110º dia de gestação até a última semana de antecedência da data prevista do parto. A dieta pré-parto foi oferecida em duas refeições diárias e consistiu de silagem de milho *ad libitum* (aproximadamente 3kg/ovelha) e 400g de concentrado com 17% de proteína bruta.

As coletas de sangue para mensuração de cetonas sanguíneas foram realizadas no 110º de gestação (dia zero), 117º dia de gestação (dia sete), 124º dia de gestação (dia 14), 131º dia de gestação (dia 21) e 138º dia de gestação (dia 28). Essa mensuração foi feita com o aparelho OptiumXcced – (Abbott Diabetes Care Ltda., Rio de Janeiro – RJ, Brasil). A dosagem de colesterol sérico foi feita por meio de método enzimático com o uso de analisador semiautomático (BioPlus2000® - Bioplus Produtos para Laboratórios LTDA – Barueri –SP,

Brasil). O parâmetro foi avaliado no 124° dia de gestação (dia 14), 131° dia de gestação (dia 21) e 138° dia de gestação (dia 28). A ocorrência de doença clínica de cetose (Toxemia da Gestação) também foi acompanhada durante o período do experimento nos dois grupos.

Para cetonas sanguíneas e colesterol sérico, a análise estatística constou do teste “t” de student para comparação de média entre os grupos, e, para a ocorrência de toxemia da gestação, utilizou-se o teste qui-quadrado, sendo estas processadas por meio do software “Graphpad Instat” (Graphpad software – San Diego – Califórnia, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de cetonas sanguíneas foram inferiores no grupo suplementado com colina protegida da degradação ruminal (GCP) quando comparado ao grupo controle (GC) a partir do dia 14 do experimento (124° dia de gestação) (Tabela 1).

Tabela 1. Média \pm desvio padrão de cetonas sanguíneas (mmol/L), nos dias zero (110° dia de gestação), sete (117° dia de gestação), 14 (124° dia de gestação), 21 (131° dia de gestação) e 28 (138° dia de gestação) do experimento no grupo controle (GC) e grupo suplementado com colina protegida da degradação ruminal (GCP).

	Cetonas séricas (mmol/L)				
	Dia zero	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
GC	0,58 \pm 0,19 ^a	0,53 \pm 0,31 ^a	0,91 \pm 0,71 ^a	0,72 \pm 0,87 ^a	0,96 \pm 1,43 ^a
GCP	0,44 \pm 0,21 ^a	0,37 \pm 0,14 ^a	0,37 \pm 0,15 ^b	0,44 \pm 0,19 ^a	0,30 \pm 0,10 ^b

^{ab}Letras diferentes na coluna dos dias indicam que houve diferença estatística entre os grupos.

Ovelhas expostas ao balanço energético negativo no final da gestação correm o risco de desenvolverem a doença clínica conhecida como Toxemia da Gestação. Nesse contexto, a mensuração de cetonas sanguíneas serve como diagnóstico para identificação dessa alteração (10). Andrews et al. (11) sugeriram que valores de cetonas sanguíneas acima de 0,7mmol/L indicam risco para essa enfermidade em rebanhos ovinos. Brozos et al. (12) comentaram sobre a importância de um diagnóstico precoce e correto de distúrbios metabólicos subclínicos, como por exemplo, a toxemia da gestação. O diagnóstico antecipado, antes da doença clínica, permite a adoção de medidas preventivas em rebanhos na faixa de risco da doença (acima de 0,7mmol/L de cetonas sanguíneas). A suplementação de colina protegida da degradação ruminal mostrou-se uma importante estratégia para reduzir o risco de cetose em ovelhas no final da gestação, (Toxemia da Gestação) já que houve uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nos valores de cetonas sanguíneas a partir do dia 14 do experimento (124° dia de gestação). Essa redução explica-se pelo papel da colina no metabolismo de lipídeos. Segundo Andriquetto et al. (13), ela participa na homeostase de diversos processos metabólicos, podendo ser classificada como vitamina do Complexo B, e sua deficiência pode acarretar, entre outras coisas, no depósito de gordura no fígado. Grummer (8) comentou que se perde em torno de 97% da colina quando suplementada de forma não protegida da degradação ruminal e que alguns trabalhos com colina protegida alcançam 85% de proteção ruminal. Ovelhas, no terço final de gestação, apresentam redução na ingestão voluntária de matéria seca e têm exigências nutricionais aumentadas nesse mesmo momento. Sendo assim, dependem da mobilização das reservas corpóreas, principalmente gordura, para a manutenção do equilíbrio energético, o que predispõe ao surgimento de complexo cetose/lipidose hepática. Berchielli et al. (14) afirmaram que a principal função da colina é participar na exportação da gordura do fígado por meio do VLDL. A melhora no *status* energético nas ovelhas no terço final de gestação, observada neste trabalho pela redução das cetonas sanguíneas de ovelhas suplementadas com colina protegida da degradação ruminal, também é observada em vacas leiteiras de alta produção. Cooke (15), trabalhando com vacas em lactação suplementadas

com colina protegida, observou menor concentração sérica de AGNES, menor depósito de gordura hepática e, conseqüentemente, redução do risco de desenvolvimento do complexo cetose/lipidose hepática.

Para os valores de colesterol sérico, houve diferença estatística no dia 28 do experimento (138º dia de gestação), sendo estes mais elevados nos animais suplementados com colina protegida da degradação ruminal ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Média \pm desvio padrão de colesterol sérico (mg/dL) nos dias 14 (124º dia de gestação), 21 (131º dia de gestação) e 28 (138º dia de gestação) do experimento no grupo controle (GC) e grupo suplementado com colina protegida da degradação ruminal (GCP).

	Colesterol (mg/dL)		
	Dia 14	Dia 21	Dia 28
GC	59,94 \pm 5,97 ^a	68,82 \pm 7,06 ^a	60,32 \pm 5,65 ^a
GCP	57,78 \pm 6,05 ^a	73,78 \pm 3,48 ^a	69,47 \pm 3,01 ^b

^{ab}Letras diferentes na coluna dos dias indicam que houve diferença estatística entre os grupos.

Nenhum dos grupos (GC e GCP) apresentou valores para colesterol sérico inferiores ao fisiológico para a espécie. Esses valores, segundo Kaneko et al. (16), devem ficar entre 52 e 76mg/dL. No entanto, no dia 28 do experimento (138º dia de gestação), pelos valores de colesterol sérico superior no grupo suplementado com colina protegida, pode-se sugerir um maior consumo de matéria seca nesse grupo, quando comparado ao grupo controle, o que estaria diretamente relacionado ao *status* energético. Herdt (1) citou que pode haver uma redução significativa no consumo de alimentos no último terço de gestação em ovelhas, principalmente na última semana. Isso parece estar associado à redução de espaço ruminal pela presença do útero gravídico e também pela redução do consumo voluntário de matéria seca em animais que apresentam quadro de cetose clínica e/ou subclínica, característico dessa fase em ovinos (5). Como em ruminantes o principal local de síntese de colesterol é no intestino, os seus níveis séricos sofrem influência da ingestão de matéria seca. Gonzáles et al. (17) citaram o uso do colesterol para avaliação do perfil energético em indivíduos e/ou populações. Riegel (18) ainda citou a síntese de colesterol como situação de anabolismo, em que a insulina estimula a enzima HMGCoaredutase à formação desse lipídeo.

Todos os animais do experimento foram acompanhados clinicamente nesse período, e, no grupo controle (GC), 20% (2/10) apresentaram sintomatologia clínica compatível com Toxemia da Gestação e tiveram seu diagnóstico confirmado por meio da mensuração das cetonas sanguíneas (Tabela 3). A sintomatologia clínica seguiu o descrito por Rook (5), que descreveu um quadro de inapetência, apatia, incoordenação motora, alteração comportamental, podendo alguns animais apresentar quadro com sinais neurológicos e em algumas situações a presença de odor de acetona no ar expirado.

Tabela 3. Número de animais que desenvolveram quadro de cetose clínica (valores de cetonas séricas acima de 3mmol/L) e cetose subclínica (valores de cetonas séricas entre 1-3mmol/L) nos grupos controle (GC) e grupo suplementado com colina protegida da degradação ruminal (GCP).

GRUPOS	Cetose clínica (%)	Cetose subclínica (%)	Total (%)
GC	10% (1/10) ^a	20% (2/10) ^a	30% (3/10) ^a
GCP	0% (0/10) ^a	0% (0/10) ^a	0% (0/10) ^b

^{ab}Letras diferentes na coluna dos dias indicam que houve diferença estatística entre os grupos.

Grummer(19) menciona a importância do uso de alternativas que reduzam os efeitos do balanço energético negativo. Neste trabalho, o uso de colina protegida da degradação ruminal reduziu a ocorrência de toxemia da gestação, já que não houve a apresentação clínica e/ou Michailoff AAM, Agnol DDD, Bianchi AE, Balistieri FS, Fiorentin EL, Rocha RX, et al. Colina protegida da degradação ruminal e seu efeito na prevenção da toxemia da gestação em ovelhas leiteiras. Vet. e Zootec. 2017 mar.; 24(1): 144-150.

subclínica dessa enfermidade em animais do grupo que recebeu essa suplementação. Isso deve-se à característica da colina em exportar a gordura do tecido hepático, o que impede o acúmulo e desenvolvimento do complexo cetose/lipidose hepática (14).

CONCLUSÃO

A suplementação de 25g/dia de colina protegida da degradação ruminal para ovelhas leiteiras a partir do 110º dia de gestação até a última semana de antecedência da data prevista do parto reduziu os efeitos do balanço energético negativo, demonstrado pela redução dos níveis de cetonas sanguíneas e colesterol sérico. Essa suplementação também reduziu a incidência de casos de cetose no terço final de gestação.

REFERÊNCIAS

1. Herdt TH. Ruminant adaptation 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.
2. Schlumbohm C, Harmeyer J. Hyperketonemia impairs glucose metabolism in pregnant ewes. *J Dairy Sci.* 2004;87(2):350-8.
3. Mavrogianni VS, Brozos C. Reflections on the causes and diagnosis of peri-parturient losses of ewes. *Small Rumin Res.* 2008;76(1-2):77-82.
4. Ismail ZA, Al-Majali AM, Amireh F, Al-Rawashdeh OF. Metabolic profiles in goat does in late pregnancy with and without subclinical pregnancy toxemia. *Vet Clin Pathol.* 2008;37(4):434-7.
5. Rook JS. Pregnancy toxemia of ewes, does, and beef cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2000;16(2):293-317.
6. Van Saun RJ. Pregnancy toxemia in a flock of sheep. *J Am Vet Med Assoc.* 2000;217(10):1536-9.
7. Sargison ND, Scott PR, Penny CD, Pirie RS, Kelly JM. Plasma enzymes and metabolites as potential prognostic indices of ovine pregnancy toxemia: a preliminary study. *Br Vet J.* 1994;150(3):271-7.
8. Grummer RR. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J.* 1995;10(20):176.
9. Piepenbrink MS, Overton TR. Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 2003;86(5):1722-33.
10. Radostits OM. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
11. Andrews AH, Holland-Howes VE, Wilkinson JID. Naturally occurring pregnancy toxemia in the ewe and treatment with recombinant bovine somatotropin. *Small Rumin Res.* 1986;23:191-7.

12. Brozos C, Mavrogianni V, Fthenakis GC. Treatment and control of periparturient metabolic diseases: pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2011;27(1):105-13.
13. Andriguetto JM, Perly L, Minardi I, Gemael A, Flemming JS, Souza GA, et al. *Nutrição animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal - Os alimentos.* São Paulo: Nobel; 2002.
14. Berchielli TT, Canesin RC, Andrade P. Estratégias de suplementação para ruminantes em pastagens. *Rev Bras Zootec.* 2006;35(Supl):353-70.
15. Cooke JP. Angiogenesis and the role of the endotelial nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci.* 2007;80(24-25):2347-51.
16. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 6th ed. San Diego: Academic Press; 2008.
17. González FHD, Silva SC, Cerón JJ, Campos R. *Introdução à bioquímica clínica veterinária.* 2a ed. Porto Alegre: UFRGS; 2006.
18. Riegel RE. Radicais livres. In: Riegel RE. *Bioquímica.* 3a ed. São Leopoldo: Unisinos; 2002. p.507-36.
19. Grummer RR. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 1993;76(12):3882-96.

Recebido em: 08/10/2015

Aceito em: 26/11/2016

**SOROPREVALÊNCIA PARA ANTICORPOS ANTI-*TOXOPLASMA GONDII*
(NICOLLE & MANCEAUX, 1909) EM OVINOS PERTENCENTES À
MICRORREGIÃO DE UMUARAMA, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL**

Wellington Augusto Sinhorini¹
Daniela Barbosa Silva²
Hélio Langoni²
Gisela Cristiano Ferraro¹
Raquel Reis Martins¹
Welber Daniel Zanetti Lopes³

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* do rebanho ovino na microrregião de Umuarama, estado do Paraná, foram coletadas amostras de sangue de 194 animais procedentes de quatro propriedades, tendo-se utilizado o método de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos contra o agente. Do total amostrado, 28,3% (55 animais) foram reagentes. Entre as propriedades, os valores variaram de 3,5% a 58,2%, o que pode indicar uma provável diferença no manejo e criação dos animais entre estas propriedades, o que conseqüentemente pode aumentar ou diminuir os riscos da infecção. Em suma, considerando os estudos conduzidos em outras regiões do Paraná, ou mesmo em outros estados brasileiros, a soroprevalência de 28,3% encontrada neste trabalho pode ser considerada moderada. Entretanto, se considerarmos cada local isoladamente, pode-se inferir que a carne ovina de determinadas propriedades pode ser uma importante via de transmissão de toxoplasmose para humanos, uma vez que a prevalência de 58,2% foi verificada em ovinos de uma fazenda. Futuros estudos deverão ser conduzidos com o objetivo de se correlacionar a prevalência de mais rebanhos ovinos desta região com os possíveis fatores de risco para esta importante zoonose.

Palavras-chave: fazenda, ovinos, toxoplasmose, frequência.

**SEROPREVALENCE FOR ANTIBODIES AGAINST *TOXOPLASMA GONDII*
(NICOLLE AND MANCEAUX, 1909) IN OVINE FROM THE MICROREGION OF
UMUARAMA, STATE OF PARANÁ, BRAZIL**

ABSTRACT

With the objective to evaluate the seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* of the ovine flock from the microregion of Umuarama, in the state of Paraná, 194 blood samples were collected in four properties and evaluated by the Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). Of the total samples, 28.3 % (55 animals) were positive. Among the properties, the values ranged from 3.5 % to 58.2 %, which may indicate variability in the management of animals among these properties, which consequently may increase or decrease the risk of the infection. Considering the studies conducted in other regions of Paraná, or even in other states, the seroprevalence of 28.3% found in this study can be considered moderate. However, considering each property isolated, it can be inferred that the meat of certain properties can be a major source of infection for humans toxoplasmosis, since the prevalence of 58.2% was observed in one sheep farm. Future studies should be conducted in order to correlate the

¹ Universidade Estadual de Maringá - UEM (campus Umuarama - Medicina Veterinária). Correspondência.

² Universidade Estadual "Julio de Mesquita Filho"-UNESP (campus Botucatu) (FMVZ)

³ Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina Veterinária

prevalence of most sheep flocks in this region with the possible risk factors for this important zoonosis.

Keywords: farm, frequency, sheep, toxoplasmosis.

**SUEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *TOXOPLASMA GONDII*
(NICOLLE Y MANCEAUX, 1909) EN OVINOS PERTENECIENTES A LA
MICROREGIÓN DE UMUARAMA, ESTADO DE PARANÁ, BRASIL**

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la seroprevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en ovejas en la microregión de Umuarama, estado de Paraná, las muestras de suero fueron colectadas en cuatro propiedades, totalizando 194 animales, el cual, en consecuencia, fueron evaluados por el método, estandarizadas, reacción inmunofluorescencia indirecta (RIFI) para la detección de anticuerpos contra el agente. El total de la muestra regional, el promedio fue de 28,3% (55) animales soropositivos para *T.gondii*, que es el mayor valor que se encuentra en una propiedad fue de 58,2%, lo cual puede ser un motivo de preocupación en relación con la salud pública. El resto de las propiedades, los valores obtenidos entre ellos, discrepantes, girando alrededor del 3,5% al 53,6%, lo que puede indicar una probable variabilidad en el manejo y creación de los animales entre estas propiedades, que a su vez, por aumentar o disminuir el riesgo de infección por coccidiosis en cuestión. En resumen, considerando los estudios realizados en otras regiones de Paraná, o incluso en otros estados brasileños, el valor promedio de seroprevalencia (28,3%) para *Toxoplasma gondii* encontradas en este trabajo se puede considerar como moderada. Sin embargo, si consideramos que cada sitio por separado, se puede inferir que la carne ovina de algunas propiedades pueden ser una fuente importante de infección de toxoplasmosis para el hombre, ya que la prevalencia del 58,2 % se observó en las ovejas de una granja. Los estudios futuros deberían ser llevadas a cabo, con el objetivo de correlacionar la seroprevalencia de más rebaños ovinos de la región con los posibles factores de riesgo para este importante zoonosis.

Palabras clave: granja, ovejas, frecuencia, toxoplasmosis.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa e Família *Sarcocystidae*. É um coccídeo intestinal de felídeos, sendo esses considerados como hospedeiros definitivos e com uma grande variedade de possibilidades para os hospedeiros intermediários, incluindo mamíferos e aves (1).

Por ser uma infecção de distribuição mundial, apesar de serem encontrados com maior frequência em rebanhos localizados em terras baixas e úmidas, que favorece o oocisto resistir por mais tempo (2,3), acometem diferentes animais homeotérmicos, inclusive seres humanos, sendo considerada, assim, uma zoonose de grande importância para medicina veterinária e saúde pública (4).

Seu primeiro relato em ovinos foi em 1942, nos Estados Unidos (5) e logo foi associado com diversos problemas reprodutivos em pequenos ruminantes por todo o mundo. A transmissão congênita ou transplacentária desta enfermidade é considerada comum em ovinos e caprinos, desta forma, as preocupações com a produtividade dos animais, acabam sendo um fator inquietante para criadores. Considerada como a transmissão mais grave, ocorre normalmente em fase aguda ou uma recidiva da doença crônica, durante a prenhez (6). Quando transmitida na fase adulta para os animais, a toxoplasmosis geralmente passa

despercebida pelos produtores; por outro lado, despertam problemas em relação à saúde pública, uma vez que a carne destes animais pode ser via de transmissão para o ser humano (7).

De acordo com Cook (8), dentre as diversas vias de transmissão desta enfermidade para humanos, a mais preocupante epidemiologicamente é a ingestão de produtos de origem animal contendo cistos de *Toxoplasma gondii*, sem tratamento térmico adequado, disseminando assim a doença. Ao redor de 50% de carne ovina e suína estavam contaminadas por cistos de *T. gondii* (4). Jacobs et al. (9) relataram que o elevado consumo de carne ovina na Nova Zelândia, foi a principal via de transmissão da toxoplasmose para os seres humanos. Segundo Larson et al. (10), estas afirmações podem ser voltadas para as regiões brasileiras e determinados grupos sociais, onde o consumo, criação e manuseio deste produto, são os responsáveis pela ocorrência desta enfermidade em humanos.

Uma das formas de diagnóstico é por meio da pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM, em teste de hemaglutinação indireta (HAI), de hemaglutinação indireta 2-mercaptoetanol (HAI/2 ME) e pelo método de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), sempre em amostras de soro (11). A RIFI é considerada padrão ouro no mundo inteiro para diagnóstico de *T. gondii*, contudo, existem outros métodos que na rotina laboratorial são utilizados para o diagnóstico, como o caso do ensaio imunoenzimático ligado a enzima (ELISA), usado essencialmente na pesquisa de anticorpos, quando o objetivo é uma pesquisa mais simples, barata e rápida. Comparativamente, a RIFI possui especificidade e sensibilidade maiores do que o método de ELISA (12). Os resultados são positivos, uma vez que a infecção desencadeia a produção de imunoglobulinas específicas contra *T. gondii*, sendo IgM na fase inicial, e a IgG durante a fase crônica desta enfermidade (13).

Os enormes prejuízos ocasionados por esta enfermidade aliados aos estudos relatados sobre isolamento de parasitos viáveis em tecidos revelam a importância da toxoplasmose ovina como doença e como zoonose. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em ovinos de rebanhos da microrregião de Umuarama, estado do Paraná, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A cidade de Umuarama, é uma das principais do Paraná e polo da região de Entre Rios, que tem população estimada em 410 000 habitantes. Com o desenvolvimento, houve um crescimento das atividades comerciais (urbanas e rurais) e o aumento da população. Localizada no noroeste do estado, a uma distância de 580 km da Capital (Curitiba) e a 115 km do Paraguai. Está a 430 metros acima do nível do mar, entre a latitude 23° 47' 55 Sul e a longitude 53° 18' 48 Oeste.

Para cálculo do número de amostras, foi considerada uma premissa de frequência de 50%, maximizando o tamanho da amostragem e obtendo assim, intervalo de confiança mínimo de 99% e com erro de 5% (14). Dessa forma, de cada propriedade, cerca de 80% dos animais foram amostrados para análise sorológica. Dentro das propriedades, estes animais foram separados aleatoriamente para serem usados como amostragem, sendo que, em cada propriedade, havia uma média de 50 a 90 ovinos. Os animais eram mestiços, machos e fêmeas e com idades entre oito e 36 meses, totalizando 194 amostras, provenientes de quatro fazendas localizadas em municípios da microrregião de Umuarama- estado do Paraná (Tapejara, Umuarama e Mariluz). A microrregião tem um contingente anual de aproximadamente 2000 cabeças de ovinos, segundo último censo de 2010.

Foram coletados 10 mL de sangue, por venocentese, em tubos de ensaio estéreis. No laboratório, estas amostras foram centrifugadas a 1000 g durante 10 minutos. Posteriormente, os soros foram armazenados em tubos de polipropileno e mantidos à temperatura de -20°C, até o momento do processamento para realização dos exames.

Após término das coletas, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses – NUPEZO, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, onde foi pesquisada a presença de anticorpos anti-*T. gondii*.

Os soros foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG, conforme a técnica descrita por Camargo (15). Em todas as reações, foram incluídos soros padrões, positivo e negativo, previamente conhecidos. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência, com títulos considerados positivos a partir da diluição 1:16. Os resultados obtidos estão apresentados pela frequência global, realizada em relação às fazendas e em relação à soropositividade desses animais. Aplicou-se o teste do qui-quadrado de Pearson com correção de Yates, admitindo-se nível de significância de 5%, estatisticamente avaliada pelo programa Graphpad Prism®, v.5.03 (2009) [GraphPad Software®, USA].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 194 amostras de soros examinadas, 55 (28,3%) apresentaram-se positivas para *T. gondii* com títulos ≥ 16 , conforme exposto na Tabela 1. As quatro propriedades amostradas apresentaram positividade com diferença na soropositividade entre as diferentes localidades (Tabela 1); e uma porcentagem de resultados negativos de 71,7%, que comparado estatisticamente com os negativos, houve significância ($P < 0,0001$). A frequência de 28,3% de ovinos soropositivos obtida no presente estudo é menor comparando-se aos resultados obtidos por outros autores na região Norte do Paraná como Freire et al. (16), García et al. (17) e Ogawa et al. (18), que obtiveram valores de 47,8%, 51,8% e 54,6% para anticorpos anti-*T. gondii*, respectivamente, pela imunofluorescência indireta, como realizado no presente projeto. No estado de São Paulo, resultados semelhantes foram obtidos por Soccol et al. (19), com uma média de 25,75% (43/167 ovinos), além de Meireles et al. (20), com achados de 31% do total amostral, pela técnica de ELISA. Já Figliuolo e Kasai (21), com o mesmo teste (RIFI), obtiveram 34,7% de soropositividade. Moura et al. (22) detectaram apenas 7% de soropositividade dos animais. De acordo com Dubey e Kirkbride (23), a ocorrência da variabilidade em relação ao percentual de ovinos soropositivos para toxoplasmose entre diferentes propriedades de uma determinada região, pode ser justificada devido à técnica diagnóstica utilizada na pesquisa, região estudada, idade e manejo dos animais.

Maiores taxas de infecção em animais mestiços foram encontradas por Silva et al. (24) tanto em ovinos quanto em caprinos e por Lopes et al. (25) apenas em ovinos, com aproximadamente 54 % de soropositividade. Estes autores colocam o fator raça como pré-disponente por conta do menor manejo higiênico sanitário das criações de animais mestiços. Apesar dos relatos em relação à toxoplasmose em animais mestiços, o mesmo não foi observado no presente estudo. Garcia-Vázquez et al. (26) apontam diferenças de prevalência de infecção pelo *T. gondii* entre ovinos das raças Pelibuey (47%) e Rambouillet (20%).

Quando se verifica a variação do percentual de animais soropositivos para *T. gondii* entre as quatro propriedades estudadas, observa-se um intervalo de animais sororeagentes relativamente elevado entre estas. A propriedade com prevalência média de 3,6% não chama tanto a atenção, mas a infecção, mesmo que em baixa frequência, mostra que há um risco ao rebanho. Por outro lado, os 58,3% dos animais amostrados que apresentaram anticorpos contra *T. gondii* em uma das fazendas é alarmante e indica maior dispersão do agente na propriedade e maior risco à saúde pública.

Bonametti et al. (27) relataram um surto de toxoplasmose humana na cidade de Bandeirantes, Estado do Paraná, o que elucidada a preocupação com alta frequência de toxoplasmose em rebanhos que tenham destinos para consumo humano. Foram apresentados

17 casos (dentre estes uma paciente que estava no 5º mês de gestação) com sintomatologia aguda da doença, adquirida pela ingestão de carne crua de carneiro, servida em uma festa. Todos os pacientes apresentaram títulos séricos de anticorpos específicos (IgM) que evidenciaram fase aguda da toxoplasmose, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Ainda em relação à variação no percentual de animais positivos encontrados nas diferentes propriedades, esta por sua vez pode indicar diferenças no sistema de criação dos animais, bem como a presença ou não de alguns fatores de risco para enfermidade em alguma destas propriedades, como: presença de gatos junto com os animais, sistema de criação (extensivo, intensivo, semi-intensivo), falta de suplementação mineral, entre outros (25,28). Entretanto, novos estudos deverão ser realizados com o objetivo de associar a prevalência de cada rebanho com os possíveis fatores de risco para esta enfermidade.

Apesar de a toxoplasmose ser apontada, por vários autores, como uma das maiores causas de abortos em ovinos em diversos países (29-33), no presente estudo, durante as coletas sanguíneas, não foi possível observar problemas reprodutivos nas propriedades.

Deste modo é pertinente a realização de estudos mais aprofundados, com acompanhamento sorológico e associação de possíveis distúrbios reprodutivos, exame de fetos abortados, a fim de se tentar isolar o agente.

Tabela 1. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em ovinos provenientes de propriedades rurais da microrregião de Umuarama, estado do Paraná, Brasil.

Propriedade	RIFI		Número de amostras	Frequência de reagentes à RIFI	Análise não paramétrica *
	Reagentes	Não reagentes			
1	8	34	42	19,04%	AB
2	32	52	84	38,09%	A
3	2	24	26	7,69%	B
4	13	29	42	30,95%	AB

*Letras iguais na coluna indicam que as proporções de animais positivos não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Yates corrigido Qui-quadrado ($p > 0,05$).

CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir pela possível dispersão de formas infectantes de *T. gondii* em ovinos da região estudada. Se considerarmos cada local isoladamente, pode-se inferir que a carne ovina de determinadas propriedades pode ser uma importante via de transmissão de toxoplasmose para humanos.

REFERÊNCIAS

1. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Vet Parasitol.* 2000;30:1217-58.
2. Beverley JKA, Watson WA, Spence JB. The pathology of the foetus in ovine abortion due to toxoplasmosis. *Vet Rec.* 1971;88:174-8.
3. Dubey JP, Kirkbride CA. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *J Am Vet Med Assoc.* 1989;195:1715-16.

4. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y animales. 2a ed. Washington: Organization Panamericana de la Salud; 2003. (Publicación Científica; n° 503).
5. Sposito Filha E, Amaral V, Macruz R, Rebouças MM, Santos SM, Drumond LS. *Toxoplasma gondii* ovinos: isolamento do parasita a partir de diafragmas de animais procedentes do Estado do Rio Grande do Sul e abatidos em matadouros de São Paulo para consumo humano. Rev Bras Parasitol Vet. 1992;1-2:117-9.
6. Kawazoe U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. Parasitologia humana. 11a ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p.428.
7. Navarro IT, Vidotto O, Giraldi N, Freire RL. *Toxoplasma gondii*: isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, PR. Semina. 1992;13:15-8.
8. Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: european multicentre case-control study. BMJ. 2000;321:142-7.
9. Jacobs L, Moyle GG, Ris RR. The prevalence of *Toxoplasmosis* in New Zealand sheep and cattle. Am J Vet Res. 1963;24:673-5.
10. Larsson CE, Jamra LM, Guimarães EC, Pattoli DBG, Silva HLL. Prevalência de toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais de Uruguaiana, RS, Brasil. Rev Saude Publica. 1980;14:582-8.
11. Camargo ME. Alguns aspectos atuais do diagnóstico laboratorial da toxoplasmose. An Acad Nac Med. 1995;155:236-9.
12. Fundação Nacional de Saúde (BR). Doenças parasitárias. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2002. (Manual de toxoplasmose).
13. Dubey JP. *Toxoplasmosis* in goats. Agri-pract. 1987;3:43-52.
14. Hrusfield M. Veterinary epidemiology. 2nd ed. Cambridge: Blackwell Science; 1995.
15. Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1964;6:117-8.
16. Freire RL, Giraldi N, Vidotto O, Navarro IT. Levantamento sorológico e epidemiológico da toxoplasmose em ovinos na região de Londrina - PR. Arq Bras Med Vet Zootec. 1995;47:609-12.
17. Garcia JL, Navarro IT, Owaga L, Oliveira RC. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do Norte do Paraná - Brasil. Cienc Rural. 1999;29:91-7.
18. Ogawa L, Navarro IT, Freire RL, Oliveira RC, Vidotto O. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos da região de Londrina no Estado do Paraná. Semina Cienc Agrar. 2003;24:57-62.

19. Soccol VT, Castro EA, Gazda TL, Garcia G, Richartz RRTB, Dittrich RL. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos das áreas urbanas e periurbanas de Curitiba, Paraná. Rev Bras Parasitol Vet. 2009;18:69-70.
20. Meireles LR, Galisteo Jr AJ, Andrade Jr HF. Pesquisa sorológica de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de produção do Estado de São Paulo, Brasil. Braz J Vet Res Anim Sci. 2003;40:267-71.
21. Figliuolo LPC, Kasai N, Ragazo AMA, Paula VSO, Dias RA, Souza SLP, et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2004;123:161-6.
22. Moura AB, Osaki SC, Zulpo DL, Marana ERM. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet. 2007;16:54-6.
23. Dubey JP, Kirkbride CA. Toxoplasmosis and other causes of abortion in sheep from north central United States. J Am Vet Med Assoc. 1990;196:287-90.
24. Silva AV, Cunha ELP, Meireles LR, Gottschalk S, Mota RA, Langoni H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. Cienc Rural. 2003;33:115-9.
25. Lopes WDZ, Santos TR, Silva RS, Rossanese WM, Souza FA, Rodrigues JDF, et al. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brasil. Res Vet Sci. 2010;88:104-6.
26. García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Solorzano-Salgado M. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in three states of Mexico. Prev Vet Med. 1990;10:25-9.
27. Bonametti AM, Passos JN, Silva EMK, Bortoliero AL. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30:21-25.
28. Neto JOA, Azevedo SS, Gennari SM, Funada MR, Pena HFJ, Araújo ARCP, et al. Prevalence and risk factors for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, northeast region of Brazil. Vet Parasitol. 2008;156:329-32.
29. Beverley JKA, Watson WA. Ovine abortion and toxoplasmosis in Yorkshire. Vet Rec. 1961;73:6-11.
30. Dubey JP. Feline toxoplasmosis and its nematode transmission. Vet Bull. 1968;38:495-9.
31. Jacobs L. New knowledge *Toxoplasma* and toxoplasmosis. Adv Parasitol. 1973;11:631-59.

32. Hartley WJ, Munday BL. *Felidae* in the dissemination of toxoplasmosis to man and other animals. Aust Vet J. 1974;50:224-8.
33. Freyre A, Bonino J, Falcon J, Castells D, Correa O, Casaretto A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. Vet Parasitol. 1997;73:13-5.

Recebido em: 08/02/2015

Aceito em: 02/12/2016

PROTEINOGRAMA DE OVELHAS ACOMETIDAS POR CASOS NATURAIS DE TOXEMIA DA PREENHEZ

Alexandre Tadeu Mota Macedo¹
Rodolfo José Cavalcanti Souto¹
Carla Lopes de Mendonça¹
José Jurandir Fagliari²
Paulo César Silva²
Pierre Castro Soares¹
José Augusto Bastos Afonso¹

RESUMO

Os estudos sobre a toxemia da prenhez (TP) na espécie ovina têm sido constantes e inovadores em alguns conceitos, porém não há relatos no Brasil sobre o proteinograma em ovelhas acometidas por casos naturais da doença. Diante disso, objetivou-se avaliar o proteinograma de ovelhas com a enfermidade e comparar os resultados de acordo com a presença apenas da TP e de outras doenças concomitantes. Foram avaliadas 35 ovelhas atendidas na Clínica de Bovinos, campus Garanhuns/UFRPE, diagnosticadas com TP, no período de 2007 a 2013. Os animais foram submetidos ao exame clínico e ultrassonográfico, seguido de coleta de sangue e urina para exames laboratoriais. Todos os animais exibiram uma sintomatologia clínica condizente com um quadro de TP. Os níveis séricos de beta-hidroxi-butarato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (AGNE) encontraram-se elevados em todas as ovelhas. Os valores de cortisol e glicose também estavam elevados e os de insulina reduzidos, além disso, todos os animais apresentaram cetonúria. Das 35 ovelhas avaliadas, 25 apresentaram apenas o quadro de TP (G1), e 10 além da TP apresentaram também outras enfermidades infecciosas concomitantes (G2). No proteinograma, houve aumento nos níveis séricos de haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida e transferrina e redução da PM 23000 Da (proteína ainda não identificada nominalmente) nos dois grupos, enquanto que os de IgG mostraram discreta elevação nos animais do G1 e os de fibrinogênio no G2. Diante disso, podemos concluir que a severa complexidade do transtorno metabólico desencadeado pela TP em ovelhas provoca alterações no perfil das proteínas de fase aguda (PFA) e que o padrão de resposta foi semelhante em ambos os grupos experimentais.

Palavras-chave: Clínica de ruminantes, distúrbio metabólico, eletroforese, ovinos, proteínas de fase aguda.

PROTEIN PROFILE IN EWES AFFECTED BY NATURAL PREGNANCY TOXEMIA

ABSTRACT

Studies on pregnancy toxemia in ewes have been constant and innovative in some respects. However, there are no previous reports on the protein profile of ewes naturally affected by this condition in Brazil. Thus, the aim of the present study was to determine the protein profile of Brazilian ewes affected with pregnancy toxemia and compare the results with ewes affected with concomitant diseases. Thirty-five ewes with a diagnosis of pregnancy toxemia

¹ Departamento de Medicina Veterinária. Clínica de Ruminantes, Universidade Federal Rural de Pernambuco Contato para correspondência.

² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Campus Jaboticabal.

were evaluated at the Bovine Clinic of the Rural Federal University of Pernambuco, Garanhuns Campus, between 2007 and 2013. The animals were submitted to clinical and ultrasound exams, followed by blood and urine collection for laboratory exams. All animals exhibited clinical symptoms of pregnancy toxemia, with elevated beta-hydroxybutyrate acid and non-esterified fatty acids. Ketonuria was found in all animals. The hormone profile revealed high levels of cortisol and low levels of insulin. Among the 35 ewes analyzed, 25 only exhibited pregnancy toxemia (G1) and ten also exhibited concomitant infectious illnesses (G2). The protein test revealed increased serum levels of haptoglobin, α 1-acid glycoprotein and transferrin as well as reduced PM 23000 Da (protein not yet nominally identified) in both groups, whereas IgG was slightly elevated in the animals in G1 and fibrinogen was elevated in G2. Based on the present findings, the severe complexity of metabolic disorder triggered by pregnancy toxemia in ewes causes changes in the profile of acute phase proteins and the response pattern was similar in both experimental groups.

Keywords: Ruminant clinic, metabolic disorder, electrophoresis, sheep, acute phase protein

PROTEINOGRAMA DE OVEJAS AFECTADAS POR CASOS NATURALES DE TOXEMIA DE LA PRENHEZ

RESUMEN

Los estudios sobre la toxemia de la preñez (TP) en ovejas han sido constantes y inovadores en algunos conceptos, pero no hay estudios en Brasil sobre las concentraciones de proteína de casos clínicos naturales de la enfermedad en esta especie. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar las concentraciones de proteína en sangre de casos clínicos naturales de TP en ovejas y comparar los resultados de acuerdo a la presencia sólo de TP y TP con enfermedades infecciosas intercurrentes. Evaluamos 35 ovejas se reunieron en la Clínica Bovina, Campus Garanhuns/UFRPE diagnosticado con TP en el período de 2007 a 2013. Los animales fueron sometidos a un examen clínico y ultrasonido, seguida de la recogida de sangre y orina para análisis de laboratorio. Todos los animales mostraron síntomas clínicos compatibles con un marco de TP. Los niveles séricos de beta-hidroxibutirato (BHB) y ácidos grasos no esterificados (NEFA) que se encuentran a ser altos en todas las ovejas. Cortisol sérico y la glucosa también eran altas, mientras que la insulina reducida, además, todos los animales mostraron cetonuria. Entre las ovejas 35 evaluados, 25 manifestaron sólo el marco TP (G1), y 10 más allá de la TP también tenía otras enfermedades infecciosas concomitantes (G2). En proteinograma, hubo un aumento en la haptoglobina sérica, glucoproteína α 1-ácido y transferrina en ambos grupos experimentales. Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que el trastorno metabólico grave complejidad, provocada por TP en ovejas provoca una respuesta de fase aguda, independientemente de si los animales muestran enfermedades infecciosas intercurrentes.

Palabras clave: Rumiantes clínica, transtorno metabólico, electroforesis, las ovejas, las proteínas de fase aguda.

INTRODUÇÃO

A toxemia da preñez (TP) é uma enfermidade de grande importância na caprinovinocultura, sobretudo na região do semiárido nordestino, pois é a doença metabólica que mais comumente ocorre nestas espécies. Provoca grandes prejuízos econômicos devido às perdas decorrentes do óbito, tanto das matrizes como de suas crias (1,2,3,4). A enfermidade em caprinos e ovinos é altamente fatal, com letalidade próxima a 100% (2). Na Clínica de

Bovinos/UFRPE, campus Garanhuns, situada em uma mesorregião de Pernambuco que detém uma das principais criações de pequenos ruminantes do Estado, a ocorrência da enfermidade tem sido registrada com frequência ao longo dos anos, tendo alcançado os maiores índices no ano de 2008, onde foi diagnosticada em 13,6% dos ovinos atendidos (5).

A TP caracteriza-se por transtornos no perfil metabólico (energético e protéico) e hormonal, que geralmente ocorrem no terço final da gestação em fêmeas com múltiplos fetos (3,6,7,8). As alterações metabólicas se desenvolvem quando cabras e ovelhas não conseguem atender à demanda de glicose da unidade feto-placentária, ocorrendo então hipoglicemia, depleção do glicogênio hepático e a mobilização de gordura, com conseqüente formação de corpos cetônicos. Neste contexto, com os níveis sanguíneos de corpos cetônicos elevados e os de glicose alterados, os sinais clínicos se manifestam (9,10,11,12).

Os animais geralmente não respondem ao tratamento, principalmente quando sua condição clínica é ruim e o sucesso depende da detecção da condição no início, para assegurar um retorno rápido a um apetite normal (10). Como as proteínas de fase aguda (PFA) são consideradas um indicador sensível e rápido de distúrbios inflamatórios em ruminantes, sua avaliação na TP em caprinos e ovinos tem sido estudada com a finalidade de possíveis aplicações práticas no diagnóstico e prognóstico desta enfermidade (13).

As PFA são assim chamadas, porque sua concentração plasmática é alterada rapidamente em processos inflamatórios, traumas cirúrgicos e estresse (14,15,16). A produção de PFA é mediada pela ação de citocinas pró-inflamatórias liberadas nos estágios iniciais da infecção e/ou inflamação, e sua concentração pode aumentar (PFA positiva) ou diminuir (PFA negativa) como conseqüência do estímulo inflamatório. Como exemplos de PFA positivas, temos a α 1-glicoproteína ácida, a α 1-antitripsina, a ceruloplasmina, a haptoglobina e o fibrinogênio, entre outras, e de PFA negativas, temos a albumina e a transferrina. A função destas PFA é ligar-se a moléculas que oferecem risco ao organismo, bem como a debris resultantes da injúria tissular, e assim promover a eliminação destes organismos patogênicos e o reparo do tecido (17).

Os estudos sobre os aspectos clínicos, epidemiológicos, o perfil metabólico e hormonal de ovelhas com TP têm sido relativamente amplos, porém são poucos em relação ao proteinograma de animais com casos clínicos naturais da doença, não havendo inclusive relatos no Brasil. Além disso, o comportamento das PFA em enfermidades metabólicas ainda é pouco estudado, quando comparado às doenças infecciosas, por exemplo. Diante disso, este trabalho se propôs a realizar o proteinograma de ovelhas acometidas por casos clínicos naturais de TP, a fim de avaliar o comportamento das PFA nesta enfermidade, e verificar se existem diferenças nos animais que apresentaram apenas a TP e nos acometidos por outras doenças concomitantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos dados: As informações foram colhidas dos prontuários clínicos de 35 ovelhas atendidas na Clínica de Bovinos, campus Garanhuns/UFRPE, diagnosticadas com TP, durante o período de 2007 a 2013. As ovelhas foram divididas em dois grupos: o primeiro grupo (G1) foi composto por 25 ovelhas, que apresentaram apenas a TP, e o segundo grupo (G2) foi composto por 10 ovelhas, que além da TP tiveram também doenças infecciosas intercorrentes. Os animais eram todos provenientes do Estado de Pernambuco, sendo estas das raças Santa Inês, Dorper e mestiças, com idade entre 1 e 5 anos, peso médio de 63 kg, submetidas predominantemente ao sistema intensivo de produção, recebendo diferentes tipos de concentrado em quantidade elevada. A maioria das ovelhas apresentava o escore corporal quatro, o que correspondeu a 39,39%. O exame clínico foi realizado de acordo com Radostits et al. (18). Os animais foram submetidos ao exame ultra-sonográfico para avaliação do número e viabilidade do(s) feto(s). Todas as ovelhas apresentaram quadro clínico de TP,

cetonúria, níveis de beta-hidroxiacetato (BHB) acima de 0,8 mmol/L e de ácidos graxos não esterificados (AGNE) acima de 0,4 mmol/L, que foram estabelecidos como ponto de corte, de acordo com Kaneko et al. (19).

Colheita das amostras: Amostras de sangue foram colhidas por venopunção jugular, com agulha 25x8mm em tubos siliconizados vacutainer e centrifugadas a 3500rpm por cinco minutos, com os anticoagulantes fluoreto de sódio/oxalato e EDTA a 10% (ácidoetilenodiaminotetracético, sal dissódico), para obtenção de plasma e determinação de glicose e fibrinogênio, respectivamente. As amostras obtidas em tubos sem anticoagulante, para obtenção do soro, foram empregadas na realização das análises bioquímicas, hormonais e proteinograma. As alíquotas de soro foram acondicionadas em tubos tipo eppendorf e mantidas em ultrafreezer (-80°C) (Ultralow freezer NuAire Inc.) para posterior processamento laboratorial.

Análises laboratoriais: O teor plasmático de fibrinogênio foi determinado pelo método de precipitação pelo calor (56-58°C) e a leitura realizada por refratometria, conforme preconizado por Jain (14). A concentração da proteína total no soro sanguíneo foi determinada pelo método colorimétrico de ponto final por reação do biureto (Labtest Diagnóstica S.A). A separação das proteínas foi realizada utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio(SDS-PAGE), utilizando o sistema vertical de eletroforese, conforme descrito por Laemmli (20) e Fagliari e Silva (21). Para a identificação das frações proteicas foi empregada, como referência, solução marcadora (Sigma-Aldrich Corporation 3050 Spruce Street. St. Louis MO63103, Missouri, USA) com pesos moleculares variando de 6.500 a 200.000 Daltons (Da), além das proteínas purificadas albumina, imunoglobulina G(IgG), haptoglobina, α 1-antitripsina e transferrina. Após o fracionamento o gel foi corado durante dez minutos em solução de azul de Coomassie, constituída de metanol (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e azul de Coomassie73 (0,25%). Em seguida o gel foi colocado em solução de ácido acético a 7% para retirada do excesso de corante, até que as frações proteicas se apresentassem nítidas. A determinação das concentrações proteicas foi obtida por meio de densitômetro computadorizado (Shimadzu CS 9301, Japan). Os ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β -hidroxiacetato (BHB) foram avaliados em analisador bioquímico semi-automático LabQuest com o uso de reagentes comerciais (Randox Laboratories Ltd) e para as determinações hormonais de cortisol e insulina, foi empregada a técnica da electroquimioluminescência empregando-se reagentes comerciais (Cobas®). A determinação plasmática de glicose (Labtest Diagnóstica) foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Para a pesquisa de corpos cetônicos na urina foram empregadas fitas reagentes para urinálise (22).

Análise estatística: Os dados obtidos nos dois grupos (G1 x G2) foram submetidos à análise estatística, comparando-os entre si, na qual foi empregado o teste *t de Student*, com nível de 5% de significância ($p < 0,05$) (23).

RESULTADOS

As ovelhas acometidas, de forma geral, exibiram um quadro clínico de decúbito (30,35%), apatia (45,16%), escore corporal IV (39,39%), febre (68,75%), mucosas congestas (72,73%), desidratação (96,97%), edema nos membros (28,13%), taquicardia (93,55%), taquipnéia (53,13%), inapetência a anorexia (63,3%), diminuição da motilidade do rúmen ou atonia ruminal (90,63%) e sintomatologia nervosa com amaurose (11,76%) e opistónono (2,94%). Das 35 ovelhas utilizadas, 25 (71,43%) apresentaram apenas TP (G1) e 10 (28,57%), apresentaram outra enfermidade concomitante (G2). Destas últimas, quatro apresentaram mastite, sendo que em duas delas, já era uma mastite crônica, três tiveram

broncepneumonia, uma teve um quadro de pleuropneumonia, outra de gastroenterite e pneumonia associadas e a última apresentou uma glossite.

Nas ovelhas do G1, foram observadas gestações múltiplas em 70% dos casos, sendo que 55% delas foram duplas e 15% triplas. No G2, 83,33% das gestações foram múltiplas, sendo duplas em 50% dos casos e triplas em 33,33% destes. Foi necessária a realização de cesariana em 68,42% das ovelhas do G1, enquanto que 15,79% delas foram submetidas à manobra obstétrica, assim como tiveram parto eutócico este mesmo percentual de animais. Já no G2, 75% das ovelhas foram submetidas à cesariana e 25% à manobra obstétrica. Em relação aos borregos, houve uma taxa de mortalidade de 48,65% no G1, sendo que em 13,51% dos casos foi uma morte pré-matura. No G2, a mortalidade foi de 38,46%, com 15,38% de mortes pré-maturas. O índice de sobrevivência materna foi de 78,26% no G1 e de 70% no G2.

Todos os animais apresentaram níveis séricos elevados de BHB e AGNE. Os valores médios de cortisol e glicose encontraram-se elevados, enquanto que os de insulina estavam reduzidos, além disso, todas as ovelhas apresentaram cetonúria (Tabela 1). Ao comparar os resultados destas variáveis entre os grupos, não existiram diferenças ($P>0,05$).

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão ($\bar{x} \pm s$) de BHB, AGNE, glicose, cortisol e insulina de ovelhas com toxemia da prenhez (G1) (n=25 animais) e TP com doenças infecciosas intercorrentes (G2) (n=10 animais), atendidas na Clínica de Bovinos, campus Garanhuns, UFRPE, no período de 2007 a 2013.

Parâmetros	G1	G2	Valores de Referência
BHB (mmol/L)	1,6±1,3 ^a	1,33±1,09 ^a	0 – 0,7 ¹
AGNE (mmol/L)	1,3±0,55 ^a	1,1±0,5 ^a	<0,4 ¹
Glicose (mg/dL)	100,4±43,02 ^a	93,92±68,46 ^a	50-80 ¹
Cortisol (nmol/L)	176,16±168,96 ^a	342,76±320,52 ^a	47,14-52,31 ²
Insulina (pmol/L)	8,09±14,5 ^a	4,64±3,05 ^a	85-175 ¹

*Letras idênticas na mesma linha, $P \geq 0,05$.

Fonte: ¹Kaneko et al. (19); ²Carvalho (24).

Quanto ao proteinograma, as amostras permitiram a identificação de 17 a 23 proteínas, cujos pesos moleculares (PM) variaram de 21.032 a 266.006 Da. Os valores observados são demonstrados na Tabela 2. Foram consideradas de interesse clínico e submetidas à protocolo estatístico, as seguintes proteínas: albumina, ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina, α -1 glicoproteína ácida (GPA), PM 30.000 Da, PM 23.000 Da (proteínas ainda não identificadas nominalmente), α 1 anti-tripsina e as imunoglobulinas IgA e IgG, além do fibrinogênio.

Houve aumento nos níveis séricos de haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida e transferrina nas ovelhas em ambos os grupos. No entanto, ocorreu redução dos níveis da PM 23000 Da (proteína ainda não identificada nominalmente) também nos dois grupos. Os valores de IgG dos animais do G1 e os de fibrinogênio do G2 encontraram-se pouco aumentados, enquanto os da proteína total, albumina, ceruloplasmina, IgA e α 1-antitripsina estão dentro dos valores de normalidade. A análise estatística dos dados das PFA demonstrou não existir diferenças ($P>0,05$) entre os grupos estudados.

Tabela 2. Valores médios e desvios padrão ($x \pm s$) da proteína total (PT) e das proteínas de fase aguda (PFA) de ovelhas com toxemia da prenhez (G1) (n=25 animais) e TP com doenças infecciosas intercorrentes (G2) (n=10 animais), atendidas na Clínica de Bovinos, campus Garanhuns, UFRPE, no período de 2007 a 2013.

Proteínas (mg/dL)	G1	G2	Valores de Referência
Proteína Total (g/dL)	7,6±1,53 ^a	7,17±1,07 ^a	6,0 – 7,9 ¹
IgA	53,5±25,38 ^a	51,72±25,11 ^a	40,28 – 75,49 ^{5,6}
Ceruloplasmina	55,1±26,04 ^a	61,35±18,0 ^a	27,57 - 94,02 ^{4,6}
Transferrina	493,9±134,21 ^a	501,31±135,47 ^a	437,07 – 469,15 ^{6,5}
Albumina	4101,5±948,09 ^a	4017,09±576,72 ^a	3713,7 – 4204,48 ^{6,4}
α 1-Antitripsina	241,6±67,44 ^a	212,13±16,81 ^a	176,98 – 247,79 ^{6,5}
IgG	2134,9±639,28 ^a	1794,24±476,95 ^a	1657,47 – 2107,23 ^{6,5}
Haptoglobina	89,9±148,88 ^a	178,5±176,7 ^a	8,95 – 10,31 ^{5,6}
GPA	33,5±17,18 ^a	29,91±12,34 ^a	4,61 – 7,67 ^{6,5}
PM 30000 Da	27,3±13,17 ^a	21,17±9,85 ^a	Não encontrado
PM 23000 Da	127,5±39,12 ^a	101,19±17,8 ^a	156,25 – 193,27 ^{6,5}
Fibrinogênio	433,3±190,61 ^a	550,0±236,88 ^a	100 – 500 ³

^aLetras idênticas $P \geq 0,05$.

Fonte: ¹Kaneko et al. (19); ³Jain (14); ⁴Costa et al. (25); ⁵Lemos (26); ⁶Campos (27).

DISCUSSÃO

As manifestações clínicas e os exames laboratoriais permitiram chegar ao diagnóstico de TP nas ovelhas deste trabalho e estão de acordo com a literatura (4,7,18,28,29). Os resultados do proteinograma revelaram a inferência da TP nos níveis de haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida e transferrina em ovelhas com TP, quando comparados aos resultados de Lemos (26) e Campos (27), que estudaram a dinâmica do proteinograma em ovelhas saudáveis no período de 10 dias antes do parto a 90 dias pós-parto e 30 dias antes do parto a 30 dias pós-parto, respectivamente. Os resultados do presente trabalho se assemelham parcialmente aos relatados por Ametaj (30) e El-Deeb (31), que relataram aumento dos níveis de haptoglobina (Hp), amiloide sérica-A (SAA) e fibrinogênio (Fbg) em vacas com esteatose hepática em ovelhas com TP, respectivamente. Já Yoshino et al. (32) relataram aumentos nos níveis de haptoglobina após restrição alimentar em vacas, e González et al. (13) em cabras com TP induzida experimentalmente. De acordo com Eckersall e Bell (33), a Hp é a proteína de fase aguda mais importante nos ruminantes, o que pôde ser observado no presente trabalho, onde foi a PFA que apresentou os valores mais elevados em ambos os grupos experimentais.

A dinâmica deste processo foi descrita na medicina humana e em vacas no periparto, nos quais transtornos metabólicos podem iniciar e promover uma descontrolada inflamação sistêmica (34,35). Yaqoob e Calder (36) relataram que, em humanos, elas alteram o metabolismo lipídico, promovem o aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) na circulação e o estresse oxidativo, sendo estes, fatores que contribuem de forma significativa para a inflamação sistêmica e o desenvolvimento de doenças inflamatórias. De acordo com Tothova et al. (37), vacas leiteiras podem sofrer distúrbios metabólicos semelhantes e alterações na homeostase durante o período do periparto, na síndrome da lipomobilização e na acidose ruminal sub-aguda. Segundo estes autores, alterações na homeostase e desafios fisiológicos que ocorrem em animais com doenças metabólicas podem contribuir para a ativação do sistema imune do hospedeiro, incluindo a iniciação de respostas inflamatórias.

Segundo Tothova et al. (38), a homeostase energética e o metabolismo em geral estão alterados em vacas acometidas pela síndrome da lipomobilização, pois, ao avaliarem vacas leiteiras entre uma e duas semanas após o parto, com concentrações séricas de AGNE acima

de 0,35 mmol/L, encontraram valores médios significativamente mais elevados de Hp e SAA do que em vacas cujas concentrações destes ácidos estavam abaixo de 0,35 mmol/L. Além disso, o estudo demonstrou uma correlação altamente positiva entre as concentrações de ambas as proteínas de fase aguda avaliadas (Hp e SAA) com as de AGNE de vacas em lactação pós-parto. De acordo com Bernabucci et al. (39) e Sordillo et al. (35) o aumento nas concentrações de AGNE na circulação estão diretamente associados com o aumento das condições inflamatórias sistêmicas, e grandes quantidades de reservas de tecido adiposo durante períodos de deficiência de energia estão relacionados com efeitos adversos à saúde em vacas no período de transição. Condição esta que provavelmente tenha ocorrido nas ovelhas acometidas pela TP.

Há outro fator a ser considerado e ocorrido neste estudo, é a relação entre as PFA e a gestação, que foi relatado por Bastos (40). Com o intuito de estabelecer a cinética destas proteínas em ovelhas da raça Santa Inês, ao longo da gestação e no pós-parto, o autor constatou uma maior elevação nos índices de Hp nos dias 1-7 e 15-21 dias pós-parto. Em um estudo semelhante em ovelhas, Azib e Taha (41) constataram uma correlação positiva entre a concentração da Hp sérica e o intervalo entre o início da distocia e o tratamento, por cesariana (50,3mg/dL \pm 20,7) ou manualmente assistido (3,83mg/dL \pm 115,1). Estes autores sugerem que as concentrações desta proteína são indicativas da presença e grau de dano tecidual que ocorrem na distocia, além de indicarem a intervenção precoce para minimizar as complicações advindas no pós-parto, fato este ocorrido na maioria dos animais atendidos neste estudo.

É importante salientar ainda, que as citocinas pró-inflamatórias, precursoras das PFA, estão associadas com respostas imunes e implicadas na patogênese da TP devido ao seu papel na lesão endotelial (42,43). Uma intensa resposta inflamatória sistêmica e produção aumentada de citocinas ocorrem na TP, e defeitos em células do trofoblasto e destruição de detritos placentários são considerados importantes fatores indutores (44,45). A hipóxia na placenta devido diminuição da perfusão sanguínea, por sua vez, induz a produção placentária das citocinas inflamatórias IL-1 α e TNF- α (46). Nos humanos, a Hp pode também participar dos mecanismos que acontecem no útero gestante e que são necessários para a manutenção da integridade da unidade feto-placentária (47). Estas circunstâncias podem ter ocorrido em algumas ovelhas acometidas pela TP.

Em relação ao comportamento da α 1-glicoproteína ácida (GPA), sabe-se que esta é uma importante proteína de fase aguda na clínica de ovinos, sendo utilizada no monitoramento de processos inflamatórios e infecções em geral. Como foi constatado por Eckersall (33) em um estudo com ovinos infectados experimentalmente com linfadenite caseosa, onde ele verificou um leve e persistente aumento da concentração desta proteína ainda após quatro semanas de infecção. A GPA, além de ser produzida pelos hepatócitos, pode também ser produzida por células mamárias e outro fator importante é que a sua expressão gênica é controlada por uma combinação da regulamentação dos seus principais mediadores, ou seja, uma rede de citocinas, envolvendo principalmente a interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e por glicocorticoides (48,49), cujos valores foram bastante elevados nas ovelhas deste trabalho. Saut et al. (50), estudando a influência do puerpério sobre o proteinograma sérico de caprinos da raça Saanen, observaram aumento nos níveis de GPA entre o primeiro e o quinto dia pós-parto, porém a partir do sétimo dia após o parto verificou-se a diminuição de seus teores séricos. Sheldon et al. (51), também relatam o aumento da GPA no puerpério fisiológico de bovinos, sendo que nesta espécie animal o retorno aos patamares de normalidade ocorria tardiamente, somente a partir do 21º dia pós-parto.

Com relação ao resultado da transferrina sérica (Tf), que apresentou uma elevação discreta, apesar de ser classificada como uma proteína de fase aguda negativa, Jain (14) e Tizard (52) relatam que a concentração desta proteína pode aumentar durante a prenhez. Wick

et al. (53) também observaram concentrações elevadas de Tf em mulheres grávidas. Um dos fatores que poderiam justificar esta condição é que apesar da transferrina ser produzida primariamente nos hepatócitos, há também síntese em macrófagos e células do epitélio mamário (54,55,56). Entretanto, Moser et al. (57) verificaram que esta PFA não sofreu alteração em vacas com cetose clínica, mesmo numa condição em que a função hepática poderia estar comprometida.

Quanto aos valores da PM 23000 Da (proteína ainda não identificada nominalmente), que estavam reduzidos em ambos os grupos, em relação aos resultados obtidos por Lemos (26) e Campos (27), não foram encontradas informações na literatura consultada sobre o comportamento desta proteína em animais com TP. Os presentes autores não verificaram diferença estatística nos valores médios desta proteína em ovelhas prenhas e saudáveis, que praticamente se mantiveram constantes ao longo dos momentos de observação. Rocha (58) observou na espécie bovina, a elevação nos teores desta proteína após a ingestão do colostro, aumentando gradativamente até os 30 dias de vida. Os resultados obtidos no presente trabalho podem sugerir que na TP em ovelhas, a PM 23000 Da se comporte como uma proteína de fase aguda negativa, sendo, no entanto, necessários mais estudos que possam dar embasamento a esta hipótese.

Os resultados obtidos para a IgG, comparados aos de Lemos (26) e Campos (27), discordam dos encontrados por Lacetera et al. (59) e Hefnawy et al. (60) que encontraram um decréscimo nos índices desta imunoglobulina em ovelhas e cabras com TP, respectivamente, e justificam que o estado de imunossupressão nos animais com cetose, pode ser o resultado da ação dos corpos cetônicos (β -hidroxibutirato) que podem inibir a função de leucócitos *in vitro*, e este efeito pode afetar a resposta imune negativamente *in vivo*, a IgG especificamente (61). Porém, resultados compatíveis foram encontrados por Ropstad et al. (62) em vacas com balanço energético negativo, e associam este quadro a presença de doenças e a transtornos concomitantes. Fato este encontrado em alguns animais estudados. É importante ressaltar ainda que nos casos dos primeiros autores, a doença foi obtida experimentalmente, diferindo do presente estudo em que foram utilizados apenas casos clínicos naturais.

A elevação do fibrinogênio nas ovelhas do G2, em relação aos valores de Jain (14), também foi relatada por Ametaj (30) e El-Deeb (31) em vacas com esteatose hepática e ovelhas com TP, respectivamente, que atribuíram esse aumento a uma resposta de fase aguda. Além disso, o aumento dos níveis desta PFA no G2 provavelmente está relacionado ao fato destes animais terem apresentado além da TP, doenças infecciosas intercorrentes, como mastite, broncopneumonia, pleuropneumonia, gastroenterite e glossite. Pois de acordo com Cole et al. (63), Borges et al. (64) e Tothova et al. (37), as maiores e mais consistentes elevações na concentração desta PFA tem sido observada em animais com doenças infecciosas, como peritonite, pericardite, endotoxemia, septicemia, afecções podais, abscessos hepáticos, pneumonia e falência renal aguda.

Embora a proteína total esteja dentro dos limites da normalidade para a espécie ovina segundo Kaneko (19), há uma tendência desta ao limite superior, o que também foi observado por Santos et al. (7). Alguns autores como Cantley et al. (65), Andrews et al. (66), Van Saun (67) e Smith e Sherman (3) relataram a elevação da proteína total em ovelhas com TP, e justificam esta alteração em função dos diferentes graus de desidratação encontrados nos animais acometidos. No presente estudo, 96,97% das ovelhas encontravam-se com algum grau de desidratação, o que poderia explicar esse comportamento da PT.

Os resultados encontrados para a albumina, comparados aos de Costa et al. (25) e Campos (27), se assemelham aos relatados por Cantley et al. (65), Van Saun (67) e Santos et al. (7), em que não houve alteração em relação aos índices de normalidade para a espécie ovina. González et al. (13) também não observaram alterações nos níveis séricos de albumina em cabras com TP induzida experimentalmente. Segundo Andrews et al. (66), alterações nos índices da albumina no sangue estão relacionadas a problemas crônicos ou mudanças agudas

na hidratação do animal, e por ter uma meia vida longa, os seus níveis sanguíneos em ovelhas com TP, apresentando evolução aguda, não diferem das ovelhas sadias no mesmo estágio da gestação. Souto et al. (8) porém, relataram uma redução nos níveis de albumina em cabras com TP, e a justificaram devido a uma falha hepática ou renal como consequência da enfermidade, o que também foi relatado por Yarim e Ciftci (68) em ovelhas. Segundo González et al. (69) a sua diminuição pode estar presente em situações onde existe infiltração gordurosa em animais com alta lipomobilização, podendo ser um indicador da funcionalidade hepática. É importante levar em consideração ainda que, de acordo com Aldred e Schreiber (70) e Gabay e Kushner (71), a albumina sérica é a principal proteína de fase aguda negativa, ou seja, durante a resposta de fase aguda, a demanda por aminoácidos para a síntese de proteínas de fase aguda positivas aumenta, o que exige a revisão das prioridades da síntese hepática de proteínas, assim a sua síntese é regulada negativamente e aminoácidos são desviados para a síntese de PFA positivas.

Quanto à concentração de ceruloplasmina, que se encontra dentro da faixa de normalidade para espécie ovina, de acordo com Costa et al. (25) e Campos (27), não foram encontrados dados na literatura consultada sobre o comportamento desta PFA em ovelhas acometidas com este tipo de transtorno. Bastos (40), porém, estudando ovelhas da raça Santa Inês, ao longo da gestação e no pós-parto, verificou um decréscimo da ceruloplasmina a partir do dia 17 da prenhez e que permaneceu significativamente diminuída até o dia 84, em comparação com os valores antes da sincronização do ciclo estral. Contudo, o período periparto não exerceu influência sobre a atividade desta proteína. Já Kincaid e White (72), conduzindo pesquisas com ovelhas da raça Merino, demonstraram que a atividade da ceruloplasmina decresce entre os dias 40 e 130 de gestação, atingindo valores em torno de 80U/mL, em comparação com o valor de 120 U/mL relativo ao início da gestação. Esta PFA tem sido avaliada também em estudos com bovinos, no auxílio de diagnóstico em muitas condições de doenças, como mastite e pneumonia por pasteurelose (73,74).

Os resultados obtidos para a IgA, quando comparados aos resultados de Lemos (26) e Campos (27), discordam dos encontrados por Hefnawy et al. (60) que encontraram um decréscimo nos índices desta imunoglobulina, em cabras com TP. Estes autores atribuíram o resultado, a uma significativa correlação negativa desta com o β -hidroxibutirato. No entanto, Nonnecke et al. (75) relataram que não existe quaisquer relações significativas entre os indicadores plasmáticos de condição metabólica com funções imunes em vacas leiteiras.

A α_1 -antitripsina (ATT) se apresentou dentro da normalidade quando comparada aos resultados de Lemos (26) e Campos (27). Não foram encontradas informações na literatura consultada sobre o comportamento desta PFA em ovelhas com TP. De acordo com Kaneko et al. (76), ela pode sofrer um rápido aumento, porém de forma inespecífica, em casos de processos inflamatórios. Nos humanos, em certas reações inflamatórias de fase aguda, a AAT eleva-se, a fim de limitar os danos causados por neutrófilos ativados e suas enzimas elastases, limitando a lesão do tecido hospedeiro por proteases no local da inflamação (77). Porém, segundo Tothova et al. (37) pouco se sabe sobre o comportamento e a utilidade de diagnóstico desta PFA em ruminantes.

CONCLUSÃO

Diante dos achados obtidos neste trabalho podemos concluir que a severa complexidade do transtorno metabólico desencadeado pela toxemia da prenhez em ovelhas provoca alterações no perfil das proteínas de fase aguda. O que pôde ser evidenciado na elevação dos níveis séricos de algumas PFA, com destaque para a haptoglobina e a α_1 -glicoproteína ácida. Outro fator a ser considerado é que o padrão de resposta foi semelhante em ambos os grupos experimentais, não havendo diferença o fato de alguns animais terem apresentado doenças infecciosas intercorrentes.

REFERÊNCIAS

1. Marteniuk JV, Herdt TH. Pregnancy toxemia and ketosis of ewes and does. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1988;4(2):307-15.
2. Schild AL. Cetose. In: Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JR. *Doenças de ruminantes e eqüídeos.* 3a ed. Santa Maria: Pallotti; 2007. p.281-9.
3. Smith MC, Sherman D. *Goat medicine.* 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 2009.
4. Campos AGS, Afonso JAB, Santos RA, Mendonça CL, Guimarães JA. Estudo clínico-laboratorial da toxemia da prenhez em ovelhas: análise retrospectiva. *Cienc Anim Bras.* 2010;11(3):623-8.
5. Clínica de Bovinos Campus Garanhuns. Livro de registro dos animais atendidos, ano 2008. Garanhuns: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2008.
6. Pugh DG. *Clínica de ovinos e caprinos.* 1a ed. São Paulo: Roca; 2005.
7. Santos FCO, Mendonça CL, Silva Filho AP, Carvalho CCD, Soares PC, Afonso JAB. Indicadores bioquímicos e hormonais de casos naturais de toxemia da prenhez em ovelhas. *Pesqui Vet Bras.* 2011;31(11):974-80.
8. Souto RJC, Afonso JAB, Mendonça CL, Carvalho CCD, Filho APS, Cajueiro JFP, et al. Achados bioquímicos, eletrolíticos e hormonais de cabras acometidas com toxemia da prenhez. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33(10):1174-82.
9. Kronfeld DS. Ketosis in pregnancy sheep and lactating in ewes: a review. *Aust Vet J.* 1972;48(12):301-7.
10. Andrews A. Pregnancy toxemia in the ewe. In *Pract.* 1997;19(6):306-12.
11. Corrêa MN, González FHD, Silva SC. *Transtornos metabólicos nos animais domésticos.* Pelotas: Editora e Gráfica Universitária PREC-UFPel; 2010.
12. Hefnawy AE, Shousha S, Youssef S. Hematobiochemical profile of pregnant and experimentally pregnancy toxemic goats. *J Basic and Appl Chem.* 2011;1(8):65-9.
13. González FHD, Hernández F, Madrid J, Martínez-Subiela S, Tvarijonavičiute A, Céron JJ, et al. Acute phase proteins in experimentally induced pregnancy toxemia in goats. *J Vet Diagn Invest.* 2011;23(1):57-62.
14. Jain NC. *Essentials of veterinary hematology.* Philadelphia: Lea and Febinger; 1993.
15. Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J.* 2004;168(1):28-40.
16. Murata H. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. *Vet J.* 2007;173(3):473-4.

17. Diegnan T, Alwan A, Kelly J, McNair J, Warren T, O'Farrelly C. Serum haptoglobin: an objective indicator of experimentally-induced Salmonella infection in calves. *Res Vet Sci.* 2000;69(2):153-8.
18. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 10th ed. Edinburgh: WB Saunders; 2007.
19. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 6th ed. San Diego: Academic Press; 2008.
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
21. Fagliari JJ, Silva SL. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hípidos e de equinos acometidos por abdômem agudo antes e após laparotomia. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2002;54(6):559-86.
22. Dirksen G, Grunder HD, Stober M. *Rosenberger: exame clínico dos bovinos.* 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.
23. Curi PR. *Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas.* Botucatu: Tipomic; 1997.
24. Carvalho CCD. *Indicadores preditivos para o diagnóstico e controle da toxemia da prenhez em ovelhas [tese].* Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2013.
25. Costa NA, Simão LCV, Santos RA, Afonso JAB, Fagliari JJ, Cardoso EC, et al. Proteinograma e teores de cobre, ferro e zinco no soro de ovelhas da raça Santa Inês com mastite experimental por *Staphylococcus aureus*. *Pesqui Vet Bras.* 2010;30(5):435-42.
26. Lemos VF. *Proteinograma do soro sanguíneo e lácteo de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes fases da lactação [dissertação].* Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2011.
27. Campos AGS. *Estudo hematológico e proteinograma sanguíneo e do colostro de ovelhas suplementadas com propilenoglicol e com cobalto associado à vitamina b12 e de suas respectivas crias [tese].* Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2014.
28. Bruére NA, West DM. *The sheep: health, disease and production.* Palmerston North, New Zealand: Massey University; 1993.
29. Rook JS. Pregnancy toxemia of ewes, does and beef cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2000;16(2):293-317.
30. Ametaj BN. A new understanding of the causes of fatty liver in dairy cows. *Adv Dairy Technol.* 2005;17:97-112.
31. El-Deeb WM. Novel biomarkers for pregnancy toxemia in ewes: acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines. *Open Access Sci Rep.* 2012;1(4):243.

32. Yoshino K, Katoh N, Takahashi K, Yuasa A. Possible involvement of protein kinase C with induction of haptoglobin in cows by treatment with dexamethasone and by starvation. *Am J Vet Res.* 1993;54(5):689-94.
33. Eckersall PD, Bell R. Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J.* 2010;185(1):23-7.
34. Gatzka C, Bremerich D, Kaufmann M, Ahr A. Isolated decrease in haptoglobin during pregnancy: diagnosis by chance or pathological? *Zentralbl Gynakol.* 2002;124(2):120-2.
35. Sordillo LM, Contreras GA, Aitken SL. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Rev.* 2009;10(1):53-63.
36. Yaqoob P, Calder PC. Fatty acids and immune functions: new insights into mechanisms. *Br J Nutr.* 2007;98 Suppl 1:S41-5.
37. Tothova C, Nagy O, Kovac G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Vet Med.* 2014;59(4):163-80.
38. Tothova CS, Nagy O, Kovac G. Changes in the concentrations of selected acute phase proteins and variables of energetic profile in dairy cows after parturition. *J Appl Anim Sci.* 2014;42(3):278-83. doi: 10.1080/09712119.2013.842485.
39. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 2005;88(6):2017-26.
40. Bastos BL. Cinética das proteínas de fase aguda durante a gestação e pós-parto de ovelhas da raça Santa Inês como ferramenta auxiliar no monitoramento da saúde gestacional [dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2008.
41. Azib DM, Taha MB. Effect of dystocias on serum haptoglobin in Awassi ewes. *Theriogenology.* 1997;48(4):559-62.
42. Akoum A, Lemay A, Brunet C, Hebert J. Cytokine-induced secretion of monocyte chemotactic protein-1 by human endometriotic cells in culture. *The Group d'Investigation en Gynecologie. Am J Obstet Gynecol.* 1995;172(2 Pt 1):594-600.
43. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005;308:1592-4.
44. Sacks G, Sargent I, Redman C. In innate view of human pregnancy. *Immunol Today.* 1999;20(3):114-8.
45. Sargent IL, Germain SJ, Sacks GP, Kumar S, Redman CW. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol.* 2003;59(2):153-60.
46. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(5):1582-8.

47. Berkova N, Lemay A, Dresser DW, Fontaine J, Kerizit J, Goupil, S. Haptoglobin is present in human endometrium and shows elevated levels in the decidua during pregnancy. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(8):747-54.
48. Fournier T, Medjoubi N, Porquet D. Alpha-1 acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1482(1-2):157-71.
49. Hochepped T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(1):25-34.
50. Saut JPE, Souza RM, Birgel DB, Pogliani FC, Cavalcante CZ, Miyashiro SI, et al. Influência do puerpério sobre o proteinograma sérico de caprinos da raça Saanen obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. *Semina Cienc Agrar.* 2009;30(3):661-70.
51. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft H, Dobson H. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet Rec.* 2001;148(6):172-5.
52. Tizard IR. *Imunologia veterinária: uma introdução.* 6a ed. Roca: São Paulo; 2002.
53. Wick M, Pinggera W, Lehmann P. *Ferritin im Eisenstoffwechsel – Diagnostische Strategien.* New York: Springer Verlag, Wien; 1991.
54. Weinberg ED. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol Rev.* 1984;64(1):65-102.
55. De Jong G, Van Dijk, JP, Van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta.* 1990;190(1-2):1-46.
56. Eckersall PD. Proteins, proteomics, and the dysproteinemia. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 6a ed. San Diego: Academic Press; 2008. p.117-55.
57. Moser M, Pfister H, Bruckmaier RM. Blood serum transferrin concentration in cattle in various physiological states, in veal calves fed different amounts of iron, and in cattle affected by infectious and non-infectious diseases. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1994;41(6):413-20.
58. Rocha TG. Eletroforetograma das proteínas do soro lácteo de vacas canchim primíparas e pluríparas. In: *Anais do 8o Congresso Brasileiro de Buiatria; 2009; Belo Horizonte.* Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira; 2009. Suplemento 1.
59. Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A. Effects of subclinical pregnancy toxemia on immune responses in sheep. *Am J Vet Res.* 2001;62(7):1020-4.
60. Hefnawy AE, Youssef S, Shousha S. Some immunohormonal changes in experimentally pregnant toxemic goats. *Vet Med Int.* 2010;2010:1-5.
61. Sartorelli P, Paltrinieri S, Agnes F. Non-specific immunity and ketone bodies. I: in vitro studies on chemotaxis and phagocytosis in ovine neutrophils. *J Vet Med.* 1999;46(10):613-9.

62. Ropstad E, Larsen HJ, Refsdal AO. Immune function in dairy cows related to energy balance and metabolic status in early lactation. *Acta Vet Scand.* 1989;30(2):209-19.
63. Cole DJ, Roussel AJ, Whitney MS. Interpreting a bovine CBC: evaluating the leukon and acute-phase proteins. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1997;92(5):470-8.
64. Borges NC, Vieira D, Silva LAF, Fioravanti MCS. Valores leucocitários e nível de fibrinogênio plasmático de bovinos com pododermatite. *Cienc Anim Bras.* 2006;7(1):97-102.
65. Cantley CEL, Ford CM, Heath MF. Serum fructosamine in ovine pregnancy toxemia: A possible prognostic index. *Vet Rec.* 1991;128(6):525-6.
66. Andrews AH, Holland-Howes VE, Wilkinson JID. Naturally occurring pregnancy toxemia in the ewe and treatment with recombinant bovine somatotropin. *Small Rumin Res.* 1996;23:191-7.
67. Van Saun RJ. Pregnancy toxemia in a flock of sheep. *J Am Vet Med Assoc.* 2000;21(10):1536-9.
68. Yarin GF, Ciftci G. Serum protein pattern in ewe with pregnancy toxemia. *Vet Res Commun.* 2009;33(5):431-8.
69. González F, Muiño R, Pereira V, Campos R, Castellote JLB. Indicadores sanguíneos de lipomobilização e função hepática no início da lactação em vacas leiteiras de alta produção. In: *Anais do 8o Congresso Brasileiro de Buiatria; 2009; Belo Horizonte. Cienc Anim Bras.* 2009; Supl 1:64-9.
70. Aldred AR, Schreiber G. The negative acute phase protein. In: Mackiewicz I, Kushner I, Baumann H. *Acute phase proteins. Molecular biology, biochemistry, and clinical applications.* Boca Raton, Florida; CRC Press; 1993. p.21-37.
71. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340(6):448-54.
72. Kincaid RL, White CL. The effects of ammonium tetrathiomolybdate intake of tissue copper and molybdenum in pregnant ewes and lambs. *Journal of Animal Science.* 1988;66(12):3252-8.
73. Chassagne M, Barnouin J, Chacornac JP. Biological predictors of early clinical mastitis occurrence in Holstein cows under field conditions in France. *Prev Vet Med.* 1998;35(1):29-38.
74. Fagliari JJ, Weiss DJ, McClenahan D, Evanson OA. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2003;55(4):383-7.
75. Nonnecke BJ, Franklin ST, Young JW. Effects of ketones, acetate, and glucose on in vitro immunoglobulin secretion by bovine lymphocytes. *J Dairy Sci.* 1992;75(4):982-90.

76. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical biochemistry of domestic animals. 5a ed. New York: Academic Press; 1997.
77. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med.* 2011;105(8):1129-39.

Recebido em: 11/08/2015

Aceito em: 02/12/2016

LEVANTAMENTO DA FAUNA DE MORCEGOS COM PESQUISA DO VÍRUS RÁBICO DOS MUNICÍPIOS DA 10ª REGIÃO ADMINISTRATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO, NO ANO DE 2013

Avelino Albas^{1*}
Luiza C. S. Rodenas¹
Cristiano de Carvalho²
Wagner A. Pedro²
Rogério Giuffrida³
Hermann B. Neto³

RESUMO

Os morcegos estão entre os vertebrados (mamíferos) que apresentam maior diversidade no mundo e estima-se que representem cerca de um quarto de toda a fauna brasileira. Apresentam grande importância biológica e para a saúde pública, pois são reservatórios e transmissores de diversas bactérias, fungos e vírus. Os morcegos urbanos são favorecidos por encontrar facilidade na captura de alimento nas cidades. Com frequência utilizam abrigos diurnos próximos às pessoas ou animais e essa proximidade pode ocasionar a transmissão de diversas enfermidades, e dentre elas a raiva. Essa doença é uma zoonose causada pela penetração do vírus contido na saliva do animal infectado. O objetivo do presente estudo é a classificação dos morcegos recolhidos por meio das Unidades Básicas de Saúde (UBS) e Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) dos municípios da 10ª região administrativa do Estado de São Paulo, com a finalidade de melhor conhecer toda a fauna regional e pesquisar possíveis amostras contaminadas com o vírus rábico. Sendo assim, foram classificadas 178 amostras de morcegos no ano de 2013, provenientes de 19 municípios. A pesquisa revelou somente um caso positivo no município de Presidente Prudente, SP, sendo que a amostra foi referente a um morcego frugívoro da espécie *Artibeus lituratus*, pertencente à família Phyllostomidae. Na classificação dos quirópteros foram identificadas três famílias de morcegos: Molossidae (n=147), Phyllostomidae (n=12) e Vespertilionidae (n=19). Dentro dessas famílias, foram identificadas 13 espécies, e dessas 93,0% apresentam hábito alimentar insetívoro e 6,7% hábito alimentar frugívoro. Quanto ao tamanho, 48,9% dos morcegos eram pequenos com antebraço menor que 45 mm, 29,8% com antebraço entre 45 e 60 mm e 21,3% dos morcegos apresentavam antebraço maior que 60 mm. O estudo pode contribuir para o conhecimento da diversidade de morcegos e a epidemiologia da raiva na região, alertando os órgãos responsáveis pelo controle desta zoonose com relação à circulação do vírus.

Palavras-chave: morcego, vírus da raiva, Região Sudeste do Brasil, diversidade, zoonoses.

STUDY OF THE BAT FAUNA AND RABIES VIRUS RESEARCH OF CITIES OF ADMINISTRATIVE REGION OF THE 10th SÃO PAULO STATE, IN 2013 YEAR

ABSTRACT

Bats are among vertebrates (mammals) with the greatest diversity in the world and is estimated to represent about a quarter of all Brazilian fauna. They have great biological and public health importance because they are reservoirs and transmitters of various bacteria,

¹ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Polo Alta Sorocabana, Presidente Prudente, SP.

² Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista, Campus Araçatuba, SP.

³ Universidade do Oeste Paulista de Presidente Prudente (UNOESTE).

* Correspondência: avealbas@yahoo.com.br

fungi and viruses. Urban bats are favored by finding ease in food collection in the cities. Often using daytime shelters near people or animals and this proximity can lead to the transmission of various diseases, and the rabies among them. This disease is a zoonosis caused by the penetration of the virus contained in the saliva of the infected animal. The aim of this study is the classification of bats sampled by the Basic Health Units (BHU) and Zoonoses Control Centers (ZCC) of the cities of the 10th administrative region of São Paulo, Brazil, in order to better fauna knowledge regional and search possible samples infected with the rabies virus. Thus, we classified 178 samples of bats in 2013 from 19 cities. The research revealed only one positive case in the city of Presidente Prudente, SP, and the sample was referring to a fruit bat species *Artibeus lituratus* belonging to Phyllostomidae family. In the classification of bats were identified three families of bats: Molossidae (n=147), Phyllostomidae (n=12) and Vespertilionidae (n=19). Within these families, 13 species were identified, and these 93.3% had insectivore feeding habit and 6.7% frugivorous feeding habits. Also, 48.9% of the small bats had less than 45 mm forearm, 29.8% had forearm between 45 and 60 mm and 21.3% these bats had greater than 60 mm forearm. The study may contribute to the knowledge of the diversity of bats and rabies epidemiology in the region, prompting the responsible organs for control of this zoonosis because the virus is circulating in the region.

Keywords: bats, rabies vírus, fauna, zoonosis.

ESTUDIO DE LA FAUNA DE MURCIÉLAGOS CON PESQUISA DEL VIRUS DE LA RABIA DE LOS MUNICIPIOS DE LA 10^a REGIÓN ADMINISTRATIVA EN EL ESTADO DE SAO PAULO, EN EL AÑO 2013

RESUMEN

Los murciélagos son entre los vertebrados (mamíferos) esos ellos presentan mayor diversidad en el mundo y son la estima que representan cerca de un sitio de toda la fauna brasileña. Presentan gran importancia biológica y para la salud pública, por lo tanto están transmitiendo depósitos de las diversas bacterias, hongos y del virus rábico. Los murciélagos urbanos son favorecidos encontrando sencillez en la captura del alimento en las ciudades. Con frecuencia utilizan los abrigos siguientes del diurne a la gente o los animales y esta proximidad pueden causar la transmisión de enfermedades diversas, y entre ellas la rabia. Esta enfermedad es una zoonose causado por la penetración del virus contenido en la saliva del animal infectado. El objetivo de actual estudio es la clasificación de los murciélagos recogidos por medio de las Unidades Básicas de los Centros de Saúde (UBS) y de Control de las Zoonosis (CZ) de las ciudades de la 10^a región administrativa del Estado de São Paulo, con el propósito de un conocimiento mejor de la fauna regional y buscar las muestras posibles contaminadas con el virus rábico. Siendo así, 178 muestras de murciélagos en el año de 2013, procediendo de 19 ciudades. La investigación divulgó solamente un caso positivo en la ciudad de Presidente Prudente, SP, siendo que la muestra refería a un frugívoro del murciélago de la especie de *Artibeus lituratus*, referente a la familia de Phyllostomidae. En la clasificación de los quirópteros tres familias habían sido identificadas: Molossidae (n=147), Phyllostomidae (n=12) y Vespertilionidae (n=19). Dentro de estas familias, 13 especies habían sido identificadas, y de estos 93.3% había presentado insetívoro alimenticio del hábito y 6.7% frugívoro alimenticio del hábito. E, 48.9% de los murciélagos también había sido pequeña con antebraço menos que 45 milímetros, 29.8% con antebraço entre 45 y 60 milímetros y 21.3% de los murciélagos habían tenido antebraço más grande que 60 milímetro. El estudio que puede contribuir para el conocimiento de la diversidad de murciélagos y del epidemiologia de

la rabia en la región, alertando las agencias responsables para el control de este zoonose con respecto a la circulación del virus.

Palabras clave: murciélagos, vírus de la rabia, fauna, zoonosis.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose característica dos mamíferos e possui ampla distribuição geográfica mundial. Entre os mamíferos, os carnívoros e os morcegos são considerados os principais agentes transmissores da raiva. O morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) tem importante papel como reservatório e agente transmissor. Porém, o vírus da raiva tem sido isolado de várias outras espécies não hematófagas, principalmente no Estado de São Paulo (1,2,3,4).

O laboratório do Polo da Alta Sorocabana, Presidente Prudente, SP, foi credenciado pelo Ministério da Saúde em 1995 para realização do diagnóstico laboratorial da raiva. A partir desse período vem desenvolvendo estudos (3,5) sobre a ecologia e epidemiologia desta zoonose na região oeste do Estado de São Paulo.

Taddei (6) realizou estudos da sistemática dos quirópteros e associou espécies positivas para raiva com determinados hábitos de vida. Uma lista de 41 espécies de morcegos positivos para raiva no Brasil foi apresentada por Sodré (25), e contém representantes das famílias Phyllostomidae (N=18), Vespertilionidae (N=12) e Molossidae (N=11). Os quirópteros fazem parte do grupo de mamíferos mais diversificados do mundo com dezoito famílias, 202 gêneros e 1120 espécies e apresentam hábitos alimentares bem diversificados (7).

As cidades se tornaram atrativas aos morcegos devido aos abrigos artificiais, e são beneficiados devido à iluminação que é atrativa aos insetos, bem como a arborização que favorece os morcegos fitófagos (8). Os morcegos desempenham uma grande importância biológica envolvendo a dispersão de sementes e como controladores de insetos. Possuem também, uma grande utilidade para o homem, servindo como material de pesquisa na medicina, em estudos epidemiológicos, farmacológicos, de mecanismos de resistência a doenças e no desenvolvimento de vacinas (9).

Apesar de vários trabalhos realizados na região sobre o vírus rábico, pouco se conhece sobre a fauna dos morcegos. O conhecimento sobre os morcegos pode auxiliar as pesquisas em diversas áreas, tais como: na agronomia, estudo do guano e auxilia no processo de fabricação de fertilizantes (7). Além de ser de extrema importância nas pesquisas relacionadas às áreas da saúde, pois são reservatórios e transmissores de diversos vírus, fungos e bactérias, e também, apresentam anticorpos para diversas enfermidades.

O objetivo do presente estudo foi realizar a identificação e classificação dos morcegos recolhidos por meio das Unidades Básicas de Saúde (UBS) e Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) com a finalidade de um maior conhecimento sobre a fauna regional e possíveis espécies contendo o vírus da raiva no ano de 2013.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do Experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Sanidade Animal do Polo Regional Alta Sorocabana da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), localizado no município de Presidente Prudente, SP sob a orientação do Pesquisador Científico Dr. Avelino Albas. E também, no Laboratório de Biofísica da Unoeste (Universidade do Oeste Paulista), localizado no Campus I sob a supervisão do Prof. Dr. Hermann Bremer Neto. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 2078, em 2014.

Amostras de morcegos

Foi utilizado para esse estudo, um total de 178 exemplares de morcegos que foram encaminhados ao laboratório da APTA no ano de 2013. Os morcegos foram encaminhados ao laboratório, principalmente, por meio das Unidades Básicas de Saúde ou Centros de Controle de Zoonoses dos municípios que compõem a 10ª Região Administrativa do Estado de São Paulo, região oeste paulista. A coleta dos morcegos foi passiva, uma vez que os agentes municipais de saúde, a pedido dos munícipes, foram buscar os animais que geralmente estavam caídos no chão dos quintais das casas. Os animais recolhidos foram enviados ao laboratório da APTA (todos os morcegos encaminhados ao laboratório, chegaram mortos e armazenados em isopor e devidamente refrigerados) para pesquisa do vírus rábico e posteriormente mantidos sob temperatura de -20°C para posterior classificação e identificação das espécies.

Abrangência do estudo

No ano de 2013, 19 municípios (Presidente Prudente, Dracena, Osvaldo Cruz, Rancharia, Alfredo Marcondes, Presidente Bernardes, Rosana, Panorama, Álvares Machado, Junqueirópolis, Parapuã, Martinópolis, Nantes, Iepê, Ouro Verde, Santo Anastácio, São João do Pau D'alto, Santa Mercedes e Emilianópolis) enviaram amostras de morcegos para diagnóstico laboratorial de raiva e posterior classificação e identificação (Fig. 1).

Diagnóstico Laboratorial da Raiva

Foram recebidas 178 amostras de morcegos pelo laboratório e foram extraídas amostras de tecido cerebral que foram submetidas à prova de imunofluorescência direta (IFD), conforme descrito por Dean (10), e à prova biológica com inoculação em camundongo, de acordo com o método preconizado por Koprowski (11). Os camundongos empregados foram albinos suíços de 21 dias de idade, com peso entre 12 e 14g, oriundos do biotério da APTA, e foram inoculados com volume de 0,03mL por via intracerebral. Utilizou-se de grupos com cinco animais por amostra. Durante trinta dias foram feitas observações diárias dos camundongos e aqueles que foram a óbito durante o período de observação, tiveram seu cérebro extraído e submetido ao teste de IFD para confirmação do diagnóstico.

Identificação de Espécies

Para a classificação foram utilizadas algumas chaves dicotômicas, sendo analisadas algumas características externas e morfométricas, tais como: tamanho de antebraço, cabeça-corpo, orelha, membrana interfemural, arcada dentária, cor de pêlo, presença ou não de apêndice nasal e de outras estruturas que possam distinguir cada espécie (6,7,12). O material classificado foi devidamente enumerado e congelado em freezer -20°C no Laboratório de Sanidade Animal do Polo Regional Alta Sorocabana da APTA, para pesquisas posteriores.

Análise Estatística

Para verificar se as proporções de machos e fêmeas e de espécies insetívoras e frugívoras recolhidas, diferiram entre si, foi utilizado o teste de qui-quadrado para proporções iguais, com aplicação da correção de Yates. As medidas de antebraço dos morcegos capturados foram transformados em escores (< 45 mm = escore 1; 45-60 mm = escore 2; >60 mm = escore 3). Para determinar se o porte dos morcegos diferiu entre as famílias pesquisadas

recorreu-se ao teste não paramétrico de Kurkall-Wallis, com contrastes pelo método de Student-Newman-Keuls. Todas as análises foram conduzidas no software Biostat 5.0, com 5% de nível de significância (13).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Laboratório de Sanidade Animal do Polo Regional Alta Sorocabana da (APTA), recebeu 178 amostras de morcegos no ano de 2013. Eles chegaram ao laboratório, principalmente por meio das Unidades Básicas de Saúde ou Centros de Controle de Zoonoses de 19 municípios que estão representados na Figura 1.

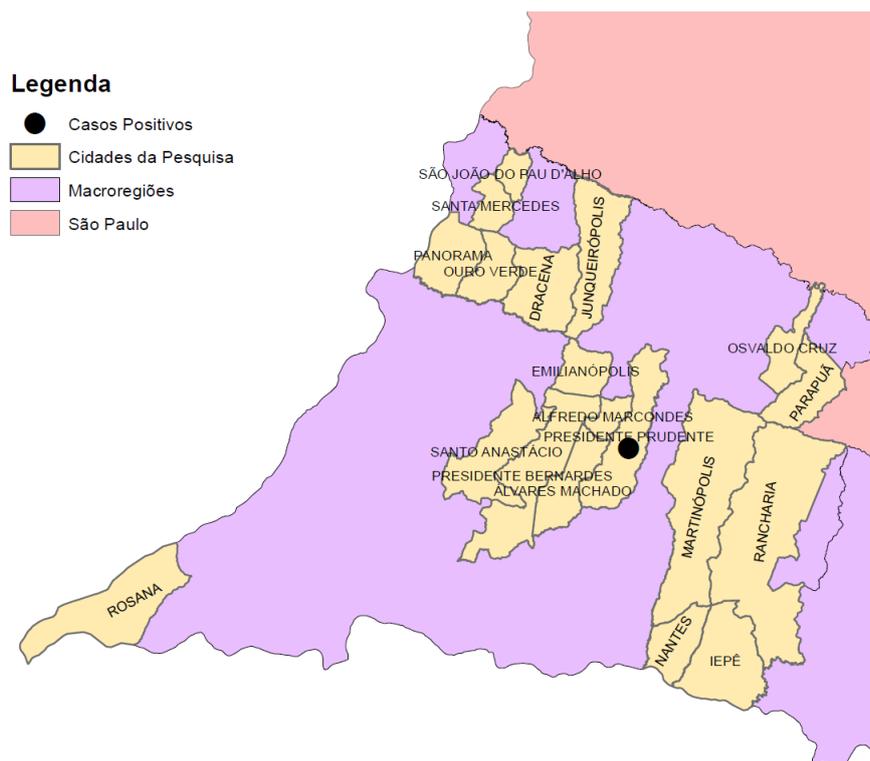


Figura 1. Mapa dos municípios que enviaram espécies de morcegos para diagnóstico laboratorial da raiva no ano de 2013.

A pesquisa do vírus da raiva em 178 amostras revelou somente um caso positivo no município de Presidente Prudente, sendo que a amostra foi de um morcego frugívoro da espécie *Artibeus lituratus*, pertencente à família Phyllostomidae, que está representado na Tabela 1.

Tabela 1. Número e frequência de espécies de morcegos da região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo, classificados e submetidos ao diagnóstico laboratorial da raiva no ano de 2013.

Espécie	Negativos	Positivos	Nº(%)
Família Molossidae			
<i>Eumops glaucinus</i>	22		22(12,3)
<i>Eumops perotis</i>	4		4(2,25)
<i>Molossus molossus</i>	69		69(38,8)
<i>Molossus rufus</i>	49		49(27,5)
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	1		1(0,56)
<i>Nyctinomops macrotis</i>	1		1(0,56)
<i>Tadarida brasiliensis</i>	1		1(0,56)
Família Phyllostomidae			
<i>Artibeus lituratus</i>	10	1	11(6,2)
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	1		1(0,56)
Família Vespertilionidae			
<i>Eptesicus furinalis</i>	3		3(1,7)
<i>Lasiurus blossevillii</i>	3		3(1,7)
<i>Lasiurus ega</i>	3		3(1,7)
<i>Myotis nigricans</i>	10		10(5,6)
Total	177 (99,4%)	1 (0,56%)	178(100%)

Dentre as espécies enviadas, foram registradas três famílias de quirópteros, destacando-se a família Molossidae (n= 147), Phyllostomidae (n= 12) e Vespertilionidae (n=19). (Fig. 2).

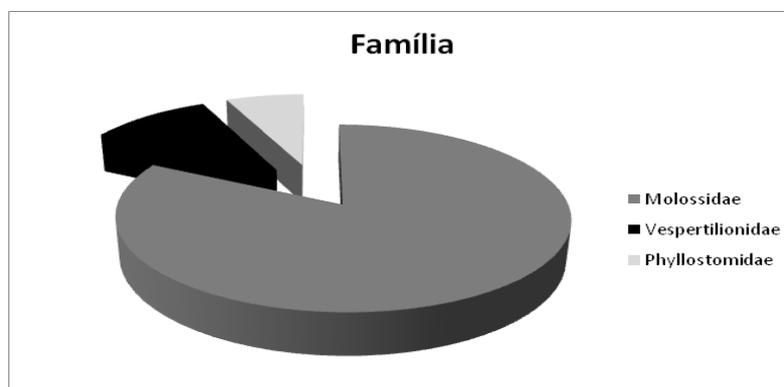


Figura 2. Frequência das famílias de morcegos encaminhados para diagnóstico laboratorial da raiva, pelas Unidades Básicas de Saúde e Centros de Controle de Zoonoses da 10ª região administrativa do Estado de São Paulo, no ano de 2013.

Comparando-se as famílias em função do porte dos animais e mensurando o tamanho do antebraço em milímetros, percebeu-se que os morcegos da família Molossidae tem a predominância do tamanho do antebraço <45 mm; a família Phyllostomidae tem a predominância do tamanho do antebraço > 60 mm e a família Vespertilionidae tem a predominância do tamanho do antebraço <45 mm, isso diferiu estatisticamente entre as três famílias de morcegos recolhidos ($H=28,9$, $p < 0,0001$).

Tabela 2 – Escores de porte com base no tamanho do antebraço de morcegos, mensurados em milímetros, recolhidos em Unidades Básicas de Saúde e Centros de Controle de Zoonoses na 10ª região administrativa do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, 2013 (N=178).

Família	Escore			Total
	< 45	45-60	> 60	
Molossidae*	71	49	27	147
Phyllostomidae**	0	1	11	12
Vespertilionidae	16	3	0	19
Total	87	53	38	178

* diferenças significativas com relação às famílias Phyllostomidae ($p < 0,0001$) e Vespertilionidae ($p=0,0422$);

** diferença estatística significativa com relação à família Vespertilionidae ($p < 0,0001$).

Caracterizou-se como predominante e estatisticamente significativo a frequência de morcegos com hábito alimentar insetívoros ($n=93,26\%$) com tamanho do antebraço <45 mm ($n= 48,88\%$), relacionando o seu hábito alimentar e tamanho considerando o comprimento do antebraço, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição em número e frequências das espécies de morcegos encaminhados para diagnóstico laboratorial da raiva utilizando-se as variáveis: comprimento do antebraço (An) e hábito alimentar, no ano de 2013.

An(mm)	Insetívoro	Frugívoro	Nº (%)
< 45	<i>M. molossus</i>		69 (38, 8%)
	<i>N. laticaudatus</i>		1 (0, 56%)
	<i>T.brasiliensis</i>		1 (0, 56%)
	<i>E. furinalis</i>		3 (1, 7%)
	<i>L. blossevillii</i>		3 (1, 7%)
	<i>M. nigricans</i>		10 (5, 6%)
45 - 60	<i>M. rufus</i>		49 (27, 51 %)
		<i>P. lineatus</i>	1(0, 56%)
		<i>L.ega</i>	3 (1, 7%)
>60	<i>E. glaucinus</i>		22 (12, 3%)
		<i>A. lituratus</i>	11(6, 2%)
	<i>E. perotis</i>		4 (2, 25%)
	<i>N. macrotis</i>		1(0, 56%)
	Total	166 (93, 26%)^A	12 (6, 74%)^B

Resultados expressos como frequência. Letras distintas sobrescritas indicam diferença estatística significativa pelo teste de χ^2 ($\chi^2= 131.511$, $p < 0,0001$).

Comparando a quantidade de machos e fêmeas, foi constatada uma predominância de 8 (4,56%) machos a mais que fêmeas, porém, não sem diferença significativa ($P>0,05$).

Tabela 4. Número e frequência de espécies de morcegos da região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo, classificados e separados por macho e fêmea.

Espécie	Macho	Fêmea	N(%)
Família Molossidae			
<i>Eumops glaucinus</i>	4 (2,24 %)	18 (10,06%)	22(12,3%)
<i>Eumops perotis</i>	0 (0%)	4 (2,25%)	4 (2,25)
<i>Molossus molossus</i>	39 (21,93%)	30 (16,9%)	69(38,8)
<i>Molossus rufus</i>	32 (18%)	17 (9,5%)	49(27,5)
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	1 (0,56%)	0 (0%)	1 (0,56)
<i>Nyctinomops macrotis</i>	1 (0,56%)	0 (0%)	1 (0,56)
<i>Tadarida brasiliensis</i>	0 (0%)	1 (0,56%)	1 (0,56)
Família Phyllostomidae			
<i>Artibeus lituratus</i>	4 (2,25%)	7 (3,95%)	11(6,2)
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	0 (0%)	1 (0,56%)	1 (0,56)
Família Vespertilionidae			
<i>Eptesius furinalis</i>	1 (0,56%)	2 (1,14%)	3 (1,7)
<i>Lasiurus blossevillii</i>	2 (1,14%)	1 (0,56%)	3 (1,7)
<i>Lasiurus ega</i>	1 (0,56%)	2 (1,14%)	3 (1,7)
<i>Myotis nigricans</i>	8 (4,48%)	2 (1,12%)	10 (5,6)
Total	93(52,28%)	85(47,72%)	178(100%)

*Estatisticamente as proporções de machos e fêmeas recolhidos não diferiram entre si ($\chi^2=0,275$, $p=0,5998$).

Nos últimos anos, na região de Presidente Prudente, SP, não houve relato de raiva humana, sendo que o último caso foi registrado no ano de 2001 com a morte de uma senhora no município de Dracena - SP, e também não tem havido relato de casos positivos em cães e gatos. Entretanto, o vírus continua circulando pela região, sendo que de 2006 a 2008 foram relatados 11 casos de morcegos positivos para a raiva e 16 casos em bovino no período de 1996 a 2003 (3,5).

Segundo Carvalho et al. (14), a fauna de morcegos urbanos na região noroeste do Estado de São Paulo apresentou predominância de morcegos da família Molossidae (n= 646), Phyllostomidae (n=112) e a Vespertilionidae (n= 61), diferente dos resultados encontrados neste estudo que mostra uma predominância da família Molossidae, um baixo número de exemplares das famílias Vespertilionidae e Phyllostomidae.

Albas et al. (5), realizaram levantamento das espécies de morcegos encaminhados para diagnóstico laboratorial da raiva no período de 2006 a 2008, e concluíram que a maioria pertencia à família Molossidae, num total de 901(80,9%) exemplares e destes, 403 (44,3%) foram identificados como *Molossus molossus* 498 (55,7%) como *Molossus rufus*. Esses resultados apresentaram semelhança com os encontrados no presente estudo em termos percentuais, 147(82,6%) pertencentes à família molossidae, sendo 69(38,8%) *Molossus molossus* 49(27,5%) *Molossus rufus*.

Albas A, Rodenas LCS, Carvalho C, Pedro WA, Giuffrida R, Neto HB. Levantamento da fauna de morcegos com pesquisa do vírus rábico dos municípios da 10ª região administrativa do estado de São Paulo, no ano de 2013. Vet. e Zootec. 2017 mar.; 24(1): 174-183.

Souza et al. (15), encontraram predominância em morcegos de hábito alimentar frugívoro (44,79%), nectarívoro (27,52%) e insetívoro (27,35%), resultado diferente do encontrado no presente trabalho, que detectou uma predominância de morcegos insetívoros (93,26%) e frugívoro apenas 6,74%; não sendo encontrados morcegos nectarívoros.

A grande maioria dos morcegos submetidos ao exame de raiva era do gênero *Molossus* (76,2%), sendo que as duas principais espécies são frequentemente encontradas em edificações em áreas urbanas no Brasil (8). A alta incidência de molossídeos no presente estudo é consequência direta da metodologia de amostragem, que foi realizada de forma passiva, quando a população do Oeste Paulista solicitou a coleta de morcegos pelos agentes municipais de saúde. Diversos estudos no Brasil têm mostrado resultados semelhantes (3,5,8,16).

Os resultados deste trabalho permitem concluir que a família Molossidae apresentou a maior frequência de animais coletados na 10^a região administrativa do Estado de São Paulo, Brasil, no ano de 2013 e nenhum exemplar foi positivo para a raiva. O único animal positivo no teste de imunofluorescência direta e prova biológica foi um morcego da família Phyllostomidae com hábito alimentar frugívoro. Grande parte dos quirópteros classificados no trabalho são de hábito alimentar insetívoro e são morcegos de pequeno porte. Os resultados não revelaram diferença significativa em relação ao sexo dos animais coletados. O estudo pode contribuir para o conhecimento da diversidade dos morcegos e a epidemiologia da raiva, alertando assim, os órgãos oficiais que controlam esta zoonose, da presença do vírus rábico em circulação na região em estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Suporte Financeiro: FAPESP (Processos n^os.: 2012-02103-9 e 2012-03482-3).

REFERÊNCIAS

1. Martorelli LFA, Aguiar EAC, Almeida MF, Silva MMS, Nunes VFP. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro *Lasiurus borealis*. Rev Saude Publica. 1996;30(1):101-2.
2. Uieda W, Hayashi MM, Gomes LH, Silva MMS. Espécies de quirópteros diagnosticadas com raiva no Brasil. Bol Inst Pasteur. 1996;1(2):17-36.
3. Albas A, Zoccolaro PT, Rosa TZ, Cunha EMS. Diagnóstico laboratorial da raiva na região oeste do Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(6):493-5.
4. Sodré MM, Gama AR, Almeida MF. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2010;52(2):75-81.
5. Albas A, Souza EAN, Picolo MR, Favoretto SR, Gama AR, Sodré MM. Os morcegos e a raiva na região oeste de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;4(2):201-5.
6. Taddei VA. Sistemática de Quirópteros. Bol Inst Pasteur. 1996;1(2):3-15.
7. Reis RR, Shibatta AO, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Sobre os morcegos brasileiros. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Morcegos do Brasil. 1a ed. Londrina: UEL; 2007. p.17-26.

8. Bredt A, Araujo FAA, Junior JC. Noções gerais sobre morcegos. In: Bredt A, Araujo FAA, Junior JC. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. 1a ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1998. p.9-22.
9. Yalden D, Morris PA. The lives of bats. 1a ed. London: Red Wood Burn; 1975.
10. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneve: World Health Organization; 1996. p.88-95.
11. Koprowski H. Routine laboratory procedures: the mouse inoculation test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneve: World Health Organization; 1996. p.80-87.
12. Uieda W, Chaves M, Santos C. Guia das principais espécies de morcegos brasileiros. 1a ed. Botucatu: 2008.
13. Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AS. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT, IDSM, CNPq; 2007.
14. Carvalho C, Gonçalves JF, Franco R, Casagrande DKA, Pedro WA, Queiroz LH. Caracterização da fauna de morcegos (mammalia, chiroptera) e ocorrência de vírus rábico na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. Vet Zootec. 2011;18(3):490-503.
15. Souza LC, Langoni H, Silva RC, Lucheis SB. Vigilância epidemiológica da raiva na região de Botucatu-SP: importância dos quirópteros na manutenção do vírus na natureza. ARS Vet. 2005;21(1):62-8.
16. Chaves ME, Sodré MM. Manejo de morcegos em áreas urbanas. 1a ed. Piracicaba: CP 2; 2007. p.139-44.

Recebido em: 29/11/2015

Aceito em: 05/12/2016

ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DE FÍGADOS BOVINOS CRIADOS NA ILHA DE MARAJÓ, ESTADO DO PARÁ, CONDENADOS PELO SERVIÇO DE INSPEÇÃO ESTADUAL

Djacy Barbosa Ribeiro¹

Rogério Tortelly²

Washington Luiz Assunção Pereira¹

Suellen da Gama Barbosa Monger^{1*}

Ana Sílvia Sardinha Ribeiro¹

RESUMO

Estudos anatomopatológicos de fígado de bovinos são importantes pelo fato da víscera ser muito apreciada para consumo humano, assim como, pela sua relação com as zoonoses. Objetivou-se avaliar as alterações macro e microscópicas de fígados bovinos, oriundos da Ilha de Marajó, Estado do Pará, abatidos para consumo com inspeção estadual. Foram examinados 189 fígados, pelo Serviço de Inspeção Estadual (SIE), oriundos de duas microrregiões da Ilha: Chaves (n=93), Cachoeira do Arari (n=96). Os dados relacionados aos animais, procedência, identificação, espécie e inspeção *post mortem* foram levantados com o SIE. Todos os fígados analisados foram considerados unidades experimentais. Nos resultados houve alteração em 29,64% dos fígados analisados, representadas por telangiectasia, esteatose, abscesso, cirrose, tuberculose e peri-hepatite. Estes achados foram superiores ao encontrado na literatura, sugerindo que os animais do estudo estão mais acometidos por problemas hepáticos que levam às condenações do órgão em virtude das condições adversas de manejo e meio ambiente. A telangiectasia foi a causa principal de condenação de fígados (13,23%), mas a tuberculose representada por 1,59% merece ser ressaltada por ser zoonose importante. Não houve diferenças significativas das alterações hepáticas em relação à procedência dos animais, mostrando certa semelhança com relação à epidemiologia das alterações.

Palavras-chave: bovino, fígado, patologia, inspeção, Ilha de Marajó.

ASPECTS OF ANATOMOPATHOLOGY OF LIVER CATTLE RAISED ON MARAJO ISLAND, PARA STATE, CONDEMNED BY STATE INSPECTION SERVICE

ABSTRACT

Studies involving pathological aspects of bovine livers demonstrate their importance, because visceral be highly appreciated for human consumption. This study aims to examine the macro and microscopic alterations of bovine livers, coming from Marajo Island, Pará State, slaughtered for consumption. We examined 189 cattle livers from three microregions of Marajo: Clark Waterfall Arari and Salvaterra, sites with greater frequency in the slaughterhouse for slaughter fridge where the study was conducted. The data related to animals, origin, identification, post mortem inspection and species were collected from the SIE. All livers of slaughtered animals from the two areas concerned were considered experimental units. The results showed that there were changes in 29,64% of livers analyzed, represented by abscess, cirrhosis, steatosis, tuberculosis, hepatitis and peri-telangiectasia.

¹ Universidade Federal Rural da Amazônia

² Universidade Federal Fluminense

* Contato para correspondência: suellenmonger@veterinaria.med.br

These findings were superior to that found in the literature, suggesting that the study animals are more affected by liver problems that lead to convictions in court, because of adverse conditions and environment management. Telangiectasia was the leading cause of liver condemnation (13,23%), but the tuberculosis lesions represented by 1,59% of the convictions stood out because they were superior to that found in the literature.

Keywords: bovine, liver, pathology, inspection, Marajo Island.

CARACTERÍSTICAS ANATOMO PATOLOGICAS DE LOS HÍGADOS DE BOVINOS CRIADOS EN LA ISLA DE MARAJÓ, ESTADO DE PARÁ, CONDENADOS POR EL SERVICIO DE INSPECCIÓN DEL ESTADO

RESUMEN

Estudios patológicos de hígado bovino son importantes porque son las vísceras muy apreciadas para el consumo humano, así como su relación con las zoonosis. El objetivo fue evaluar los cambios macro y microscópicos de los hígados de bovinos, procedentes de la isla de Marajó, estado de Pará, sacrificados para el consumo con la inspección estatal. 189 hígados fueron examinados por el Servicio de Inspección de Estado (SIE), a partir de dos microislas: Chaves (n = 93), Cachoeira do Arari (n = 96). Los datos relativos a los animales, el origen, la identificación, la especie, y la inspección post mortem se han planteado con el SIE. Todos los hígados analizados se consideraron unidades experimentales. En los resultados hubo cambios en 29,64% de los hígados analizados, representada por telangiectasia, esteatosis, absceso, cirrosis, tuberculosis y perihepatitis. Estos resultados fueron superiores a la encontrada en la literatura, lo que sugiere que los animales del estudio son las más afectadas por los problemas hepáticos que conducen a condenas de órganos debido a condiciones adversas de manejo y el medio ambiente. La telangiectasia era la principal causa de la condenación del hígado (13,23%), pero la tuberculosis representa 1,59% merece ser destacada porque es importante zoonosis. No hubo diferencias significativas en los cambios de hígado de origen de los animales, que muestra una cierta semejanza con la epidemiología de cambios.

Palabras clave: bovino, hígado, patología, inspección, Isla de Marajó.

INTRODUÇÃO

O sistema de produção de carne de bovinos criados na Ilha de Marajó, Estado do Pará, constitui a principal atividade econômica da região, contribuindo ativamente para o abastecimento de carne dos mercados da grande Belém, capital do Estado do Pará e de Macapá, capital do Estado do Amapá.

A bovinocultura de corte na Ilha de Marajó tem sistema totalmente extensivo, sendo os animais criados em grandes áreas de pastagem nativa. A produção de bovídeos na Ilha de Marajo apresenta limitações naturais, visto que, no período de seca, as pastagens além de fracas desaparecem em algumas áreas e a água dos bebedouros se torna de difícil acesso, já na estação das chuvas a inundação limita as pastagens de algumas áreas reduzindo-as (1).

O fígado é um órgão especial, pelo grande valor nutritivo e que agrega valor comercial. Deve ser ressaltada a notável função metabólica, hemostática desse órgão e que faz com que esteja envolvido em vários processos patológicos. As condenações dessa víscera destinada ao consumo humano são importantes para a saúde pública, pois muitas das alterações hepáticas apresentam caráter zoonótico (2).

Estudos envolvendo aspectos anatomopatológicos de fígado de bovinos demonstram sua importância, não somente pelo fato da víscera ser muito apreciada no consumo humano, mas

também pela importância epidemiológica e de saúde pública acerca do assunto nessa espécie como patologia regional. Sendo assim, o presente estudo objetiva analisar as alterações macro e microscópicas de fígados bovinos, oriundos da Ilha de Marajó, Estado do Pará, abatidos para consumo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados fígados bovinos independente do sexo e idade, oriundos de duas microrregiões da Ilha de Marajó: Chaves e Cachoeira do Arari, correspondendo às localizações norte e sudeste da Ilha.

A escolha das microrregiões corresponde a dois ecossistemas diferentes dentro da ilha, e de regiões que mantém a maior frequência de abate no matadouro frigorífico onde foi desenvolvido o estudo.

Os dados foram coletados em matadouro frigorífico localizado na região Metropolitana de Belém, registrado e fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Estadual (SIE) da Agência de Defesa Agropecuária de Estado do Pará (ADEPARÁ). Neste estabelecimento, são abatidos animais de produtores que em sua maioria são oriundos da Ilha de Marajó. Os dados relacionados aos animais, tais como: procedência, identificação, espécie e da inspeção *post mortem* foram levantados com o SIE, registrados em fichas individuais.

Todos os animais foram considerados unidades experimentais. A amostragem na linha E de inspeção *post mortem* foi sequencial, na ordem de entrada, portanto aleatória.

Primeiramente, os fígados foram inspecionados macroscopicamente na linha de inspeção *post mortem* (3). A avaliação e planificação foram feitas somente nos órgãos com condenações totais ou parciais na inspeção. Desses casos foram coletadas amostras das lesões, para confirmação histopatológica diagnóstica, diferencial ou complementar.

Para a análise histopatológica, fragmentos com cerca de 0,5 cm de espessura foram coletados das áreas com alterações mais evidentes. As amostras foram acondicionadas em frascos de plástico identificados, contendo formol tamponado a 10%. Caso não houvesse alteração a peça somente era catalogada. As coletas foram realizadas nos meses de dezembro de 2010 a fevereiro de 2011.

O material foi processado pelas técnicas habituais para inclusão em parafina, corado por hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise em microscopia ótica.

Os procedimentos técnicos de processamento histopatológico foram realizados no Laboratório de Patologia Animal (LABOPAT) do Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA), da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos (espécie) e as repetições por tratamento. Os dados foram planejados e avaliados quanto à estatística descritiva pelo programa SAS, comparando-se os dados mediante análise de variância (ANOVA) e as médias através do teste 't', considerando significativo $p < 0,0001$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 189 fígados estudados, 29,64% (n=56) apresentaram algum tipo de alteração (Tabela 1).

Tabela 1. Fígados bovinos condenados pelo SIE-PA oriundos da Ilha de Marajó. 2010-2011

ALTERAÇÕES HEPÁTICAS	CACHOEIRA DO ARARI		CHAVES		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Abscesso	05	5,38 ^a	06	6,25 ^a	11	5,82 ^a
Cirrose	00	0,00 ^a	01	1,04 ^a	01	0,53 ^a
Esteatose	05	5,38 ^a	07	7,29 ^a	12	6,35 ^a
Tuberculose	01	1,08 ^a	02	2,08 ^a	03	1,59 ^a
Telangiectasia	12	12,90 ^b	13	13,54 ^b	25	13,23 ^b
Periepatite	03	3,23 ^a	01	1,05 ^a	04	2,13 ^a
TOTAL	26	27,97	30	31,25	56	29,65

Letras minúsculas diferentes em linhas e colunas diferem entre si ($p < 0.0001$)

O total geral de condenação de fígados bovinos foi superior à média encontrada na literatura, e que possivelmente, é favorecido pelas condições adversas de manejo e de meio ambiente onde os animais são criados. A média geral de patologias hepáticas encontrada na literatura foi de 6,25%. Resultados de estudos envolvendo alterações anatomopatológicas e condenações de fígados bovinos no Brasil, reportados em vários estados, com registros de ocorrência de 12,29% em Minas Gerais (4), 6,85% no PR (5), 5,77% em 2003 e 5,70% no RJ (6,7), 2,37% no Paraná (8) e 4,53% no Estado do Maranhão (9).

Os resultados do presente estudo demonstram que telangiectasia foi a causa principal de condenação de fígados (Figura 1), embora por vezes em menor frequência, corroborando com os resultados da literatura, que destacam essa patologia como a alteração hepática de maior ocorrência em bovinos de abate, com registros de 2,08% (4), 41,61% (5), 32,3% (2), 36,45% (10) e 1,67% (11).



Figura 1. Bovino. Fígado. Telangiectasia. Áreas deprimidas, irregulares, arroxeadas de tamanhos variados na superfície do órgão (setas).

Já outros trabalhos apresentaram os abscessos como de maior casuística. Nesse sentido, foi observado no Estado do Rio Grande do Norte 31,25% de ocorrência (12) e 42,42% no Estado do Paraná (8). No presente estudo a lesão (Figura 3 e 4) foi encontrada em 11 fígados, correspondendo a 5,82%, percentual bem abaixo dos trabalhos reportados.



Figura 2. Bovino. Fígado. Abscessos. Múltiplos focos brancos contendo pus, na superfície do órgão (setas)

Abscessos hepáticos em bovinos são comuns em animais em regime intensivo de engorda (13), o que não se aplica no grupo de animais aqui estudados, visto que os mesmos vivem em regime extensivo sem passar por confinamento ou por qualquer tipo de suplementação, mesmo na terminação.

Lesões nodulares de consistência firme, microscopicamente caracterizadas por necrose central com restos de parasitas, envolta por rico infiltrado inflamatório misto, semelhantes a achados neste trabalho, foi observado em fígado de bovinos no Rio de Janeiro (14).

O resultado dos casos de cirrose em fígados bovinos (0,53%), registrados no presente estudo, foram bem inferiores se comparados com os dados de outros trabalhos, em que foi verificado 2,69% no Estado do Paraná (5), 6,25% no RN (12), 4,04% no PR (8) e 21,73% em Rondônia (10).

A cirrose é considerada como o estado final de doença hepática generalizada, também conhecida como “fígado terminal”, caracterizada por regeneração nodular, deposição de grande quantidade de tecido fibroso e hiperplasia dos ductos biliares, com remodelação da circulação sanguínea intrahepática (15).

No presente trabalho, a tuberculose em fígados bovinos foi responsável por 1,59% das condenações. Estes dados são bem superiores aos registrados no RS onde foi verificado 0,027% (16); em MG com 0,03% (4) e no Paraná com 0,92% (5).

A maior ocorrência desta enfermidade na Ilha de Marajó, Estado do Pará, tem sido discutida no gado bubalino onde os autores citam o ambiente de alta umidade propício às

contaminações horizontais por vias aéreas entre os indivíduos (17-21). Vale ressaltar que na Ilha de Marajó, bovinos e bubalinos convivem nas mesmas áreas, sob o mesmo manejo.

Como achado importante, foram observados cistos hepáticos não parasitários em três fígados, correspondendo a 0,31% de ocorrência (Figura 5). Os dados dos cistos não foram planejados, primeiramente por serem considerados meros achados neste trabalho e também coincidentemente por estarem associados a casos de telangiectasia, ficando estas últimas planejadas.

Um estudo em fígado de bovinos em Minas Gerais constataram que 97% dos cistos eram congênitos e outros 3% tinham origem na hiperplasia dos ductos biliares (22). Nenhum cisto hidático foi encontrado, constatando-se que essa doença não apresenta expressividade na região estudada, aspecto similar ao observado no presente trabalho.

Deste modo, levando em consideração a Amazônia a hidatidose tem preferência por zonas pastoris e no Brasil tem área restrita ao Estado do Rio Grande do Sul, sobretudo junto à fronteira com o Uruguai (23).

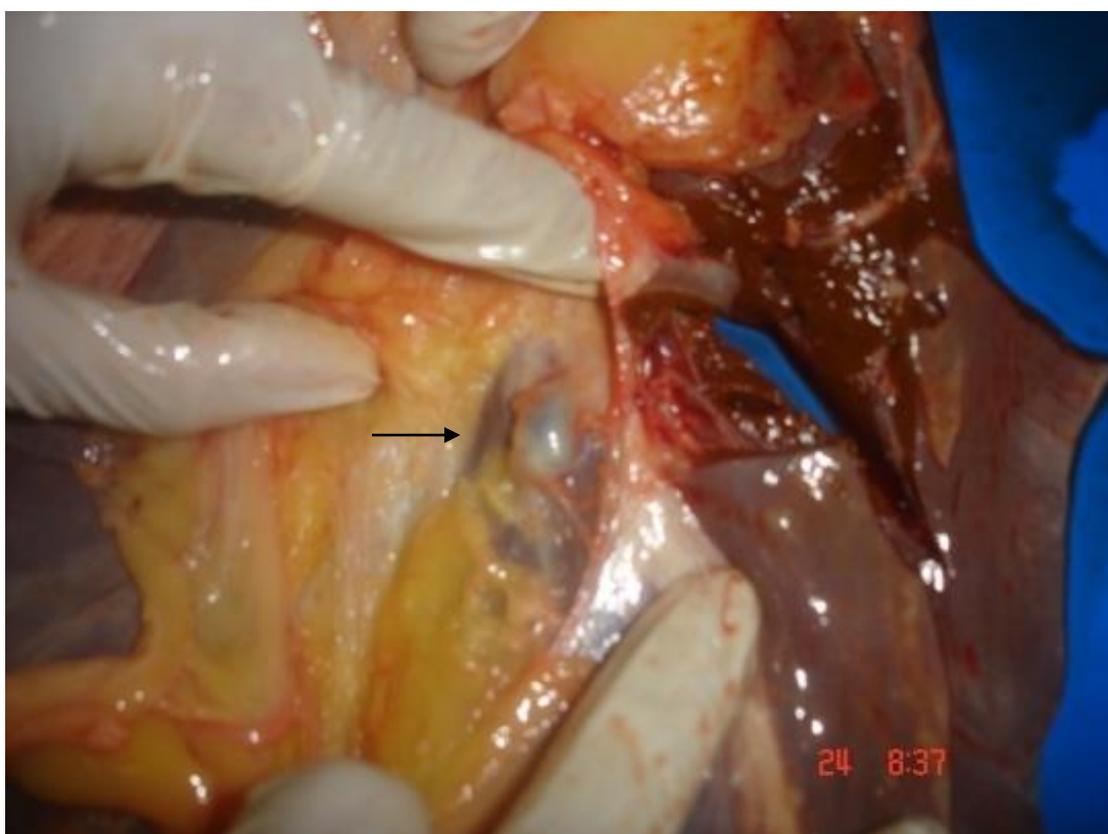


Figura 4. Bovino. Fígado. Cisto (seta). Estrutura firme cística circular translúcida aderida ao parênquima.

A Peri-hepatite foi diagnosticada em quatro casos (2,13%). A enfermidade tem sido pouco discutida na espécie bovina. Entretanto, na Ilha de Marajó, essa hepatopatia foi estudada na espécie bubalina onde foi isolado como agente etiológico a *Chlamydia psittaci* (24). Posteriormente, em estudo descritivo de peri-hepatite, observou a ocorrência de 79,07% na espécie bubalina (25). Já em bovinos os valores se apresentaram bem inferiores em relação aos bubalinos, assim pode-se supor haver o envolvimento de diferentes causas entre as espécies.

Conforme apresentado na Tabela 1, não houve diferença significativa das alterações hepáticas em relação à procedência dos animais, e, portanto, homogeneidade em relação à epidemiologia das alterações.

CONCLUSÕES

A frequência de condenações de fígado de bovinos estudadas neste trabalho foi considerada alta. A principal causa de condenação foi a telangiectasia seguida da esteatose. A tuberculose tem importância por ser zoonose e pelos altos índices encontrados. Os aspectos macro e microscópicos das lesões encontradas não diferem da literatura.

REFERÊNCIAS

1. Ludovino RMR. Agricultura e pecuária em Marajó (Pará - Brasil): diagnóstico dos sistemas de produção da agricultura familiar [dissertação]. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa; 1996.
2. Mendes RE, Pilatti C. Estudo morfológico de fígado de bovino abatido em frigoríficos industriais sob inspeção estadual no oeste e no planalto central de Santa Catarina Brasil. *Cienc Rural*. 2007;37:1728-34.
3. Decreto nº 1205, de 1 de Agosto de 1994. Aprova a estrutura regimental do Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal, e dá outras providências. *Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil*. 2 Ago 1994. Sec. 1, pt. 1, p. 11509.
4. Moreira F, Baptista EC. Causas de condenação de fígados bovinos em frigoríficos de Minas Gerais e perdas econômicas associadas. [Hig Aliment](#). 1999;13:22-7.
5. Bonesi GL, Scalone BCV, Okano W, Rosa A. Lesões hepáticas em bovinos abatidos em matadouro-frigorífico. [Hig Aliment](#). 2003;17:78-83.
6. Faustino MAG, Lima MM, Alves LC, Santos ALG, Santana VLA. Causas de condenação à inspeção sanitária em abatedouro de bovinos da cidade de Valença, Rio de Janeiro. [Hig aliment](#). 2003; 17:32-35
7. Rocco FS. Anatomopatologia em fígados de bovinos de interesse para a inspeção sanitária. [dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2005.
8. Bassani CA, Pareja PHC, Pianho CR, Canteri RC. Condenações de fígados bovinos no frigorífico Cristal Ltda de Campo Mourão-PR entre 2001 e 2006. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Veterinária*; 2008; Gramado. Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária; 2008. p.54.
9. Diniz AMMS. Levantamento dos casos de condenações de vísceras bovinas em matadouro frigoríficos no Estado do Maranhão no período de 2002 a 2007 [dissertação]. São Luís: Universidade Estadual do Maranhão; 2009.
10. Locatelli JS, Deus IR, Vian VS, Schons SV. Estudo retrospectivo de condenações de fígados em frigorífico com S. I. F, no município de Jarú-RO no período de 2004 a 2006. *Rev ULBRAJP*. 2008;2.

11. Vechiato TAF. Estudo retrospectivo e prospectivo da presença de abscessos hepáticos em bovinos abatidos em um frigorífico paulista [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2009.
12. Lima MFC. Análise das alterações anatomopatológicas durante a inspeção *post mortem* em bovinos no abatedouro frigorífico industrial de Mossoró, Rio Grande do Norte. *Cienc Anim.* 2007;17:113-6.
13. Thomson RG. Patologia veterinária especial. São Paulo: Manole; 1998.
14. Salgado R, Alves FMX, Millar RP, Almeida OD, Cunha LF, Miranda ZB, et al. Apoio diagnóstico ao serviço de inspeção do norte Fluminense-RJ na doença hepática dos bovinos. *Pubvet.* 2010;4:1-6.
15. Stalker MJ, Hayes MA. Liver and biliary system. In: Maxie MG. *Pathology of domestic animals.* 5th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. v.2, p.297-388.
16. Lauzer JJ, Silva SF, Costa DF, Air FS. Condenações de fígado de bovinos em Santa Maria, RS. *Cienc Rural.* 1979;9:251-5.
17. Freitas JA, [Silva RAG](#), Ferreira MOG, Santos RS. Alteração observadas em bubalinos abatidos para consumo em Belém - Pará. *Rev Cienc Agrar.* 1989;53-67.
18. Freitas JA, Nascimento JAC, Barros MJC. Alterações similares a tuberculose observada no abate de bovino e bubalino e no nível de consumo. Belém: Fcap; 1997. p.6-23. (Informe técnico; nº. 23).
19. Freitas JA, Tury E, Muniz JP, [Souza J](#). Tuberculose causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* em macacos (*Cebus apella*) mantidos no cativeiro. *Hora Vet.* 1998;18:54-6.
20. Freitas JA, Guerra JL, Panetta JC. Características da tuberculose observada em búfalos abatidos para consumo: aspectos patológicos e identificação de micobactérias. [Braz J Vet Res Anim Sci.](#) 2001;38:170-6.
21. Freitas JA, Panetta JC. Some epidemiological aspects of tuberculosis in water buffaloes in the Amazon Basin of Brazil. *Buffalo Bull.* 2002;21:75-82.
22. Reis DO, Coelho HE, Manzan RM. Caracterização morfológica de cistos hepáticos em bovinos abatidos em matadouro frigorífico de Uberlândia-MG. *Hig Aliment.* 2000;14:58-61.
23. Moraes MAP, Arnaud MVC. Hidatidose: equinococose neotropical. In: Leão NQR. *Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico.* Belém: CEJUP, UEPa/IEV; 1997.

24. Freitas JA, Machado RD, Nakauth C, Noronha SLB, Ramos OS. Caracterização da cepa *Clamydia psittaci* oriunda de polisserosite de bubalinos. Arq Inst Biol. 1995;62:53-8.
25. Silva RAG. Morfologia das alterações hepáticas em bubalinos (*Bubalus bubalis* lin) abatidos para consumo em Belém-Pará, com ênfase à periepatite [dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 1996.

Recebido em: 20/05/2016

Aceito em: 06/01/2017

PERFIL PARASITOLÓGICO DE MAMÍFEROS SILVESTRES CATIVOS

Alessandra Snak¹
Kira Maria Agostini¹
Paola Fernanda Lenzi¹
Cleuza Rocha Montanucci¹
Luis Eduardo Delgado²
Marivone Valentim Zabott¹

RESUMO

Com o escopo de contribuir para o conhecimento das enfermidades parasitárias que acometem animais silvestres em cativeiro, foi realizado o presente estudo com o objetivo de fornecer dados sobre a frequência de parasitos em mamíferos silvestres mantidos no Parque Municipal Danilo Galafassi (Zoológico Municipal de Cascavel-PR). A população de animais estudados foi de 94 animais, ordem Carnívora (n=22), Primata (n=33), Artyodactyla (n=39), distribuídos em 33 recintos diferentes. O material foi analisado por meio de dois métodos: de flutuação em solução hipersaturada de cloreto de sódio (Willis-Mollay) e de sedimentação simples (Hoffmann, Pons e Janer). Os resultados das análises demonstraram 38,95% de amostras positivas para pelo menos um endoparasito. Os helmintos encontrados nas amostras positivas foram: *Strongyloides* sp., *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp., *Capillaria* sp., *Trichuris* sp., *Spirometra* sp., *Eimeria* sp., *Cystoisospora* sp., superfamílias Strongyloidea, Oxyuroidea e Classe Cestoda. Concluiu-se que, em virtude dos achados parasitológicos, há necessidade de se intensificarem as medidas de controle parasitário no referido zoológico.

Palavras-chave: zoológico, mamíferos, análises parasitológicas.

PARASITOLOGICAL PROFILE OF CAPTIVE WILD MAMMALS

ABSTRACT

With the aim of contributing to the knowledge of parasitic diseases that affect wild animals in captivity, it was conducted this study with the goal of providing data on the frequency of parasites in wild mammals kept in the Municipal Park Danilo Galafassi (Municipal Zoo of Cascavel-PR). The population of animals studied was 94 animals, order Carnivora (n = 22), Primate (n = 33), Artyodactyla (n = 39), distributed in 33 different enclosures. The material was analyzed by two methods: flotation in supersaturated solution of sodium chloride (Willis-Mollay) and simple sedimentation (Hoffmann, Pons and Janer). The results of the analysis showed 38.95% of positive samples for at least one endoparasite. The helminthes found in positive samples were *Strongyloides* sp., *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp., *Capillaria* spp., *Trichuris* sp., *Spirometra* spp., *Eimeria* spp., *Cystoisospora* sp., superfamilies Strongyloidea, Oxyuroidea and class Cestoda. It was concluded that, given the parasitological findings, there is necessity to intensify parasite control measures in that zoo.

Keywords: zoological, mammals, parasitological analyzes.

¹ Universidade Federal do Paraná

² Zoológico Municipal de Cascavel

PERFIL PARASITOLÓGICO DE LOS MAMÍFEROS SILVESTRES CAUTIVOS

RESUMEN

Con el objetivo de contribuir al conocimiento de las enfermedades parasitarias que afectan a los animales salvajes en cautividad, se llevó a cabo este estudio con el objetivo de proporcionar datos sobre la frecuencia de parásitos en mamíferos silvestres mantenidos en el Parque Municipal Danilo Galafassi (Zoo Municipal de Cascavel-PR). La población de animales estudiados fue de 94 animales, orden Carnívora (n = 22), Primado (n = 33), Artiodactyla (n = 39), distribuidos en 33 sedes diferentes. El material se analizó mediante dos métodos: flotación solución sobresaturada de cloruro de sodio (Willis-Mollay) y simple de sedimentación (Hoffmann, Pons y Janer). Los resultados del análisis mostraron 38,95% de muestras positivas para al menos un endoparásito. Los helmintos encontrados en las muestras positivas fueron *Strongyloides* sp., *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp., *Capillaria* spp., *Trichuris* sp., *Spirometra* spp., *Eimeria* spp., *Cystoisospora* sp., superfamilias Strongyloidea, Oxyuroidea y clase Cestoda. Se concluyó que, dados los resultados parasitológicos, existe la necesidad de intensificar las medidas de control de parásitos en ese zoológico.

Palabras clave: zoológico, mamíferos, análisis parasitológico.

INTRODUÇÃO

Na natureza, os animais selvagens tendem a viver em áreas extensas, tendo conseqüentemente uma baixa resistência contra infecções parasitárias por causa da baixa exposição. Quando esses animais são mantidos em cativeiro, o problema de infecções parasitárias pode se agravar e representar uma grande ameaça de extinção das espécies (1).

Pela grande importância da conservação, reabilitação e reintrodução da fauna silvestre, nos últimos anos, muitos estudos relacionados ao perfil epidemiológico das espécies têm sido conduzidos no sentido de fornecer dados para a implantação de medidas de manejo para garantir o êxito dessas atividades (2).

O ambiente dos zoológicos apresenta normalmente áreas verdes e refúgios que servem principalmente como enriquecimento ambiental e contribuem para a diminuição do estresse dos animais, porém, tornam mais difícil o acesso e a completa higienização e desinfecção dos recintos. Algumas possíveis fontes de infecção observadas nesses locais estão relacionadas aos roedores nativos, pássaros silvestres que têm acesso ao cativeiro e resíduos nos calçados dos tratadores, condições essas que implicam na manutenção de infecções parasitárias latentes (3,4,5).

Ocorrência de parasitos em animais alojados em jardins zoológicos pode variar de acordo com o tipo de práticas de manejo, a profilaxia da doença e tratamento administrado. O estado nutricional dos animais cativos influencia diretamente no aumento ou diminuição da resistência às doenças (6).

As técnicas diagnósticas coparasitológicas são ferramentas importantes que permitem a avaliação da intensidade das infecções, a qual possibilita verificar a probabilidade de transmissão entre seres de uma mesma comunidade, ou avaliar as condições sanitárias a que estão submetidas às populações e o impacto das ações de controle (7,8,9).

Os animais foram adquiridos por permutas de animais com outras instituições, doações supervisionadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), nascimentos no próprio zoológico e apreensão de animais realizada pelo IBAMA e Polícia Florestal (10).

O objetivo do presente estudo foi realizar por meio de exames coparasitológicos um levantamento da fauna parasitária de mamíferos cativos no Parque Municipal Danilo Galafassi, em Cascavel, PR.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um levantamento parasitológico dos mamíferos em cativeiro no Parque Municipal Danilo Galafassi, conhecido como Zoológico de Cascavel, no estado do Paraná. O parque possui uma área de 17,91 ha e no período da pesquisa o zoológico contava com cerca de 340 animais de 68 espécies, sendo 37 espécies de aves, 23 espécies de mamíferos e oito espécies de répteis.

Durante o período de agosto de 2010 a junho de 2012, foram realizadas coletas bimensais, individuais e pools grupais, de 94 animais, distribuídos em 33 recintos diferentes (Tabela 1). O número total de amostras fecais foi de 344 distribuídas em ordem Carnívora n=180, ordem Artiodactyla n=78 ordem Primata n=72, acondicionadas em recipientes apropriados, sem conservantes e mantidas refrigeradas. Este trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal (CEBEA) do Setor Palotina da UFPR, protocolo nº 29/2010.

Foram utilizados dois métodos de análise, o método de flutuação em solução hipersaturada de cloreto de sódio (Willis-Mollay (11)) e o método de sedimentação simples (Hoffman et al. (12)). Os resultados foram anotados em fichas de identificação do recinto, uma vez que os mesmos podiam abrigar mais de um animal.

Tabela 1. Espécies estudadas.

Ordem, família, espécie	Nome popular	Total (nº recintos)
Carnívora		
Canidae <i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	1 (1)
Felidae <i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	1 (1)
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato	2 (2)
<i>Panthera leo</i>	Leão	5 (5)
<i>Panther aonca</i>	Onça pintada	1 (1)
<i>Panthera tigris</i>	Tigre	2 (1)
<i>Puma concolor</i>	Puma	3 (3)
<i>Puma yagouaroundi</i>	Jaguarundi	2 (2)
Mustelidae <i>Eyra barbara</i>	Irara	1 (1)
Procyonidae <i>Nasua nasua</i>	Quati	4 (2)
Primata		
Atelidae <i>Alouatta caraya</i>	Bugio	1 (1)
<i>Ateles paniscus</i>	Macaco aranha	1 (1)
Cebidae <i>Callithrix</i> sp.	Sagui	4 (1)
<i>Cebus</i> sp.	Macaco prego	27 (4)
Artiodactyla		
Cervidae <i>Mazama nana</i>	Veado cambuta	2(1)
<i>Mazama gouazoupira</i>	Veado catingueiro	2(1)
Tayassuidae <i>Tayassu pecari</i>	Queixada	21(3)
<i>Tayassu tajacu</i>	Cateto	14(2)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras analisadas, 134 apresentaram-se positivas 38,95%, sendo 57 (30,5%) da ordem Carnívora, 45 (54,8%) da ordem Artiodactyla e 32 (42,6%) ordem Primata (Tabela 2). Ocorreu poliparasitismo em 31,34% (42/134) das amostras positivas, 25 (43,8%) na ordem Carnívora, 13 (40,6%) ordem Primata e 4 (8,88%) na ordem Artiodactyla. Os recintos que

apresentaram todos os resultados negativos foram os que continham *Panthera onca* (onça pintada), *Leopardus pardalis* (jaguatirica), *Panthera tigris* (tigre) e *Alouatta caraya* (Bugio).

Tabela 2. Frequência (%) de parasitos em mamíferos silvestres cativos, do Zoológico de Cascavel.

Ordem	N	P	%
Carnivora	187	57	30,5
Artiodactyla	82	45	54,8
Primata	75	32	42,6
Total	344	134	38,95

N= número de amostras analisadas; P= número de amostras positivas.

Certa variedade de ovos, oocistos e larvas foram encontrados, porém, em muitos casos a identificação só foi possível ao nível de superfamília. Os helmintos encontrados foram: *Strongyloides* sp., *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp., *Capillaria* sp., *Trichuris* sp., *Spirometra* sp., *Eimeria* sp., *Cystoisospora* sp., superfamílias Strongyloidea, Oxyuroidea e classe Cestoda, conforme Figura 1.

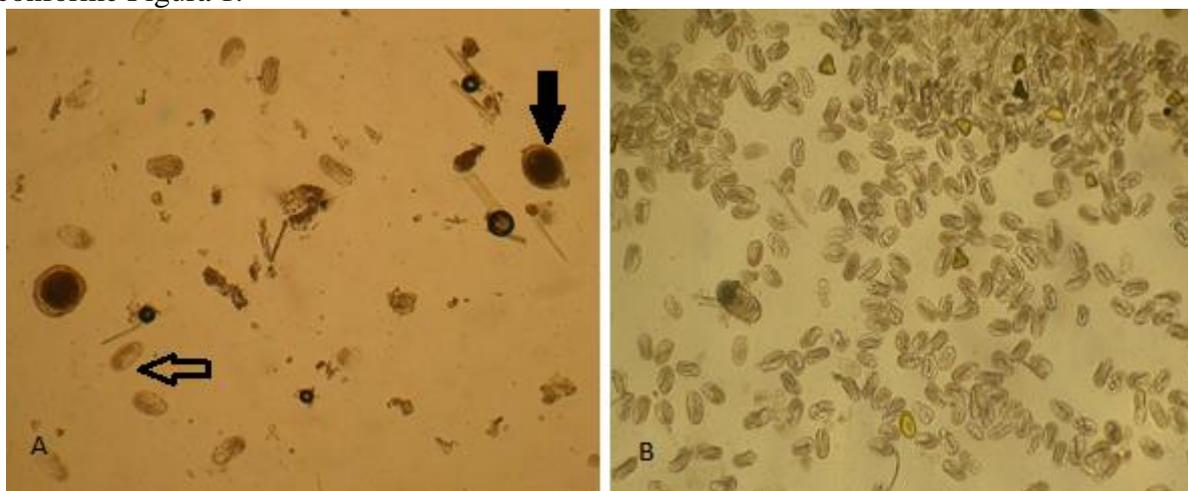


Figura 1 – Imagens de achados coproparasitológicos de mamíferos cativos. A: Ovos de *Toxocara* sp. (seta escura) e Strongyloidea (seta clara) em *Puma concolor*, 100X; B: ovos de *Ancylostoma* sp. em *Puma yagouaroundi*, 100X.

Dentre os helmintos identificados, os estrogilídeos (Superfamília Strongyloidea) foram os mais frequentes, sendo encontrados em sete das oito famílias estudadas e em dez dos doze gêneros avaliados, o *Ancylostoma* sp. gênero que pertence a esta superfamília ocorreu em seis famílias e nove gêneros de mamíferos, sendo que o mesmo ocorreu com *Strongyloides* sp., conforme Tabela 3.

Tabela 3. Frequência de parasitos em fezes de mamíferos cativos no Zoológico de Cascavel, Paraná, Brasil.

Parasitos	Ordem Carnivora				Ordem Primata				Ordem Artiodactyla							
	Canidae		Felidae		Mustelidae		Procyonidae		Atelidae		Cebidae		Cervidae		Tayassuidae	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Strongyloides</i>	-	-	7	4,57	-	-	3	20	1	3,7	1	31,25	1	4,3	3	5,0
<i>Toxocara</i>	-	-	1	7,2	-	-	1	6,6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichuris</i>	5	83,33	1	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,69
<i>Capillaria</i>	4	66,66	1	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Spirometra</i>	-	-	3	1,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Strongyloidea</i>	1	16,66	1	8,33	2	15,38	7	46,66	1	3,7	1	37,5	-	-	6	10,1
<i>Cestoda</i>	-	-	2	1,30	-	-	-	-	-	-	1	2,08	3	13,04	1	1,69
<i>Eimeria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4,16	-	-	8	13,55
<i>Cystospora</i>	-	-	8	5,22	-	-	9	60	-	-	-	-	-	-	1	1,69
<i>Oxyuroidea</i>	-	-	1	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ancylostoma</i>	-	-	1	6,0	-	-	-	-	-	-	3	6,25	-	-	-	-
<i>Ovo não identificada</i>	-	-	2	1,30	-	-	1	6,6	1	3,7	1	2,08	4	17,39	22	37,28

n - número de amostras analisadas; P - número de amostras positivas.

A família Felidae foi a que apresentou a maior diversidade de helmintos, em que foram encontrados todos os parasitos descritos, seguida pela família Canidae com metade da abundância. A espécie que apresentou maior variedade parasitária foi o *Puma concolor*.

Os resultados do presente estudo revelaram alta prevalência de parasitos nos mamíferos estudados (38,95%), sendo maior na ordem Artiodactyla (54,8%), seguida das ordens Primata (42,6%) e Carnivora (30,5%). Embora a ordem Artiodactyla tenha revelado a maior prevalência, foi a que apresentou menor diversidade parasitária.

Dentre os mamíferos estudados, a família Felidae apresentou maior variabilidade parasitária, principalmente relacionada aos parasitos com ciclo direto. Segundo Freitas et al. (13), que realizaram avaliação coproparasitológica de 62 mamíferos cativos no Parque Dois Irmãos em Recife, embora haja uma diversidade maior para helmintos em carnívoros cativos, ela é na maioria dos estudos inferior à encontrada em espécies de vida livre, em função de o cativeiro desfavorecer a infecção de grande parte de espécies de parasitos, pela limitação das fontes de infecção.

Os nematódeos intestinais *Ancylostoma* sp. e *Strongyloides* sp. apresentaram a maior frequência nos carnívoros. Lasprilla et al. (4) ao examinarem as fezes de 88 mamíferos,

pertencentes ao Zoológico Santa Fe de Medellín, obtiveram uma prevalência de 13,6% de nematódeos intestinais, sendo *Strongyloides* sp. o mais prevalente (10,2%) principalmente na ordem Primata com incidência de 100%, seguido de *Toxocara* sp. (2,3%) e *Ancylostoma* sp. (1,1%). *Toxocara* sp. foi encontrado somente nos felinos, coincidindo com os achados do presente estudo.

No presente estudo, foram identificados ovos de *Trichuris* e *Capillaria* somente nas fezes de felídeos e canídeos. Müller et al. (3), ao analisarem amostras fecais de 13 felinos residentes no Zoológico Municipal de Pomerode-SC, encontraram elevada prevalência do gênero *Trichuris* sp., tratando-se de um nematódeo com ciclo direto, que apresenta ovos extremamente resistentes no ambiente.

Os mamíferos pertencentes à ordem Artiodactyla estavam parasitados por *Strongyloides* e parasitos da superfamília Strongyloidea, os quais também ocorreram em indivíduos da mesma ordem avaliados por Freitas et al. (13).

Lim et al. (14) avaliaram amostras de fezes de felinos do Zoológico da Malásia e encontraram parasitos do gênero *Toxocara* sp., resultado semelhante a essa pesquisa. No estudo relatado, os exames dos primatas apresentaram resultados negativos, diferindo desta pesquisa em que nas amostras dos saguis e macacos-prego foram encontrados *Strongyloides* sp., *Cystoisospora* sp. e Strongyloidea, e os últimos ainda apresentaram ovos de tenídeos. Já em um estudo realizado na Tânzania, foi observado *Strongyloides* sp., *Trichuris* sp., *Streptopharagus* sp., *Oesophagostomum* sp. e *Primas ubulura* sp. em primatas (15).

No Zoológico do Parque Estadual de Dois Irmãos (Pernambuco), foi encontrado Strongyloidea nas três ordens de animais estudadas nessa pesquisa, resultado esse muito semelhante ao encontrado no Zoológico Municipal de Cascavel (16).

Em um estudo realizado por Brandão et al. (17) em que foram analisadas amostras de fezes de animais do Parque Nacional Serra da Capivara também foram encontrados ovos de Strongyloidea em *Taiassu pecari* (queixadas), porém, encontraram também ovos de Ascarididae e Ancylostomatidae. Além dos queixadas, foram analisadas fezes de *Panthera onca* e *Alouatta caraya* onde se obteve resultados positivos, com presença de Ancylostomatidae, *Oncicola* sp. e Spiruroidea nas fezes da *Panthera* e Ascarididae, *Strongyloides* sp., Trichostrongylidae e *Tripaxyuris minutus* nas fezes da *Alouatta*, porém, nesta pesquisa todas as amostras encontraram-se negativas para essas espécies.

Os resultados denotam que algumas espécies animais apresentam positividade e diversidade maior que outras, podendo estar relacionado ao número e idade dos animais nos recintos, com medidas sanitárias e com o nível de estresse destes. Os macacos-prego, por exemplo, que são considerados animais com maior índice de estereotípias provocadas pelo estresse em zoológicos. Animais com alta frequência de estereotípias podem possuir carga parasitária maior, o que poderia ser ocasionado pelo aumento do estresse no cativeiro e consequente diminuição da imunidade (3).

O cativeiro pode tornar-se um dos principais problemas para os animais, pois, além de ocasionar maior estresse, é um lugar restrito que propicia o desenvolvimento de parasitos, onde a autoinfecção pode ser constante, dificultando a eliminação do parasito do animal e do ambiente (5,18).

Apenas alguns felinos receberam anti-helmínticos específicos, devido apresentarem elevada carga parasitária e baixo peso, como o *Puma yagouaroundi* e o *Puma concolor*. Foram recomendadas medidas de controle ambiental envolvendo limpeza, remoção das fezes, uso de vassoura de fogo e desinfetantes, bem como trabalhos de enriquecimento ambiental visando reduzir o estresse, além de medidas para evitar a entrada de animais sinantrópicos, para todos os recintos estudados.

CONCLUSÃO

Há grande prevalência de parasitos em mamíferos silvestres, principalmente se tratando de animais em cativeiro onde o ambiente restrito, muitas vezes associado à alta densidade, pode tornar mais difícil o controle das fases parasitárias no ambiente, propiciando a autoinfecção/re-infecção.

Em muitos casos, a presença do parasito pode não estar relacionada ao aparecimento de sinais clínicos, por isso, recomenda-se realizar avaliações parasitológicas de forma rotineira para que medidas de controle sejam tomadas antes do surgimento da doença clínica.

Há poucos trabalhos relatando a presença de helmintos em animais silvestres. Esta pesquisa colaborou para identificar alguns gêneros dos principais parasitas que infectam mamíferos em cativeiro.

Os resultados do presente estudo em uma prevalência relativamente baixa de helmintos (38,17%) para os mamíferos estudados, tanto da ordem Carnívora (16,36%), como nas ordens Artiodactyla (12,42%) e Primata (10%), há uma variedade relevante de espécies de parasitos encontrados que são potencialmente patogênicas para as espécies estudadas e que representam importantes zoonoses parasitárias.

COMISSÃO DE ÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL

Este trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal (CEBEA) do Setor Palotina da UFPR, protocolo nº 29/2010.

REFERÊNCIAS

1. Muoria PK, Muruthi P, Rubenstein D, Oguge NO, Munene E. Cross-sectional survey of gastro-intestinal parasites of Grevy's zebras in southern Samburu, Kenya. *Afr J Ecol*. 2005;43(4):392-5.
2. Beltrán L, Beldomenico P, González J. Estudio coproparasitológico de mamíferos silvestres en cautiverio con destino a relocación en Santa Cruz, Bolivia. *Vet Zootec*. 2009;3(1):51-60.
3. Muller GCK, Greinert JA, Silva Filho HH. Frequência de parasitas intestinais em felinos mantidos em zoológicos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2005;57(4):559-61.
4. Lasprilla M, Ocampo M, López G. Identificación de huevos de nemátodos en carnívoros y primates ubicados en el Zoológico Santa Fe de Medellín, mediante método coprológico directo y de flotación. *Rev Spei Domus*. 2009;5(10):30-6.
5. Snak A, Lenzi PF, Agostini KM, Delgado LE, Montanucci CR, Zabott MV. Analises coproparasitologicas de aves silvestres cativas. *Cienc Anim Bras*. 2014;15(4):502-7.
6. Geraghty V, Mooney J, Pike K. A study of parasitic infections in mammals and birds at the Dublin Zoological Garden. *Vet Res Commun*. 1982;5(4):343-8.
7. Hall A. Intestinal helminths of man: the interpretation of egg counts. *Parasitology*. 1982;85(Pt 3):605-13.

8. Mascie-Taylor CGN, Alam M, Montanari RM, Karim R, Ahmed T, Karim E, et al. A study of the cost effectiveness of selective health interventions for the control of intestinal parasites in rural Bangladesh. *J Parasitol.* 1999;85(11):6-11.
9. Araújo AJUS, Kanamura HY, Dias LCS, Gomes JF, Araújo SM. Coprotest quantitativo: quantificação de ovos de helmintos em amostras fecais utilizando-se sistema de diagnóstico comercial. *J Bras Patol Med Lab.* 2003;39(2):115-24.
10. Portal do Município de Cascavel. Parques [Internet]. 2010 [cited 2012 Apr 20]. Available from: http://www.cascavel.pr.gov.br/secretarias/semdec/sub_pagina.php?id=258.
11. Hastings-Willis H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Med J Australia.* 1921;29:375-6.
12. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J Publ Health Trop Med.* 1934;9:283-91.
13. Freitas MFL, Oliveira JB, Cavalcanti MDB, Oliveira RA, Evêncio Sobrinho A. Perfil coproparasitológico de mamíferos silvestres em cativeiro em el estado de Pernambuco, Brasil. *Parasitol Dia.* 2001;25(3-4):121-5.
14. Lim YAL, Ngui R, Shukri J, Rohela M, Mat Naim HR. Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. *Vet Parasitol.* 2008;157(1-2):154-9.
15. Kooriyama T, Hasegawa H, Shimozuru M, Tsubota T, Nishida T, Iwaki T. Parasitology of five primates in Mahale Mounstains National Park, Tanzania. *Primates.* 2012;53(4):365-75.
16. Sandes HMM, Siqueira DB, Lima PC, Souza DS, Galindo MKF, Ramos JC, et al. Frequência de endoparasitas em mamíferos mantidos no Zoológico do Parque Estadual de Dois Irmãos [Internet]. In: *Anais do 22o Congresso Brasileiro de Parasitologia; 2011; São Paulo. São Paulo: SBMT; 2011 [cited 2012 Jul 30]. Available from: <http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R0959-1.PDF>.*
17. Brandão ML, Chame M, Cordeiro JLP, Chaves SAM. Diversidade de helmintos intestinais em mamíferos silvestres e domésticos na Caatinga do Parque Nacional Serra da Capivara, Sudeste do Piauí, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2009;18(1):19-28.
18. Gomes CWC, Mattos-Gomes MJT. Levantamento de helmintos gastrintestinais em primatas de vida livre e cativeiro na região de Grande Porto Alegre, RS [trabalho de conclusão de curso]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011 [cited 2012 Aug 1]. Available from: <http://hdl.handle.net/10183/52500>.

Recebido em: 30/04/2016

Aceito em: 06/01/2017

BLOOD VARIABLES OF HYBRID TAMBACU FARMED IN AMAPÁ STATE, NORTHERN BRAZIL

Eliane Tie Oba-Yoshioka¹
Rafaela Costa¹
Moacir Borges¹
Marcos Tavares-Dias¹

ABSTRACT

This study compared the blood characteristics of hybrid tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) from three fish farms in the Macapá, State of Amapa (Brazil), which has a similar management. There were differences in the levels of dissolved oxygen in the water and pH in the ponds of the fish farms, but condition factor showed good body condition of the fish. In blood of tambacu were identified thrombocytes, lymphocytes, monocytes, neutrophils, PAS-positive granular leukocytes (PAS-GL) and eosinophils. Plasma glucose and protein levels, hematocrit, total leucocyte count, total thrombocytes count, monocytes, neutrophils and eosinophils count were similar among the three fish farms. However, hemoglobin concentration, total erythrocytes count, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular volume (MCV), number of lymphocytes and PAS-GL showed differences among fish of these fish farms. Although the results showed a relative similarity between the blood parameters in the fish of the different fish farms, but the management conditions regarding the water quality in the ponds and food should be improved to increase the productivity in these fish farms.

Keywords: fish farm, freshwater fish, management, white blood cells.

VARIÁVEIS SANGUÍNEAS DO HÍBRIDO TAMBACU CULTIVADO NO ESTADO DO AMAPÁ, NORTE DO BRASIL

RESUMO

Este estudo comparou as características sanguíneas do híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) de três pisciculturas de Macapá, Estado do Amapá (Brasil), com manejos semelhantes. Diferenças nos níveis de oxigênio dissolvido e do pH da água dos viveiros foram observadas, mas o fator de condição mostrou a boa condição dos peixes. No sangue dos tambacus foram identificados trombócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos, leucócitos granulares PAS-positivo (LG-PAS) e eosinófilos. Os níveis de glicose e proteína, hematócrito, contagem total de leucócitos, contagem total de trombócitos, contagem de monócitos, neutrófilos e eosinófilos foram similares entre as três pisciculturas. Entretanto, a concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume corpuscular médio (VCM), número de linfócitos e LG-PAS mostraram diferenças entre os peixes destas pisciculturas. Embora, os resultados mostraram relativa similaridade entre os parâmetros sanguíneos dos peixes das pisciculturas, mas condições de manejo, relativo à qualidade da água dos viveiros e à alimentação fornecida, devem ser melhoradas para aumentar a produtividade nestas pisciculturas.

Palavras-chave: piscicultura, peixes de água doce, manejo, leucócitos.

¹ Laboratório de Aquicultura e Pesca - Embrapa Amapá. Correspondência.

VARIABLES DE LA SANGRE EN HYBRIDO TAMBACU CULTIVADO EN EL ESTADO DE AMAPÁ, NORTE DE BRASIL

RESUMEN

Este estudio comparó las características de la sangre de híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) tres criaderos piscícolas en Macapá, Estado de Amapá (Brasil), con gestiones similares. No se observaron diferencias en los niveles de oxígeno y pH del agua de los estanques en los criaderos piscícolas, pero el factor de condición mostró buenas condiciones corporales en los peces. En la sangre de los tambacus fueron identificados trombocitos, linfocitos, monocitos, neutrófilos, leucocitos granulares PAS-positivos (LG-PAS) y eosinófilos. Los niveles de glucosa y proteínas, hematocrito, recuento de leucocitos totales, el recuento total de trombocitos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos fueron similares entre peces de los criaderos piscícolas. Sin embargo, la concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), volumen corpuscular medio (VCM), el número de linfocitos y LG-PAS mostraron diferencias entre los peces de los criaderos piscícolas. Aunque los resultados mostraron relativa similitud entre los parámetros de la sangre de peces de los criaderos piscícolas, pero el manejo de las condiciones de la calidad del agua del estanque y la comida siempre debe mejorarse para aumentar la productividad en estas criaderos piscícolas.

Palabras clave: criaderos piscícolas, pez de agua dulce, manipulación, leucocitos.

INTRODUCTION

Tambacu were first obtained in the 1980s, through crossing female tambaqui (*Colossoma macropomum*) with male pacu (*Piaractus mesopotamicus*), in an attempt to obtain a more robust fish, with the rapid growth of tambaqui, but more resistant to low temperatures, like pacu, during the winter in the southern and southeastern region (1,2). These hybrids still have great importance within Brazilian fishfarms, because of these zootechnical characteristics, omnivorous habits, resistance to stress and parasitic diseases and great ease of adaptation (3,4,5). Brazil produced 49,818 tons of tambacu in 2011, which was 120% more than in 2010 (6).

In fish farms in the state of Amapá, tambacu are the third most commonly farmed fish, after *C. macropomum* and the hybrid tambatinga (*C. macropomum* x *Piaractus brachyomus*) (7). On fish farms in this region, tambacu present moderate parasitism due to *Ichthyophthirius multifiliis*, *Piscinoodinium pillulare* (Protozoa), *Anacanthorus spatulatus*, *Notozothecium janauachensis* and *Mymarothecium viatorum* (Monogenea), *Perulernaea gamitanae* (Crustacea), *Cucullanus colossomi* (Nematoda), *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) and cestoides Proteocephalidae (5). The blood parameters of tambacu have been characterized in fish farmed in São Paulo state (8,9). However, there are little information on hematology of farmed tambacu in Amapá state.

Hematological and biochemical parameters can be used as physiological and immunological indicators of the conditions of a fish population (10,11,12), since the blood tissue presents properties relating to respiration, protection and transportation of a variety of substances such as nutrients. Therefore, hematology can be used as a tool in studies on the health of fish populations (13,14). Hence, the present study had the objective of comparing the blood variables of tambacu on three fish farms in Macapá, state of Amapá, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

This study was conducted in accordance with the principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). Between October 2009 and March 2010, healthy specimens of tambacu (*C. macropomum* x *P. brachypomus*) were collected from three fish farms in Macapá, state of Amapá, with the aid of cast or trawl nets. These fish, aged 4 to 10 months, were cultivated in dugout tanks of volume 1,000 to 9,000 m³, at stocking densities ranging from 0.5 to 2.8 fish/m³. Fish were fed with extruded commercial feed suitable for omnivorous fish, containing crude protein levels of 28 to 32%.

Immediately after each fish had been caught, a blood sample was collected from it (1.0 mL) by means of caudal vein puncture, using syringes and needles containing EDTA (10%). These samples were conserved in ice. In accordance with the methodology described by Ranzani-Paiva et al. (13), the following were determined: hematocrit, using the microhematocrit method; red blood cells (RBC) count, in a Neubauer chamber; hemoglobin concentration, using Drabkin's reagent; and absorbance, through readings on a spectrophotometer at 540 nm. From these data, the Wintrobe hematimetric indices were calculated: mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC).

One part of the blood was used to produce blood extensions, which were stained panchromatically using a combined May-Grünwald-Giemsa-Wright stain, in order to perform differential white blood cell counts on up to 200 cells of interest, in each extension. The white blood cells were identified as lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and PAS-GL, following the nomenclature recommended by Tavares-Dias et al. (8). The determinations of total white blood cells (WBC) and thrombocyte counts followed the recommendations of Ranzani-Paiva et al. (13). After centrifugation of the blood, the plasma was separated in order to determine the glucose and total protein levels, using commercial colorimetric kits (Doles, Goiânia, GO).

After the blood samples had been collected, the fish were examined in relation to the mouth, opercula, gills and gastrointestinal tract, to ascertain whether any parasites were present. Only the specimens that were free from parasites and macroscopic lesions were used. The methodology used for the procedures of collection, fixation and parasitological analysis were as described by Eiras et al. (15). The fish were weight (g) and measured (cm), and these data were used to calculate the relative condition factor (16).

On each occasion when fish were collected, the dissolved oxygen level, pH and temperature of the water in the fish ponds of the three fish farms were determined, using digital devices specific for each of the parameters measured.

All the data were initially evaluated with regard to the assumptions of normal distribution and homocedasticity, using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. The data that presented normal distribution were evaluated using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, to compare between the means. The data that did not present normal distribution were evaluated using the Kruskal-Wallis test to compare between the medians using the Tukey's test. Differences were considered significant at the 5% probability level (17).

RESULTS AND DISCUSSION

In fish farming, constant monitoring of the physical and chemical parameters of the water in the ponds is recommended (1,2), given that maintenance of good water quality is vital to good health and growth among the fish, because of its influence on their metabolic processes (18,19).

The water temperature in the ponds of fish farms 2 and 3 was higher, while the oxygen levels and pH were lower than those of fish farm 1 (Table 1). Moreover, in the ponds of fish farms 2 and 3, the dissolved oxygen levels were less than 4.0 mg.L⁻¹, since renewal of the pond water and water aeration were generally not done. For optimum growth and performance of round fish, the oxygen levels in fish-farm ponds ought to be higher than this level (20). Although round fish are able to survive for hours in waters with low oxygen levels (0.5 mg.L⁻¹), using an emergency respiratory strategy consisting of expansion of the lower lip (aquatic surface respiration) (1,2,21,22), the health of these fish becomes compromised, given that they cease to feed. For fish farms, the water pH should be within a band between 6.5 and 7.5 (19,23,24).

Table 1. Water quality parameters (mean \pm standard deviation) of three fish farm of tambacu in Macapá, Amapá State.

Fish farms	1	2	3
Oxygen (mg.L ⁻¹)	4,8 \pm 0,4 ^b	3,3 \pm 1,6 ^a	3,9 \pm 1,6 ^a
pH	7,0 \pm 0,3 ^b	5,9 \pm 0,8 ^a	5,9 \pm 0,8 ^a
Temperature (°C)	29,2 \pm 0,8 ^a	30,2 \pm 0,8 ^{ab}	30,3 \pm 0,6 ^b

Small different letters in the same row indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between fish farms by Tukey's test.

The condition factor (Kn) is a quantitative indicator of body and dietary conditions and the influence of population density and other environmental conditions (16,25). Thus, the Kn of intensively farmed tambacu indicates that they present good body conditions. The weight, length and condition factor of the tambacu on fish farm 2 were greater than those of the fish on the other two farms (Table 2), because of differences in the fish ages.

In the tambacu of the three fish farms investigated, the plasma glucose and protein levels were similar (Table 2), despite management differences between these farms. In general, the fish on farms 1 and 3 did not receive balanced feed continually. Moreover, the fish on these three farms were sometimes not fed with balanced feed but, rather, with leftover products from supermarkets or with feed that presented inappropriate daily protein levels and feed quantity (7,26). The glucose and plasma protein levels in the tambacu of the present study were also similar to those that have been reported for tambaqui (27) and tambacu (12). However, they were higher than those reported for farmed tambacu in the state of Paulo (9). Nonetheless, when food restrictions are present, high levels of plasma proteins may occur in farmed fish (28). These high protein levels may indicate states of hemolysis (29), but such conditions were not observed among the fish in this study. Glucose and plasma protein levels not only vary between species, but also may be influenced by the fish ecophysiology and by their sex, gonadal development, diseases, seasonality, management, diet and other factors(4,9,30).

Among farmed fish, erythrocyte parameters may help in evaluating the effects of the diet administered, management stress and presence of diseases (4,9,12,30). The hemoglobin concentration, RBC counts and MCHC were lower among the tambacu on farm 2, while the MCV was higher. However, the hematocrit of the tambacu was similar on the three fish farms investigated (Table 2). These results can be attributed to the fact that the fish on farm 2 were older than the others. Furthermore, higher MCV levels are a mean of compensating for these low hemoglobin levels and RBC counts. Nonetheless, the values for these parameters were similar to those described for this same hybrid cultivated in the state of São Paulo (8). Therefore, it seems that the lower dissolved oxygen levels and lower pH in the water of the ponds of fish farms 2 and 3 did not have any significant effect on the erythrogram of the fish, thus confirming the hardiness of tambacu.

Table 2. Body and blood parameters (mean \pm standard deviation) of tambacu from three fish farms from Macapá, Amapá State. MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, relative condition factor de (Kn).RBC: Red blood cells.

Fish farms	1	2	3
Body weight (g)	715,7 \pm 103,6 ^{ab}	1.011,2 \pm 450,0 ^b	523,7 \pm 116,7 ^a
Body length (cm)	36,7 \pm 2,0 ^b	35,7 \pm 5,5 ^{ab}	31,2 \pm 2,5 ^a
Kn	0,99 \pm 0,02 ^a	1,04 \pm 0,05 ^b	1,00 \pm 0,01 ^a
Glucose (mg.dL ⁻¹)	93,9 \pm 27,5 ^a	128,4 \pm 32,6 ^a	100,3 \pm 24,1 ^a
Total protein (g.dL ⁻¹)	3,0 \pm 0,4 ^a	3,3 \pm 0,2 ^a	3,3 \pm 0,3 ^a
Hematocrit (%)	28,5 \pm 2,2 ^a	31,7 \pm 4,4 ^a	30,3 \pm 2,4 ^a
Hemoglobin (g.dL ⁻¹)	10,9 \pm 0,8 ^b	9,0 \pm 2,3 ^a	10,6 \pm 3,5 ^{ab}
RBC (x 10 ⁶ . μ L ⁻¹)	1,6 \pm 0,3 ^b	1,2 \pm 0,1 ^a	1,6 \pm 0,3 ^b
MCV (fL)	186,8 \pm 33,1 ^a	264,9 \pm 32,0 ^b	202,4 \pm 38,8 ^a
MCH (g.dL ⁻¹)	71,3 \pm 12,2 ^a	71,3 \pm 8,6 ^a	63,8 \pm 10,1 ^a
MCHC (g.dL ⁻¹)	38,4 \pm 3,5 ^b	26,9 \pm 4,2 ^a	29,0 \pm 4,6 ^a

Different letters in the same row indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between fish farms by Tukey's test.

In the blood of the tambacu of this study, thrombocytes, lymphocytes, monocytes, neutrophils, PAS-GLs and eosinophils were observed (Table 3), with similar characteristics to those described by Tavares-Dias et al. (8), for the same fish. In fish, thrombocytes are cells that are mainly involved in hemostasis, but may also remove damaged cells from the organism and may migrate to the induced inflammatory focus (13,31). In the tambacu of these three fish farms, the thrombocyte counts were similar to each other and lower than what was reported by Tavares-Dias et al. (4) for tambacu, but within the reference limits for tambacu described by Tavares-Dias (12).

Table 3. Thrombocyte and white blood cell counts (mean \pm standard deviation) of tambacu from three fish farms from Macapá, Amapá State. PAS-GL: PAS-positive granular leukocytes. WBC: White blood cells.

Fish farms	1	2	3
Thrombocytes (μ L)	30.425 \pm 14.638 ^b	54.624 \pm 20.026 ^a	27.888 \pm 20.142 ^a
WBC (μ L)	12.520 \pm 5.582 ^a	5.630 \pm 3.368 ^a	11.070 \pm 8.737 ^a
Lymphocytes (μ L)	10.626 \pm 4.642 ^a	4.845 \pm 2.331 ^{bc}	11.727 \pm 9.7129 ^{ac}
Monocytes (μ L)	723 \pm 526 ^a	488 \pm 575 ^a	176 \pm 310 ^a
Neutrophils (μ L)	414 \pm 382 ^a	454 \pm 382 ^a	125 \pm 578 ^a
Eosinophils (μ L)	291 \pm 344 ^a	229 \pm 411 ^a	67 \pm 98 ^a
PAS-GL (μ L)	560 \pm 510 ^a	8 \pm 16 ^b	39 \pm 102 ^b

Different letters in the same row indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between fish farms by Tukey's test.

Piscine white blood cells (WBC) may indicate the status of the immunological system, given that these cells perform a wide range of functions (13,31). Lymphocytes are involved in production of immunoglobulins and modulation of defenses. Monocytes are phagocytes that undergo migration to the inflammatory focus during infectious processes. Neutrophils are the first phagocytes to respond to infections, and in tambacu, they present alkaline phosphatase, peroxidase, esterase and glycogen. PAS-GLs are white blood cells with a strong reaction to Schiff's periodic acid and with little-known function in fish, but they may present elevated quantities in parasitized fish (13,31).

The tambacu hybrids on farm 2 had the lowest lymphocyte and PAS-GL counts, while the WBC, monocyte, neutrophil and eosinophil counts were similar among the fish on the three farms (Table 3). Moreover, the WBC, monocyte, neutrophil, PAS-GL and eosinophil counts were within the reference limits described by Tavares-Dias (12), for this same hybrid. However, neutrophils and monocytes are cells in constant movement between the circulation and tissues, because of their important participation in inflammatory processes together with other granulocytes (13,31). There may thus be greater variation between fish in different places.

CONCLUSIONS

This contribution on the blood parameters of tambacu hybrids cultivated on fish farms in the state of Amapá showed results that can possibly be used for comparisons in future studies on this fish and in other localities. However, other studies should be conducted in order to attain greater comprehension of the blood profile of tambacu at different stages of the development of this hybrid.

REFERENCES

1. Kubitz F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. *Panor Aquic.* 2004;14(82):27-39.
2. Kubitz F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. Parte 2. *Panor Aquic.* 2004;14(83):13-23.
3. Silva PC, Pádua DMC, França AF, Pádua JT, Souza VL. Milheto (*Pennisetum americanum*) como substituto do milho (*Zea mays*) em rações para alevinos de tambacu (híbrido *Colossoma macropomum* fêmea x *Piaractus mesopotamicus* macho). *Ars Vet.* 2000;16(2):146-53.
4. Tavares-Dias M, Moraes FR, Onaka EM, Rezende PCB. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. *Vet Arhiv.* 2007;77(4):355-63.
5. Silva RM, Tavares-Dias M, Dias MWR, Dias MKR, Marinho RGB. Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms. *Pesqui Agropecu Bras.* 2013;48(8):1049-57.
6. Ministério da Pesca e Aquicultura (BR). Produção pesqueira e aquícola. Estatística 2011. Brasília: MPA; 2013.
7. Tavares-Dias M. Piscicultura continental no estado do Amapá: diagnóstico e perspectivas. Macapá: Embrapa Amapá; 2011.
8. Tavares-Dias M, Schalch SHC, Martins ML, Onaka EM, Moraes FR. Haematological characteristics of Brazilian Teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg x *Colossoma macropomum* Cuvier) (Osteichthyes, Characidae). *Rev Bras Zool.* 2000;17(4):899-906.
9. Tavares-Dias M, Moraes FR. Biochemical parameters for *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Characidae) and hybrid tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*). *Cienc Anim Bras.* 2010;11(2):363-8.

10. Chagas EC, Val AL. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesqui Agropecu Bras.* 2003;38(3):397-402.
11. Sampaio FG, Boijink CL, Oba ET, Santos LRB, Kalinin AL, Rantin FT. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2008;147(1):43-51.
12. Tavares-Dias M. Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados. In: Tavares-Dias M, Mariano WS. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas.* São Carlos: Pedro e João Editores; 2015. vol.1. p.11-30.
13. Ranzani-Paiva MJT, Padua SB, Tavares-Dias M, Egami MI. *Métodos para análises hematológicas em peixes.* Maringá: UEM; 2013.
14. Sampaio FG, Boijink CL, Rantin FT. O uso do sulfato de cobre em ecossistemas aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2013. (Série documentos; nº 91).
15. Eiras JC, Takemoto RM, Pavanelli GC. *Métodos de estudos e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes.* 2a ed. Maringá: UEM; 2006.
16. Le-Cren ED. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *J Anim Ecol.* 1951;20:201-19.
17. Zar JH. *Biostatistical analysis.* 5th ed. New Jersey: Prentice Hall; 2010.
18. Moraes G, Avilez IM, Hori TSF. Comparison between biochemical responses of the teleost pacu and its hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) to short term nitrite exposure. *Braz J Biol.* 2006;66(4):1103-8.
19. Aride PHR, Roubach R, Val AL. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Res.* 2007;38:588-94.
20. Rotta MA, Queiroz JF. *Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes.* Corumbá: Embrapa Pantanal; 2003. (Série documentos; nº 47).
21. Rantin FT, Guerra CDR, Kalinin AL, Glass ML. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. *Comp Biochem Physiol.* 1998;119A:991-7.
22. Affonso EG, Polez VLP, Corrêa CF, Mazon AF, Araújo MRR, Moraes G, et al. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp Biochem Physiol.* 2002;133C:375-82.
23. Imbiriba EP, Lourenço Júnior JB, Carvalho LODM. *Parâmetros ambientais e qualidade da água na piscicultura.* Belém: Embrapa Amazônica Oriental; 2000. (Recomendações técnicas; nº 8).

24. Tavares-Dias M, Araújo CSO, Porto SMA, Viana GM. Sanidade do tambaqui *Colossoma macropomum* nas fases de larvicultura e alevinagem. Macapá: Embrapa Amapá; 2013. (Série Documentos; nº 78).
25. Guidelli G, Tavechio WLG, Takemoto RM, Pavanelli GC. Relative condition factor and parasitism in anostomid fishes from the floodplain of the Upper Paraná River, Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;177(1-2):145-51.
26. Yoshioka ETO. Cuidados essenciais no manejo alimentar de peixes redondos cultivados no Estado do Amapá. Macapá: Embrapa Amapá; 2014. (Comunicado técnico; nº 97).
27. Tavares-Dias M, Sandrim EFS. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. I. Série vermelha e dosagens de cortisol e glicose do plasma sanguíneo de espécimes de *Colossoma macropomum* em condições de cultivo. *Acta Sci.* 1998;20(2):157-60.
28. Chagas EC, Gomes LC, Martin Júnior H, Roubach R, Lourenço JNP. Desempenho de tambaqui cultivado em tanques-rede, em lago de várzea, sob diferentes taxas de alimentação. *Pesqui Agropecu Bras.* 2005;40(8):833-5.
29. Hrubec TC, Smith SA. Differences between plasma and serum samples for the evaluation of blood chemistry values in rainbow trout, channel catfish, hybrid tilapias, and hybrid striped bass. *J Aquat Anim Health.* 1999;11(2):116-22.
30. Pradhan SCA, Patra K, Pal A. Hematological and plasma chemistry of Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *J Appl Ichthyol.* 2014;30(1):48-54.
31. Santos RBS, Tavares-Dias M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (Pisces, Doradidae) oriundos da bacia do médio Rio Solimões, Estado do Amazonas (Brasil), naturalmente parasitados. *Bol Inst Pesca.* 2010;36(4):283-92.

Recebido em: 22/05/2016

Aceito em: 16/01/2017

IMPORTÂNCIA DA DIFERENCIAÇÃO DOS *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* E NÃO *AGALACTIAE* NAS MASTITES

Anelise Salina¹
Nathália Brancato Junqueira¹
Giulia Soares Latosinski¹
Gabriela Capriogli Oliveira¹
Sâmea Fernandes Joaquim¹
Renata Bonini Pardo²
Helio Langoni^{1*}

RESUMO

O leite é um alimento imprescindível para todas as faixas etárias. A mastite é um processo infeccioso de múltipla etiologia, com envolvimento de micro-organismos contagiosos e ambientais. Os estreptococos pertencem a um grupo de patógenos com diferentes espécies, e graus de patogenicidade e virulência. *Streptococcus agalactiae* é um patógeno contagioso, portanto, adaptado à sobrevivência interna na glândula mamária. Os estreptococos ambientais são considerados oportunistas, pois, após invasão da glândula mamária, não se adaptam em seu interior, causando resposta inflamatória imediata com infecção de curta duração. Apesar da diferenciação entre patógenos contagiosos e ambientais, é necessária a avaliação de outros fatores como: perfil da ocorrência da CCS, ocorrência de mastite clínica, pesquisa dos fatores de risco, e os resultados dos exames microbiológicos com a caracterização dos agentes causais. Amostras de leite com CMT positivo (n=123) foram cultivadas em ágar sangue bovino a 5% e ágar MacConkey por até 72 horas, a 37°C, com observação a cada 24 horas das características fenotípicas das colônias como tamanho, produção de pigmento, hemólise bem como a realização de Gram e prova de catalase para diferenciação entre os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Colônias suspeitas foram repicadas em BHI para provas bioquímicas, CAMP teste, hidrólise do hipurato de sódio e hidrólise da esculina. Foram isoladas 36 estirpes de *Streptococcus* spp., sendo 91,7% *Streptococcus agalactiae*, 5,6% *Streptococcus dysgalactiae* e 2,7% *Streptococcus uberis*.

Palavras-chave: ambiental, mastite, caracterização, provas bioquímicas.

IMPORTANCE OF DIFFERENTIATION OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* AND NOT *AGALACTIAE* IN THE MASTITIS

ABSTRACT

Milk is an essential food for all age groups. Mastitis is an infectious process with multiple etiologies, involving environmental and contagious microorganisms. Streptococci belonging to a group of micro-organisms of different types and degrees of pathogenicity and virulence. *Streptococcus agalactiae* is a contagious pathogen, therefore, adapted to survival in internal mammary gland. Environmental *Streptococcus* are considered opportunistic because once they invade the mammary gland, they cannot adapt inside it, causing an immediate inflammatory response with short-term infection. Despite the differentiation of contagious and environmental pathogens it is necessary to evaluate other factors such as profile of the

¹ Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

² Faculdade de Tecnologia do Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza - FATEC - Marília/SP

* Autor de contato: hlangoni@fmvz.unesp.br

occurrence of CCS, occurrence of clinical mastitis, research of risk factors, and the results of microbiological tests with the characterization of the causative agents. Milk samples positive in California Mastitis Test (n = 123) were cultured in blood agar media and MacConkey agar media for 72 hours, at 37° C, with observation every 24 hours in the phenotypic characteristics of the colonies such as size, pigment production, hemolysis, such as Gram and catalase test to differentiate between *Staphylococcus* and *Streptococcus*. Suspect colonies were picked in BHI for biochemical tests, CAMP test, sodium hippurate hydrolysis and hydrolysis of esculin. They were isolated 36 strains of *Streptococcus spp.*, being 91.7% *Streptococcus agalactiae*, 5,6% *Streptococcus dysgalactiae* and 2.7% *Streptococcus uberis*.

Keywords: environmental, mastitis, characterization, biochemical tests.

IMPORTANCIA DE LA DIFERENCIACIÓN DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE Y NO AGALACTIAE EN LA MASTITIS

RESUMEN

La leche es un elemento esencial para todos los grupos de edad. La mastitis es un proceso infeccioso con múltiples etiologías, que implican microorganismos ambientales y contagiosos. Los estreptococos que pertenece a un grupo de microorganismos de diferentes tipos y grados de patogenicidad y virulencia. *Streptococcus agalactiae* es un patógeno contagiosa, por lo tanto, adaptado para la supervivencia en la glándula mamaria interna. Los estreptococos del ambiente se consideran oportunistas, porque una vez que invaden la glándula mamaria no pueden adaptarse en su interior, provocando una respuesta inflamatoria inmediata con la infección a corto plazo. A pesar de la diferenciación de los patógenos contagiosos y ambientales es necesario evaluar otros factores tales como el perfil de la ocurrencia de CCS, la aparición de la mastitis clínica, la investigación de factores de riesgo, y los resultados de las pruebas microbiológicas con la caracterización de los agentes causantes. Las muestras de leche positivas en California Mastitis Test (n = 123) fueron cultivadas en medios de agar sangre y agar MacConkey durante 72 horas a 37 ° C con la observación cada 24 horas en las características fenotípicas de las colonias, tales como; tamaño, la producción de pigmentos, la hemólisis, como gramo y prueba de catalasa para diferenciar entre *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Las colonias sospechosas fueron recogidos en BHI para las pruebas bioquímicas, teste CAMP, hipurato de hidrólisis de sodio e hidrólisis de esculina. Fue aislado 36 cepas de *Streptococcus spp.*, 91,7% *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* 5,6% y 2,7% *Streptococcus uberis*.

Palabras clave: ambiental, mastitis, caracterización, pruebas bioquímicas.

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento imprescindível para todas as faixas etárias, pois se constitui em proteína de alto valor biológico, rico em vitaminas e sais minerais. O controle da sua qualidade inicia-se na etapa de obtenção da matéria prima (1), sendo que a primeira medida consiste na obtenção higiênica do leite de vacas sadias, que deverá ser resfriado à 4°C até no máximo duas horas após a ordenha, e que o seu armazenamento e transporte sejam realizados em condições adequadas de higiene e temperatura. Cuidados devem ainda ser tomados nas etapas de industrialização e comercialização para garantir a qualidade do produto final.

A mastite é um processo infeccioso complexo, multifatorial e de múltipla etiologia (2,3), com envolvimento de micro-organismos contagiosos e ambientais. Além dos aspectos econômicos, relacionados a esta doença, são importantes ainda os aspectos de saúde pública,

pois muitos micro-organismos presentes no leite oriundos principalmente de casos de mastites podem ocasionar infecções ou toxi-infecções de origem alimentar, devido a produção de toxinas, que não são inativadas pelos processos de pasteurização e fervura (4)

Os estreptococos pertencem a um grupo de micro-organismos com diferentes espécies e graus de patogenicidade e virulência. Muitos deles são importantes agentes de mastites, considerados como patógenos contagiosos. Alguns autores referem-se a *Streptococcus agalactiae* e não *agalactiae* e nesse último grupo estão os *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* classificados como estreptococos ambientais, e participam da microbiota intestinal sendo encontrados no ambiente em que as vacas são criadas. Há ainda os enterococos com várias espécies, sendo o mais conhecido o *Enterococcus faecalis*. Também como causador de mastite tem-se o *Streptococcus pyogenes*.

Streptococcus agalactiae é um patógeno contagioso, portanto, adaptado à sobrevivência interna da glândula mamária. Em sua maioria causam mastite subclínica com alta incidência nos rebanhos onde ainda não foi controlado. Ocorrem também casos clínicos intermitentes, porém com menor incidência (5). Mastites do tipo contagiosa se associam com o aumento da contagem de células somáticas (CCS) do tanque e este patógeno é isolado com frequência nessa situação, de acordo com Schukken et al. (6).

Os estreptococos ambientais são considerados oportunistas, pois após invasão da glândula mamária não se adaptam em seu interior, causando resposta inflamatória imediata com infecção de curta duração. A infecção de origem ambiental via de regra se origina no período seco e com frequência nas propriedades com CCS baixas no tanque há uma maior ocorrência desse tipo de mastite (6).

Apesar da distinção entre patógenos contagiosos e ambientais é necessário a avaliação de outros fatores como: perfil da ocorrência da CCS, ocorrência de mastite clínica, pesquisa dos fatores de risco, e os resultados dos exames microbiológicos com a caracterização dos agentes causais (7). Desta forma pode-se avaliar melhor o padrão de transmissão da mastite, que deve ser realizado a nível de rebanho e não somente nas características dos patógenos envolvidos.

Quanto a etiologia das mastites por estreptococos a prevalência é variável como *Streptococcus agalactiae* em 10,1% entre 10648 amostras analisadas e de *Streptococcus* spp. 7,3% entre 7646 amostras (8). O resultado da pesquisa de Souto (9) revelou entre outros patógenos, 5,34% de *Streptococcus* spp. Especificamente quanto ao encontro de *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* há a citação de <10% de isolamento de ambos (10).

No Brasil trabalhando com 6315 amostras de leite, isolou-se *Streptococcus agalactiae* em 6,9% das amostras e pela prova de esculina 4% eram de *Streptococcus* esculina positivos e 2,1% esculina negativos, tratando-se, portanto, de estreptococos ambientais (11). O diagnóstico microbiológico permite conhecer a microbiota presente nos casos de mastites e deve fazer parte de um programa de controle dessa enfermidade na propriedade (12), pois orienta para as medidas que devem ser tomadas.

O isolamento de patógenos causadores de mastites em amostras de leite colhidas assepticamente é o método padrão para o seu diagnóstico, especialmente útil se complementado com os testes de sensibilidade *in vitro*. Há muita discussão com relação ao diagnóstico microbiológico da mastite na rotina de granjas leiteiras, pelo alto custo do exame e urgência na escolha da terapia. A avaliação de sensibilidade *in vitro* dos patógenos envolvidos nas mastites tem a sua devida importância, entretanto, deve-se considerar que há divergência nos resultados de acordo com a região e os agentes envolvidos e antimicrobianos testados. Apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para o tratamento de mastites, observa-se grande resistência aos antimicrobianos pelo uso inadequado e indiscriminado destes.

Na rotina laboratorial são utilizados os meios de ágar-sangue adicionado de 5 a 8% de sangue ovino ou bovino e Agar MacConkey sendo este último seletivo para enterobactérias. Na interpretação dos resultados nos valem da observação das características fenotípicas avaliando-se as características da colônia, como o tamanho, produção de pigmento e, hemólise.

As características morfológicas pela técnica de Gram permitem a caracterização entre alguns grupos de micro-organismos Gram positivos e Gram negativos, aspecto que auxilia na diferenciação entre os contagiosos e a maioria dos ambientais. Entretanto, quando se está frente aos *Streptococcus* spp, que podem desenvolver hemólise dos tipos β e α ou ainda serem não hemolíticos, fica difícil a sua identificação. Temos observado na rotina laboratorial que muitas vezes *Streptococcus* com α hemólise são caracterizados por provas bioquímicas como *Streptococcus agalactiae*, bem como casos de *Streptococcus* não hemolíticos que ao final da avaliação, se caracterizam como *Streptococcus agalactiae*.

Se na prática, tem-se por definição que tanto *Streptococcus dysgalactiae* como *uberis* são α hemolíticos, e considerados como ambientais, como avaliamos epidemiologicamente a origem da infecção? Concordamos que a caracterização do agente infeccioso é importante no conceito de epidemiologia molecular e que devemos lançar mão de ferramentas cada vez mais sensíveis para concluir quais são as espécies de patógenos causadores das mastites no rebanho, e assim poder lançar mão de medidas eficazes para o controle. Tanto isso é verdade que hoje há diferentes técnicas para caracterização de patógenos, e muitas delas envolvem a proteômica, como a Espectrometria de Massa por Ionização e Dissociação à Laser Assistida por Matriz de Voo (MALDI/TOF – MS), de grande aplicabilidade para identificação de micro-organismos causadores de mastite (13,14).

O diagnóstico microbiológico praticado na fazenda, como vem sendo utilizado em algumas propriedades, pode não revelar de fato a diferenciação entre os patógenos e conseqüentemente redundando no diagnóstico errôneo das espécies de *Streptococcus*, já que a avaliação pela produção ou não de hemólise não assegura a diferenciação entre estreptococos ambientais e contagiosos.

De acordo com Britten (15) é importante a diferenciação de *Streptococcus agalactiae* dos diversos *Streptococcus*, do ponto de vista de diagnóstico e controle porque esse pode ser controlado e até erradicado dos rebanhos, entretanto, com relação as demais espécies tal fato é impraticável, já que eles não respondem as mesmas medidas de prevenção e controle.

Dessa forma, objetivou-se destacar o perfil microbiano de uma propriedade leiteira, que revelou além do isolamento de diferentes espécies de estafilococos, também de estreptococos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite bovino com resultado de CMT positivo com graus variáveis, de uma a três cruces (n=123), foram cultivadas em ágar sangue bovino a 5% e ágar MacConkey por até 72 horas, à 37°C com observação a cada 24 horas das características das colônias, como tamanho, produção de pigmento, hemólise e realização de Gram e prova de catalase para diferenciação entre os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

As amostras de leite foram colhidas em propriedades leiteiras com 140 vacas holandesas em diferentes estágios e número de lactações com problema de mastites clínicas. Essas amostras foram colhidas por um profissional, médico veterinário, interessado em conhecer a microbiota na mastite subclínica da referida propriedade, localizada na região de Marília, São Paulo. Em todos os casos os micro-organismos foram repicados em BHI para realização de provas bioquímicas e estudos de perfil de sensibilidade microbiana (dados não apresentados).

Às 48 horas, nova avaliação foi realizada, observando-se as mesmas características, e procedimento de novos repiques de outros tipos de micro-organismos isolados, como *Corynebacterium* spp, quando o caso. A caracterização dos estreptococos foi realizada de

acordo com Quinn et al. (16), com base em teste de CAMP, hidrólise da Biliesculina e hidrólise da Esculina (Figura 1).

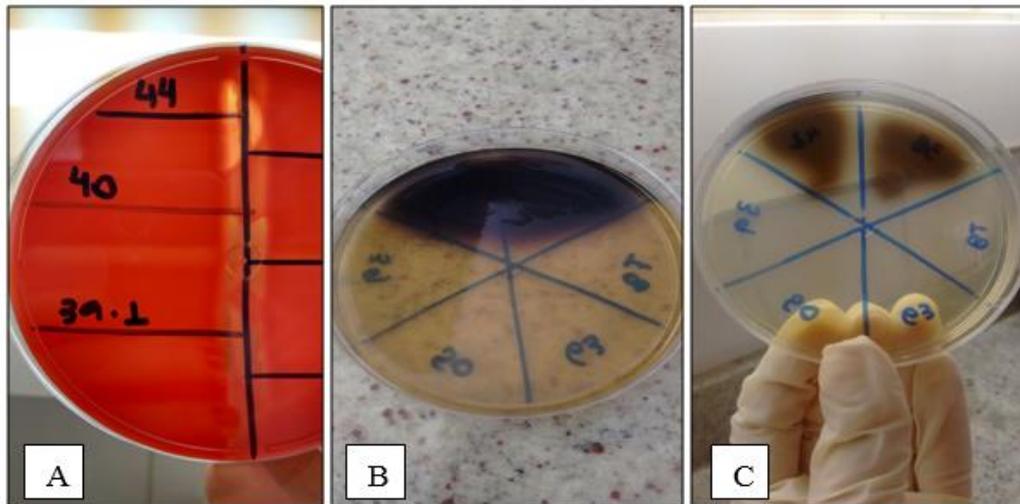


Figura 1. A. CAMP teste; B. Hidrólise da Biliesculina; C. Hidrólise da Esculina

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 36 estirpes de *Streptococcus* spp. (29,3%) sendo, 33 (91,7%) caracterizadas como *Streptococcus agalactiae*, 2 (5,6%) como *Streptococcus dysgalactiae* e 1 (2,7%) como *Streptococcus uberis*. O que chamou a atenção é que em 20 (60,6%) dos casos não houve a produção de hemólise (Figura 2) e que em 1 (3,0%) a hemólise era do tipo α , com produção de pigmento esverdeado ao redor da colônia e, hemólise parcial e não β , o que para muitos é uma característica que define o *Streptococcus agalactiae*. A caracterização revelou uma porcentagem considerável de casos onde o micro-organismo, pelas características de colônia e hemólise, sugeria a identificação como *Streptococcus* não *agalactiae*, que na realidade, bioquimicamente, foram caracterizados como *Streptococcus agalactiae*.



Figura 2. *Streptococcus agalactiae* com produção de hemólise do tipo β (beta).

Observou-se ainda que alguns dos isolados com produção de α (alfa) hemólise às 24 horas intensificavam a produção de hemolisina, tendendo a mostrar-se como β hemólise, mas não verdadeira, se comparável à β hemolisina produzida por estirpes de *Staphylococcus aureus* às 24 horas, por exemplo. Ao se avaliar somente pelas características da colônia e coloração de Gram, há chances de erro na diferenciação dos estreptococos, tanto nos casos subclínicos como clínicos de mastites, impedindo a definição correta quanto ao perfil epidemiológico do agente, ou seja, se de origem contagiosa ou ambiental.

Desta forma sugere-se a associação de provas bioquímicas capazes de classificar corretamente as espécies de estreptococos envolvidos nas mastites, ou de outras ferramentas diagnósticas envolvendo técnicas moleculares ou a proteômica como a espectrometria de massa.

CONCLUSÕES

Conclui-se pela importância das avaliações fenotípicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares dos micro-organismos causadores de mastite, principalmente no caso do gênero *Streptococcus* spp para melhor entendimento dos aspectos epidemiológicos relacionados às infecções intramamárias, para a correta avaliação epidemiológica e orientação de medidas de controle.

REFERÊNCIAS

1. Chambers JV. The microbiology of raw milk. In: Robinson RK. Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons; 2002. p.39-90.
2. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 1988;16:41-66.
3. Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Domingues PF. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. *Rev Bras Med Vet.* 1998;20:204-10.
4. De Freitas Guimarães F, Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, De Figueiredo JC, Pantoja N, et al. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci.* 2013;96:2866-72.
5. Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J.* 2002;164:116-28.
6. Schukken YH, Leemput ES, Moroni P, Welcome F, Gurjar A, Zurakowski M, et al. Contagious or environmental: a herd diagnosis. In: Proceedings of the 27o World Buiatrics Congress; 2012; Lisboa. Lisboa: APB; 2012. p.145-8.
7. Schukken YH, González RN, Tikofsky LL, Schulte HF, Santisteban CG, Welcome FL, et al. CNS mastitis: nothing to worry about? *Vet Microbiol.* 2009;134:9-14.
8. Wilson DJ, Gonzales RN, Das HH. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and Milk production. *J Dairy Sci.* 1997;80:2592-8.
9. Souto LIM. Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.
10. Schepers AJ, Lam TJGM, Schukken YH, Wilmink JBM, Hanekamp WJA. Estimation of variance components for somatic cells counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J Dairy Sci.* 1997;80:1833-40.
11. Brito MAV, Brito JRF, Ribeiro MT, Veiga VMO. O padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamário das vacas em lactação. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1999;51:129-35.

12. Langoni H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33:620-6.
13. Gonçalves JL, Tomazi T, Barreiro JR, Braga PAC, Ferreira CR, De Araújo Júnior JP, et al. Produção e composição do leite de vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp. *Vet Zootec.* 2013;20:141-2.
14. Barreiro JR, Braga PAC, Tomazi T, Gonçalves JL, Ferreira CR, Eberlin MN, et al. Identificação rápida de micro-organismos causadores de mastite por espectrometria de massas. *Vet Zootec.* 2013;20:210-1.
15. Britten AM. The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012;28:187-202.
16. Quinn PJ, Carter ME, Markey B. *Clinical veterinary microbiology.* London: Wolfe; 1994. p.237-42.

Recebido em: 16/03/2016

Aceito em: 22/02/2017

***Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) INFECTION IN CATS FROM A
BRAZILIAN SOUTHEASTERN ENDEMIC AREA FOR CANINE AND HUMAN
LEISHMANIASIS**

Luciana C Baldini-Peruca¹
Simone Baldini Lucheis²
Rozeani O Tome¹
Virgínia Bodelão Richini-Pereira³
Ana Paula F. L. Correa¹
Marcella Z Troncarelli¹
Rodrigo Costa da Silva⁴
Helio Langoni^{1*}

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an important zoonosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) in Americas and transmitted by *Lutzomyia longipalpis*, genus phlebotomines. The diagnosis of *Leishmania* infection in cats is very important to better comprehend the role of felines on LV's epidemiological chain. This study aimed to determine the occurrence of *L. infantum* (syn. *chagasi*) in 109 cats from Birigui, SP, Brazil, an endemic area for canine and human leishmaniasis, by using Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), hemoculture and Polymerase Chain Reaction (PCR). Fifty two (47.7%; CI95% 38.6-57.0%) samples were positive by the hemoculture, three (2.8%; CI95% 1.0-7.8%) by IFAT and 17 (15.6%; CI95% 10.0-23.6%) by PCR. According to the results, we can conclude that cats from endemic areas for the infection can be frequently exposed to the agent and suggest the importance of these animals in the epidemiological cycle, demonstrating the need for further research and diagnostic alternatives to aid in the establishment of preventive steps to control this disease.

Keywords: cats, leishmaniasis, IFAT, hemoculture, PCR.

**INFECÇÃO POR *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) EM GATOS PROVENIENTES
DE UMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE CANINA E HUMANA, NA
REGIÃO SUDESTE DO BRASIL**

RESUMO

Leishmaniose visceral (LV) é uma importante zoonose causada por *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) nas Américas e transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. O diagnóstico da infecção por *Leishmania* em gatos é muito importante para a melhor compreensão do papel dos felinos na cadeia epidemiológica da LV. Este estudo objetivou determinar a ocorrência de *L. infantum* (syn. *chagasi*) em 109 gatos domésticos de Birigui-SP, Brasil, uma área endêmica para leishmaniose canina e humana, utilizando o Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), hemocultura e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Cinquenta e dois (47,7%; CI95% 38.6-57.0%) amostras foram positivas pela hemocultura; três (2.8%; CI95% 1.0-7.8%) pela IFI e 17 (15.6%; CI95% 10.0-23.6%) pela PCR. De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que gatos provenientes de áreas endêmicas

¹ School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP Univ Estadual Paulista, Department of Veterinary Hygiene and Public Health, Botucatu SP, Brazil.

² São Paulo Agency of Agribusiness Technology, Bauru, São Paulo, Brazil.

³ Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory of Bauru, Bauru SP, Brazil.

⁴ Department of Pathobiology and Population Medicine, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Mississippi State MS, USA.

* Corresponding author: hlangoni@fmvz.unesp.br

para leishmaniose podem estar frequentemente expostos ao agente e sugerem a importância desses animais no ciclo epidemiológico, demonstrando a necessidade de pesquisas e alternativas de diagnóstico para auxiliar no estabelecimento de medidas preventivas de controle da doença.

Palavras-chave: gatos, leishmaniose, RIFI, hemocultura, PCR.

LA INFECCIÓN POR *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) EN LOS GATOS DE UNA ZONA ENDÉMICA PARA LEISHMANIASIS CANINA Y HUMANA EN EL SURESTE DE BRASIL

RESUMEN

La leishmaniasis visceral (LV) es una zoonosis importante causada por *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) en las Américas, y transmitida por flebótomos del género *Lutzomyia*. El diagnóstico de la infección por *Leishmania* en los gatos es importante para una mejor comprensión del papel de los gatos en la cadena epidemiológica de LV. Este estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de *L. infantum* (syn. *chagasi*) en 109 gatos de Birigui - SP, Brasil, una zona endémica de leishmaniasis canina y humana, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemocultivo y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Cincuenta y dos (47,7% ; IC95 % 38,6-57,0 %) muestras fueron positivas por el hemocultivo, tres (2,8 % ; IC 95 % 1,0-7,8 %) por el IFI y 17 (15,6 % ; IC95 % 10,0-23,6 %) por PCR. De acuerdo con los resultados presentados, puede concluir que los gatos de zonas endémicas para la infección pueden ser expuestos con frecuencia al agente y sugieren la importancia de estos animales en el ciclo epidemiológico, lo que demuestra la necesidad de investigación y alternativas diagnósticas para ayudar en el establecimiento de medidas preventivas para controlar esta enfermedad.

Palabras clave: gatos, leishmaniasis, IFI, hemocultivo, PCR.

INTRODUCTION

Leishmaniasis have a large impact on the public health, being endemic in 98 countries or territories, with more than 350 million people at risk, affecting humans, as well as wild and domestic animals including dogs and cats (1). Among the domestic animals, dogs are involved in domestic transmission to humans, especially in cases of infection by *Leishmania chagasi* (2). However, the accelerated urbanization of the infection, other domestic species were found in the epidemiology in endemic foci, including the cat (3).

Several diagnostic methods have been used for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis (VL) in dogs and humans (4). Hemoculture is a parasitological test that requires the presence of parasites in a sufficient amount to be visible in an optical microscope. Such parasitological exams enable the visibility of amastigotes of the parasite, even inside macrophages or in a free form (5). Serological exams such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the indirect fluorescent antibody test (IFAT) are indirect diagnostic tests, detecting antibodies to *Leishmania* spp. Polymerase chain reaction (PCR) is a sensitive and highly specific method for detecting the DNA of the parasite (6,7).

According to the Information System for Reportable Diseases (8), in 2009 and 2010 there were 23 and 20 human VL cases reported and confirmed, respectively, in the city of Araçatuba, 11 km from Birigui, an endemic area for canine and human visceral leishmaniasis. In Birigui, only one human VL case was reported and confirmed in 2009 and three in 2010.

It is important to know the role of the cat in the epidemiological chain of VL; therefore, we proposed to determine the prevalence of VL in cats from a Brazilian endemic area.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

Blood samples were collected by cephalic venipuncture from 109 domesticated cats, (46 males and 63 females) randomly selected, without preference for age and breed. This material was assayed for all testes used in this study. The blood was divided into vacutainer flasks (BD Vacutainer®, USA), with and without EDTA. The blood samples with EDTA were separated in aliquots and processed for hemoculture and molecular methods. Those samples without EDTA were immediately centrifuged at 1600g for 15 minutes, and the serum samples were kept frozen at 20°C until the moment of serological test.

All cats from 14 residences were submitted to clinical exam, before the blood collection. They were examined for the detection of weight loss, lymphadenopathy, hepatomegaly and splenomegaly, and information about health management (worming, vaccination and castration). Epidemiological questions were also applied. These questions were related to the residential zone of the animal, physiological status, living environment, feeding type, nocturnal habits and contact with other animals from the same and other houses.

Hemoculture

Three tubes with 5mL of sterile liver infusion tryptose medium (LIT) were used in a laminar flow chamber. The plasmatic portion was removed with a 1ml sterile syringe, and transferred slowly to the first tube. This procedure was repeated for the leukocytes portion, which was transferred to the second tube and, equally for the erythrocyte sediment, to the third tube. All tubes were identified with the respective number of animals. The cultures were kept in an incubator at 28-30°C, until four months after the inoculation, when they were submitted to the molecular technique.

Ten days after inoculation of the sample, the first reading was carried out, taking five microliters from each tube of inoculated culture, placing it between the coverslip and slide, and performing the reading of at least five slides per tube. The observation was made in an optical microscope using 400X magnification. Positive samples were defined at those presenting at least one flagellated structure similar to Trypanosomatidae. The cultures were observed every two weeks, for four months. The positive cultures were immediately processed for extraction of parasitic DNA, as were the negative cultures, after the end of four months of monitoring the readings (9).

Serology

The research for *Leishmania* spp. IgG antibodies was performed by the indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), according to Camargo (10). using a cut-off titer as 40 (11). Additionally, a goat anti-cat IgG (h&l) antibody FITC conjugated, A20-120F (Erviagas, Brazil) was used. For the test, *L. major* antigen, kept by week passages at the Zoonoses Research Nucleus (NUPEZO), FMVZ - UNESP, was used (12). Positive and negative controls were also used. Positive reaction was considered when at least 50% fluorescent promastigotes per field was found, presenting fluorescence around the entire membrane.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA was extracted from hemoculture samples using the commercial kit Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare, USA) according to the instructions of the manufacturer, with some adaptations and the DNA concentration was measured by NanoVue™ (GE Healthcare, USA).

Each 0.2µL microtube was prepared with the PCR mixture composed by 1X PCR buffer (10mM Tris HCl pH 8.0, 50mM KCl), 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 10µM of each primer, 0.5U Platinum *Taq* DNA polymerase, 10ng DNA template, in a total volume of 25µL. For specific detection of *L. chagasi*, the species-specific primers LC14 (5'-CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG-3') and LC15 (5'-TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA-3'), directed to minicircle kinetoplast DNA (kDNA) of *L. chagasi* was used (FMVZ-UNESP). The amplification protocol was: 94°C for 4min, 40 cycles at 94°C for 30s, 59°C for 30s, and 72°C for 30s, and a final extension at 70°C for 10min (13,14).

All amplifications were performed in a MasterCycler EP gradient (Eppendorf, USA). Negative controls were composed by DNA extraction ultrapure water and DNA extraction *T. cruzi* that was added to the mix-PCR. The sequences were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose with ethidium bromide (10mg.mL⁻¹) gel stained (GIBCO, USA), and visualized in an image analyser, GelDoc-IT™ Imaging System (UVP, USA), by using VisonWorks®LS Software.

Statistical analysis

All epidemiological data and results of the IFAT, hemoculture and PCR were inserted in an Excel spreadsheet. The associations between epidemiological variables and the PCR results were analyzed by chi-square (χ^2) or Fisher exact test, considering the significance level (α) of 7% (15). Statistics related to the performance of results obtained by IFAT, hemoculture and PCR were calculated by the use of PCR as the gold-standard, using the spreadsheet described by Mackinnon (16), considering α of 5%. All tests were performed in EpiInfo™ v.3.5.1 software.

RESULTS

Seventeen samples (15.6%; CI95% 10.0-23.6%) were positive by PCR. Of the 109 blood samples submitted to hemoculture, 52 (47.7%; CI95% 38.6-57.0%) were positive. The values for sensitivity and specificity were 88.2 and 59.8%, respectively, with a fair concordance ($\kappa = 26.1\%$).

Only three serum samples (2.7%; CI95% 1.0-7.8%) presented specific antibodies for *Leishmania* spp. by the IFAT, with titer 40. The respective sensitivity and specificity values from IFAT, were 11.8 and 98.9%. The observed concordance was slight ($\kappa=16.1\%$).

Analyzing the clinical signs, 8/109 (7.4%; CI95% 3.8-13.8%) presented emaciation, 1/109 (0.9%; CI95% 0.2-5.0%) hepato/splenomegaly and 100/109 (91.7%; CI95% 85.0-95.6%) did not present any clinical alteration. From eight cats with emaciation, three (37.5%; CI95% 13.7-70.1%) presented *L. chagasi* DNA, one (12.5%; CI95% 2.8-48.3%) was seropositive by IFAT and four (50%; CI95% 21.2-78.8%) were positive in hemoculture. Fourteen (14%) cats positive by PCR, two (2%) positive by IFAT and 57 (57%) positive by hemoculture were asymptomatic.

The results on vaccination, worming, house area location, sterilization, environment in which the cat lives, food type, nocturnal habits and contact with other animals from the same house did not present significant difference ($P > 0.05$) compared to PCR results. In other way, the variable "contact with animals from other houses" presented significant difference, with OR = 2.9 ($P = 0,06$).

DISCUSSION

The absence of a significant difference between leishmaniasis and most of the epidemiological questions suggests little interference between susceptibility to the agent and the environment, lifestyle or cat diet type. Concerning to the contact with animals from other houses, it was observed that cats with this type of contact have 2.9 more chances (OR=2.9; Baldini-Peruca LC, Luchesi SB, Tome RO, Richini-Pereira VB, Correa APFL, Troncarelli MZ et. al. *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) infection in cats from a brazilian southeastern endemic area for canine and human leishmaniasis. *Vet. e Zootec.* 2017 mar.; 24(1): 216-225.

$P=0.06$) to be infected, with a PCR positive result, than the others. This data emphasizes the problem of public health when an owner or the neighborhood do not adopt sanitary measures for the destination of the organic materials, being accumulated, attracting the sand fly vector, *Lutzomyia longipalpis*, that increases the susceptibility of the animals and the humans from surrounding area.

Although hemoculture has emerged as an alternative for improving the positivity of indirect parasitological methods, Passos et al. (17) did not obtain success in culture in NNN from a lesion biopsy fragment and, interdigital region of a cat. Savani et al. (18) did not detect parasites in preparations of liver and spleen fragments inoculated in blood agar with brain-heart infusion. Nevertheless, Souza et al. (19) observed innumerable promastigote forms in NNN cultures aspirated from nodules located in the region of the nose, ears and interdigital area of a feline. The greatest problem is the contamination by bacteria and/or fungi and, due to this, it is a technique that requires aseptic conditions for the collection and handling of blood samples, in addition to such other limitations as prolonged time until the final result (four months) (20,21,22).

Fifty-two (47.7%; CI95% 38.6-57.0%) samples showed flagellated structures similar to leishmania. The flagellated forms observed in the 37 samples found negative by PCR and in the 51 negative by IFAT may be from other non-*Leishmania chagasi* Trypanosomatidae, due to the phylogenetic proximity among these parasites, namely belonging to the same family, since similar morphological presentation in culture media is also registered by Luciano et al. (23). Furthermore, the hemoculture possesses low sensitivity, and is capable of generating negative or false-negative results, particularly when the parasitemia is low, which hinders the visualization of parasites by optical microscopy. However, the present study obtained an elevated sensitivity value. The hemoculture sensitivity and specificity observed by Braga (24) were 69.4% and 71.4%, respectively.

From the 57 negative hemocultures, 55 presented negative results equivalent to those obtained by PCR, with the hemoculture technique presenting 59.8% specificity and 88.2% sensitivity. Only two cats were negative by hemoculture and positive by PCR, on account of the two samples not showing flagellated Trypanosomatidae, although *Leishmania* spp. antibodies were detected by IFAT (titer 40). Both results stem from the low parasite load at that moment of sampling.

The seropositivity in only 2.7% cats was superior not only to the data reported by Figueiredo et al. (13) who observed 0% positive results in serum samples of 43 cats from Barra Mansa, RJ, Brazil, by IFAT, but also the data observed by Poli et al. (25) in an Italian study with 0.9% positivity in 110 felines by IFAT. In Campo Grande, MS, Brazil, Braga³ reported a seroprevalence of 30% by IFAT in 50 feline blood samples, with titers varying from 40 to 320, compared to Oliveira et al. (26) that found 45/89 (50.6%; CI 95% 40.3-60.7%) positive cats in the same State. Da Silva et al. (3) utilizing IFAT to examine eight serum samples from cats, obtained two (25.0%) samples positive for *Leishmania* spp., with titers ranging from 40 to 320. Maroli et al. (27) detected seropositivity of 10.7 and 13.0% by IFAT in blood samples from cats in two studies carried out in Fortaleza (Ceará state, Brazil). In Europe, specifically the southern region of Spain, in 2007, Martín-Sanchez et al. (28) found 28.3% seroprevalence by IFAT in 183 cats examined. Maia et al. (29) observed 17.3% seropositivity in 23 cats evaluated in Portugal. In Spain, Ayllon et al. (30) detected *Leishmania* spp. antibodies by IFAT in ten of the 233 cat blood samples evaluated, with seroprevalence of 4.3%, a percentage higher than that observed in the present study.

Analyzing the three positive feline blood samples by IFAT, only two (66.6%) was positive by PCR. This is due to the probable occurrence of an infection or exposition by another *Leishmania* spp. or non-*Leishmania* spp. Cross reactions between *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp, detected by IFAT are reported in diverse studies (23,30,31,32).

One hundred and six samples were not reactive by IFAT for *Leishmania* spp., of which fifteen (14.2%; CI95% 8.8-22.1%) presented the DNA of the parasite *L. chagasi*. The sensitivity and specificity of IFAT were 11.8 and 98.9%, respectively, with PCR being considered the gold-standard. Braga (24) obtained a lower specificity value (70%) upon evaluating 50 cats in Campo Grande, MS, Brazil, as well as 80.6% sensitivity and 78.6% specificity by IFAT among 50 dogs from the same region. Costa et al. (33) evaluated 200 cats in Araçatuba, SP, Brazil, another endemic region for canine and human VL, and observed an 11.5% prevalence of the infection by the ELISA with sensitivity and specificity values of 25 and 89%, respectively, utilizing the direct parasitological exam as the gold-standard. These researchers concluded that the immune response to the *Leishmania* spp. infection in cats differs from that observed in dogs, whose sensitivity and specificity values in the serological methods are greater, which may explain the small number of cats that were infected and symptomatic (33).

The serology of infected cats is generally less specific than in dogs, since the production of antibodies for *Leishmania* spp. is lower, enabling the persistence of seronegativity. Furthermore, the appearance of antibodies leads to a variable period after the establishment of the infection. Nevertheless, they become distinctly elevated after the development of clinical signs or starting from the moment at which it is possible to isolate the parasite. It must also be taken into account that a significant portion of the population never develops high titers in response to the infection and neither becomes clinically sick nor transmits the parasite (34).

Although the serology validates the diagnosis of canine VL, the detection of circulating *Leishmania* spp. antibodies in cats is not equally observed in this species and, therefore, is not sufficient to determine *Leishmania* spp. infection in cats (35). Furthermore, the low specificity of IFAT observed in the present study suggests that this technique without association with the molecular test, can underestimate the true number of infected cats, thereby facilitating the transmission of the parasites. Serological surveys carried out by different techniques demonstrated that the prevalence of *Leishmania* spp. antibodies in cats assayed throughout the world ranged from zero to 68% (27). Feline studies that determine sensitivity and specificity values by IFAT are scarce. Thus, it becomes necessary to augment research studies that aim to associate the serological and molecular diagnostic methods in order to elucidate sensitivity and specificity of techniques for cats.

The DNA of *L. chagasi* was detected in 17/109 (15.6%; CI95% 10.0-23.6%) cat blood samples. This result is markedly lower than the findings of Maia et al. (28) who observed the presence of *Leishmania* spp. DNA in 7/23 (30.4%; CI95% 15.6-51.1%) cat blood samples. On the other hand, it is close to the report by Maia et al. (28) that detected *L. infantum* DNA in 28/138 (20.3%; CI95% 14.4-27.8%) cats in Lisbon, Portugal. Ayllon et al. (29) detected DNA of *L. infantum* in only 1/233 (0.4%; CI95% 0.1-2.4%) cats.

Out of the 92 cats negative by PCR only one (1.1%; CI95% 0.3-5.8%) was positive by IFAT and 37 (40.2%; CI95% 30.8-50.5%) by hemoculture. These results for culture and PCR may occur due the cross-reactions with other *Leishmania* spp. and non-*Leishmania* spp. Trypanosomatidae.

In 17 blood samples of the 109 cats evaluated, *L. chagasi* DNA was detected, of which 15 (88.2%; CI95% 65.3-96.4%) tested positive in hemoculture and two (11.8%; CI95% 3.6-34.7%) presented *Leishmania* spp. antibodies. Coelho et al. (6) reported the first case of feline leishmaniasis in Andradina, SP, Brazil, another endemic area for canine and human VL, in which *L. chagasi* DNA was detected from aspiration cytology of the popliteal lymph node. Despite detecting DNA from the parasite by PCR, the IFAT was not reactive for *Leishmania* spp. The difficulty of to observe the parasite in an optical microscope, from hemoculture samples and the probable resistance of cats to the agent, justify the results observed in this study.

Costa et al. (33) found clinical alterations in 25% of the cats seropositive for *Leishmania* spp. Portús et al. (36) registered that the number of cats infected and symptomatic is small, corroborating with these and our data. There was a statistically significant difference only between the results from asymptomatic animals and those obtained by IFAT and PCR.

CONCLUSIONS

The results indicate the occurrence of *Leishmania chagasi* in cats from Birigui/SP, an endemic area for canine and human visceral leishmaniasis, where most of the positive cases were associated with the contact with animals from other houses, which increases the risk for public health.

The association of the three diagnostic methods proved to be crucial for improving the diagnostic accuracy of leishmaniasis in the studied cats.

It is suggested that more studies are necessary to determine the true role of cat in the epidemiological cycle of visceral leishmaniasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for providing the Masters scholarship, and the technical team of the Center for the Control of Zoonoses (CCZ) from Birigui/SP, Brazil, for the help with the studied animals.

REFERENCES

1. World Health Organization. Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: WHO; 2010. p.22-6. (Report; n°. 949).
2. Simões-Mattos L, Teixeira MJ, Costa DC, Prata Jr JR, Bevilaqua CM, Sidrim JJ, et al. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). Vet Parasitol. 2002;103:207-16.
3. Da Silva AVM, Cândido CDS, Pereira DP, Brazil RP, Carreira JCA. The first record of american visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. Acta Trop. 2008;105:92-4.
4. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004;7:338-49.
5. Simões-Mattos L, Mattos MRF, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CML, Prata Jr RC, et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. Vet Parasitol. 2005;127:199-208.
6. Coelho WMD, Lima VMF, Soutel RVG, Amarante AFT, Gennari SM, Meireles MV, et al. Ocorrência de anticorpos contra *Leishmania* spp. em gatos domésticos do município de Andradina-SP-Brasil. Vet Zootec. 2008;15:75.
7. Ikonopoulou J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Vet Parasitol. 2003;113:99-103.

8. Ministério da Saúde (BR). Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose visceral: casos notificados confirmados no Sinan [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2004 [cited 2016 Mar 5]. Available from: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>.
9. Luz ZMP. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:295-8.
10. Camargo ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev Bras Patol Clin. 1974;10:143-71.
11. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. (Série A. Normas e manuais técnicos).
12. Rosypal AC, Cortés-Vecino JA, Gennari SM, Dubey JP, Tidwell RR, Lindsay DS. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. Vet Parasitol. 2007;149:172-7.
13. Figueiredo FB, Bonna IC, Nascimento LD, Costa T, Baptista C, Pacheco TM, et al. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42:141-5.
14. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2002;40:210-5.
15. Triola MF. Introdução à estatística. 9a ed. Rio de Janeiro: LTC; 2005.
16. Mackinnon DP. Introduction to statistical mediation analysis. New York: Routledge Academic; 2000.
17. Passos VMA, Lasmar EB, Gontijo CMF, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91:19-20.
18. Savani ES, Camargo MCO, Carvalho MR, Zampieri RA, Santos MG, D'Auria SR, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2004;120:229-33.
19. Souza AI, Barros EMS, Ishikawa E, Ilha IMN, Marin GRB, Sundar S, et al. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin Diag Lab Immunol. 2002;9:951-8.
20. Chiari E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:299-300.
21. De Carli GA. Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico de parasitoses humanas. Rio de Janeiro: Atheneu; 2001.

22. Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of North-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90:129-32.
23. Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2009;46:181-7.
24. Braga ARC. Hemocultura, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação em cadeia pela polimerase para *Leishmania* spp. em cães e gatos provenientes de área endêmica e não endêmica para leishmaniose [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2009.
25. Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol.* 2002;106:181-91.
26. Oliveira ALL, Paniago AMM, Dorval MCE, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;39:446-50.
27. Maroli M, Penissi MG, Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2007;145:357-60.
28. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol.* 2007;145:267-73.
29. Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8:555-9.
30. Ayllon T, Tesouro MA, Amusatogui I, Villaescusa A, Rodrigues-Franco F, Sainz A. Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1149:361-4.
31. Beard CB, Pye G, Steurer FJ, Rodriguez R, Campman R, Peterson AT, et al. Chagas disease in a domestic transmission cycle, southern Texas, USA. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:103-5.
32. Silveira TGV, Teodoro U, Lonardoni MVC, Toledo MJD, Bertolini DA, Arraes SMAA, et al. Investigação sorológica em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, Sul do Brasil. *Cad Saude Publica.* 1996;12:89-93.
33. Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Sobrinho LSV, et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de áreas endêmicas para leishmaniose visceral. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2010;47:213-7.
34. Dye C, Vidor E, Dereure J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol Infect.* 1993;103:647-56.

35. Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, et al. Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. Vet Parasitol. 2010;174:336-40.
36. Portús M, Gállego M, Riera C, Aisa M, Fisa R, Castillejo S. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). Rev Iber Parasitol. 2002;62:72.

Recebido em: 04/07/2016

Aceito em: 08/02/2017

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 Ferraudó
 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
 Claudio Scapinello
 Daisy Pontes Netto
 Daniel Augusto Barroso Lessa
 Delphim da Graça Macoris
 Denise Botelho de O. Braga
 Dilermundo 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

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
 Lílian Gregory
 Lisiane de A. Martins
 Lissandro Gonçalves Conceição
 Luciana Morganti Ferreira Maselli
 Luciano José da Costa Figueiredo
 Luís Carlos Vulcano

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 Chalhoulb Coelho Lima
 Marcos Jun Watanabe
 Marcos Veiga dos Santos
 Margareth 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
 Priscilla Anne Melville

Raimundo Souza Lopes
Raphael Lúcio Andreatti Filho
Raquel Y. A. Baccarim
Raul Franzolin Neto
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
Sílvia 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 palavras 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. 2ª 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 3º 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 resumen 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 resumen 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. 2ª 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 “resumo”, 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. Deberán 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. 2ª 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 3º 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>>.