

Veterinária e Zootecnia

Vet e Zootec.

2016 dezembro; 23(4): 522-752

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 ZOOTECCIA
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. 23, n.1, mar. (2016)
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 ZOOTECCIA* 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. Julio Cezar Durigan

Vice-Reitor

Prof. Dr. Eduardo Kokubun

Pró-Reitor de Pesquisa

Profª Drª Maria José Soares Mendes Giannini

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Profª. Drª. Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto

Pró-Reitor de Graduação

Prof. Dr. Laurence Duarte Colvara

Pró-Reitor de Extensão Universitária

Profª Drª Mariângela Spotti Lopes Fujita

Pró-Reitor de Administração

Prof. Dr. Carlos Antonio Gamero

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Administração da FMVZ

Diretor

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Vice-Diretor

Profª Drª Maria Denise Lopes

Botucatu
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FMVZ
2016

EXPEDIENTE**Comissão Editorial**

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

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.....	530
ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLES/ARTÍCULOS DE REVISIÓN	
GENE EXPRESSION: AN OVERVIEW OF METHODS AND APPLICATIONS FOR CANCER RESEARCH / EXPRESSÃO GÊNICA: UMA VISÃO GERAL DOS MÉTODOS E APLICAÇÕES NA PESQUISA DO CÂNCER / EXPRESIÓN GÉNICA: UNA VISIÓN GENERAL DE LOS MÉTODOS Y APLICACIONES EN LA PESQUISA DE CÂNCER. Marina Mitie de Souza Monobe, Rodrigo Costa da Silva.....	532
SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA MUNDIAL DA BRUCELOSE HUMANA / HUMAN BRUCELLOSIS EPIDEMIOLOGICAL SITUATION IN THE WORLD. / SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA MUNDIAL DE LA BRUCELOSIS HUMANA. Anna Paula Vitirito Maurelio, Bianca Paola Santarosa, Danilo Otávio Laurenti Ferreira, Mayra Teixeira Alas Martins, Antonio Carlos Paes, Antonio Carlos Paes.....	547
LINFOMA CANINO: REVISÃO DE LITERATURA COM ÊNFASE NO LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B* / CANINE LYMPHOMA: LITERATURE REVIEW EMPHASIZING ON DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA / LINFOMA CANINO: REVISION DE LITERATURA CON ENFASIS EN LINFOMA DIFUSO DE CELULAS B GRANDES. Maria Claudia Lopes Silva, Julio Lopes Sequeira	561
GLAUCOMA, APOPTOSE E SILDENAFIL: COMPREENSÃO DE UMA DOENÇA SEM SOLUÇÃO E UMA POSSÍVEL ABORDAGEM DE TRATAMENTO / GLAUCOMA, APOPTOSIS AND SILDENAFIL: COMPREHENSION OF A DISEASE WITHOUT SOLUTION AND A POSSIBLE APPROACH OF TREATMENT / GLAUCOMA, APOPTOSIS Y SILDENAFIL: COMPRENSIÓN DE UNA ENFERMEDAD SIN SOLUCIÓN Y UN POSIBLE ENFOQUE DE TRATAMIENTO. Diogo Sousa Zanoni, Germana Alegro Da Silva, José Luis Laus, Renée Laufer Amorim.....	577
RELATOS DE CASO/CASE REPORTS/ESTUDIOS DE CASO	
FOTOSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA EM CABRITO – RELATO DE CASO / PHOTSENSITIZATION IN A KID GOAT – CASE REPORT / FOTOSENSIBILIZACIÓN HEPATOGENA EN CABRITO – REPORTE DE UN CASO. Juliana Paniago Lordello Neves, Ana Eliza dos Santos Silveira, Noeme Sousa Rocha, Letícia Ferrari Crocomo, Carlos Eduardo Fonseca Alves, Marcos Barbosa Ferreira, Frederico Guilherme Oliveira da Silva, Wolff Camargo Marques Filho	588
MEGAESÔFAGO CONGÊNITO EM UM CÃO/ CONGENITAL MEGAESOPHAGUS IN A DOG / MEGAESÓFAGO CONGÉNITA EN UN PERRO. Tiago Silva Teófilo, Maria Dores Oliveira-Neta, Mylena Andréa Oliveira Torres, Hugo Leonardo Melo Dias, Giuliano Lima Alves	594
ALTERAÇÕES TEGUMENTARES E NO ELETROFEROGRAMA DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE TILÁPIAS (<i>Oreochromis niloticus</i>) (Linnaeus, 1759) MACHO E FÊMEA, PROVOCADAS POR RADIAÇÃO GAMA / CHANGES IN THE ELECTROPHORETIC PATTERN OF PLASMA PROTEINS OF MALE AND FEMALE TILAPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) (Linnaeus, 1759), CAUSED BY GAMMA RADIATION / CAMBIOS EN EL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE TILAPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) (Linnaeus, 1759) MACHO Y HEMBRA, POR RADIACION GAMMA. Fernando Henrique Rodrigues Borin, Paulo Roberto Rodrigues Ramos, Helton Carlos Delicio, Marco Antonio Rodrigues Fernandes, Joel Mesa Hormaza	599

- ESTIMATIVA DA IDADE GESTACIONAL EM CADELAS UTILIZANDO AS MEDIDAS FETAIS E A ORGANOGÊNESE OBTIDAS POR ULTRASSONOGRRAFIA / ESTIMATION OF GESTATIONAL AGE IN BITCHES USING FETAL MEASUREMENTS AND ORGANOGENESIS OBTAINED BY ULTRASONOGRAPHY / ESTIMACIÓN DE LA EDAD GESTACIONAL EN PERRAS CON EL USO DE LAS MEDIDAS FETALES Y LA ORGANOGÊNESE OBTIDAS TRAVÉS DE ECOGRAFÍA.** Lidiane da Silva Alves, Vânia Maria de Vasconcelos Machado, Janaina Torres Carreira 604
- AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE PLASMOCITOMA CUTÂNEO EM UM CÃO: RELATO DE CASO/ ASSESSMENT IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF THE CUTANEOUS PLASMOCYTOMA IN A DOG - CASE REPORT / EVALUACIÓN IMUNOHISTOQUÍMICA DE PLASMOCITOMA CUTÂNEO EN UN PERRO - REPORTE DE UN CASO.** Lígia Fernandes Gundim, Thaís de Almeida Moreira, Nicolle Pereira Soares, Alessandra Aparecida Medeiros 613
- SÍNDROME HIPEREOSINOFÍLICA IDIOPÁTICA EM CÃO: UMA INSÓLITA DESCRIÇÃO NO NORDESTE DO BRASIL / IDIOPATHIC HIPEREOSINOPHILIC SYNDROME IN DOG: AN UNSUAL DESCRIPTION IN NORTHEASTERN BRAZIL / SÍNDROME HIPEREOSINOFÍLICO IDIOPÁTICO EN EL PERRO: UNA DESCRIPCIÓN POCO COMÚN EN EL NORESTE DE BRASIL.** Luã Barbalho de Macêdo, Muriel Magda Lustosa Pimentel, Ilanna Vanessa Pristo de Medeiros Oliveira, Lidiane Mickaelle Soares de Oliveira, Kilder Dantas Filgueira 618
- COMUNICAÇÃO CURTA/ SHORT COMMUNICATION/ COMUNICACIÓN CURTA
- ECONOMICAL EVALUATION OF RACTOPAMINE INCLUSION IN DIETS OF FINISHING GILTS / AVALIAÇÃO ECONÔMICA DA INCLUSÃO DE RACTOPAMINA EM DIETAS PARA FÊMEAS SUÍNAS EM FASE DE TERMINAÇÃO / EVALUACIÓN ECONÓMICA DE INCLUSIÓN DE RACTOPAMINA EN DIETAS PARA HEMBRAS PORCINAS EN FASE DE ENGORDA.** Pedro Henrique Watanabe, Maria Cristina Thomaz, Leonardo Augusto Fonseca Pascoal, Everton Daniel, Alessandro Borges Amorim, Emanuela Lima Oliveira 626
- PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS PARA O Vírus da diarreia viral bovina, Herpesvírus bovino Tipo 1 E Vírus da leucose enzoótica bovina EM BÚFALOS DE ÁGUA DA ILHA DE MARAJÓ/ PREVALENCE OF Bovine Viral Diarrhoea Virus, Bovine Herpesvirus 1 and Bovine Leucosis Virus ANTIBODIES IN RIVER BUFFALOES FROM MARAJÓ ISLAND / E PREVALENCIA DE ANTICUERPOS PARA EL Vírus de la diarreia viral bovina, Herpesvírus bovino Tipo 1 Y Vírus de la leucosis enzoótica bovina EN BÚFALOS DE RIO DE LA ISLA DE MARAJÓ.** Daniel Stangarlin de Camargo, Jane Cecília Silveira de Matos, Alexandra Ariadine Bittencourt Gonçalves, Érika Dayane Leal Rodrigues, Sandro Patroca da Silva, Livia Medeiros Neves Casseb, Helio Langoni, Andréa Maria Góes Negrão, Alexandre do Rosário Casseb 631
- CARACTERÍSTICAS DA CARÇAÇA E QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS TERMINADOS EM SISTEMA DE INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA / CARCASS AND MEAT QUALITY FROM CATTLE FINISHED IN INTEGRATED CROP-LIVESTOCK SYSTEM / CARACTERÍSTICAS DE LA CARCASA Y CALIDAD DE LA CARNE DE VACUNOS TERMINADOS EN SISTEMA DE INTEGRACION AGRICULTURA COM GANADERIA.** Renata Tiekko Nassu, Rymer Ramiz Tullio, Sérgio Novita Esteves, Alberto C.C. Bernardi..... 637
- PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-Brucella abortus EM OVINOS DA REGIÃO MÉDIO-NORTE MATOGROSSENSE / RESEARCH ON BRUCELLA ABORTUS ANTIBODIES IN SHEEP FROM MID-NORTH MATO GROSSO STATE, BRAZIL / PESQUISA DE ANTICUERPOS ANTI-BRUCELLA ABORTUS EN OVINOS DE LA REGION MEDIO-NORTE DE LA PROVINCIA DE MATO GROSSO, BRASIL.** Rafael dos Santos, Anderson Augusto Dionisio de Souza, Silvane Cardoso Gomes, Suyane Nayara Garcia Socoloski, Bruno Gomes de Castro 642

ARTIGOS/ARTICLES/ARTÍCULOS

- ASPECTOS FÍSICOS E MORFOLÓGICOS DO SÊMEN DE BUBALINOS DA RAÇA MURRAH EM MATURIDADE SEXUAL / PHYSICAL AND MORPHOLOGICAL ASPECTS OF THE SEMEN OF MURRAH BUFFALOES IN SEXUAL MATURITY / ASPECTOS FÍSICOS Y MORFOLÓGICOS DEL SEMEN DE LOS BÚFALOS MURRAH EN LA MADUREZ SEXUAL.** Mariana Furtado Zorzetto, Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva, Saulo Zocca, Gabriel Augusto Monteiro, Stephane Cássia Vexenat, Ian Martin, Eunice Oba 647
- ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO DE OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA / ORIGIN AND DISTRIBUTION OF THE SCIATIC NERVE IN MORADA NOVA SHEEP / ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL NERVIO CIÁTICO EN OVEJAS MORADA NOVA.** Élika Suzianny de Sousa, Gleidson Benevides de Oliveira, Márcio Nogueira Rodrigues, Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior, Moacir Franco de Oliveira, José Fernando Gomes de Albuquerque 656
- UTILIZAÇÃO DE DIETAS DE ALTO CONTEÚDO DE VOLUMOSOS SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM COELHOS / THE UTILIZATION OF DIETS WITH HIGT CONTENT OF FORAGE ON THE WEIGHT OF THE ORGANS OF THE DIGESTIVE SYSTEM IN RABBITS / UTILIZACIÓN DE DIETAS CON ELEVADO CONTENIDO DE VOLUMOSOS SOBRE EL PESO DE LOS ÓRGANOS DEL SISTEMA DIGESTIVO EN CONEJOS.** Luiz Carlos Machado, Walter Motta Ferreira 664
- Toxoplasma gondii: SOROPREVALÊNCIA EM OVINOS COM APTIDÃO LEITEIRA NA MESORREGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL / Toxoplasma gondii: SEROPREVALENCE IN DAIRY SHEEP IN WEST MESORREGION OF STATE OF SANTA CATARINA, BRAZIL / Toxoplasma gondii: SEROPREVALENCIA EN OVEJAS CON APTITUD DE LECHE EN OESTE SANTA CATARINA MESORREGIÓN, BRASIL.** Renata Arruda Ossani, Anderson Barbosa de Moura, Michelle Federle, Antonio Pereira de Sousa, Marcio Orides, Amelia Sartor, Humberto Alcides Toaldo 672
- BEM ESTAR DE EQUINOS DE TRACÇÃO E PERFIL SÓCIO-ECONÔMICO DOS CARROCEIROS DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL / WELFARE OF DRAUGHT HORSES AND ECONOMIC SOCIAL ASPECTS OF THE CARTERS OF SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL STATE / BIEN ESTAR DE LOS CABALLOS DE TRACCIÓN Y PERFIL SOCIO-ECONÓMICO DE LOS CARRETEROS DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL.** Luís Antônio Sangioni, Gustavo Cauduro Cadore, Sônia de Avila Botton, Fernanda Silveira Flores Vogel, Sergio da Silva Fialho, Felipe Lamberti Pivotto, Marinês Lazzari 679
- PERFORMANCE OF HEIFERS FROM DIFFERENT GENETIC GROUPS WITHOUT ANTHELMINTIC TREATMENT / DESEMPENHO DE NOVILHAS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS SEM TRATAMENTO ANTI-HELMÍNTICO / DESEMPEÑO DE NOVILLAS DE DIFERENTES GRUPOS GENETICOS SIN TRATAMIENTO ANTIHELMINTICO.** José Henrique Neves, Ricardo Lopes Dias Costa, Adilson Marini, Ricardo Veludo Gomes Soutello, Thiago Nunes Barreto 688
- EFICÁCIA DE ADITIVO À BASE DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURA NA DIETA DE LEITOAS INTOXICADAS COM ZEARALENONA / EFFECTIVENESS OF ADDITIVES BASED ON YEAST CELL WALL IN DIETS OF GILTS INTOXICATED BY ZEARALENONE / EFICACIA DE ADITIVO A BASE DE PARED CELULAR DE LEVADURA EN LA DIETA DE CERDAS JÓVENES EXPUESTAS A ZEARALENONA.** Danielle Fabião Gomes Moreira Leitão, Águida Aparecida de Oliveira, Kelly Moura Keller, Bruno da Silva de Vasconcelos, Luiz Antonio Moura Keller, Marcos Aronovich, Carlos Alberto da Rocha Rosa 696
- AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DA TOXOPLASMOSE EM BUBALINOS DE TRÊS MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARÁ / SEROLOGICAL EVALUATION OF TOXOPLASMOSIS IN BUFFALOES FROM THREE MESORREGIONS OF PARÁ STATE / EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LA TOXOPLASMOSIS EN BUFALOS DE TRES MESORREGIONES DEL ESTADO PARA.** Valdelice de Lourdes Corrêa Pinheiro, Daniela Barbosa da Silva, Gabriela Capriogli de Oliveira, Kylma Lorena Saldanha das Chagas, Alexandre do Rosário Casseb, Sandro Patroca da Silva, Andrea Maria Goes Negrão, Hélio Langoni 706

- EFICÁCIA ACARICIDA DA ASSOCIAÇÃO DE CIPERMETRINA, FENTHION E CLORPIRIFÓS EM BOVINOS NATURALMENTE INFESTADOS POR *Rhipicephalus microplus* NA AMAZÔNIA MATOGROSSENSE / ACCARICIDE EFFICACY OF CYPERMETHRIN, FENTHION AND CHLORPYRIFOS ASSOCIATION IN NATURAL INFESTED CATTLE WITH *Rhipicephalus microplus* IN AMAZON REGION / EFICACIA ACARICIDA DE LA ASOCIACIÓN ENTRE CIPERMETRINA, FENTIÓN Y CLORPIRIFOS EN BOVINOS NATURALMENTE INFESTADOS POR *Rhipicephalus microplus* EN LA AMAZONIA MATOGROSSENSE.** Maycon Junior Heidmann, Anderson Augusto Dionisio de Souza, Cristiano Grisi do Nascimento, Gabrielle Nellis Bragaglia, Lidia Marinho Silva Lima, Sandra Barioni Toma, Simone Cristina Rosa, Bruno Gomes de Castro..... 713
- MILK QUALITY AND PROFILE OF PRODUCERS FROM A MILK PICK-UP ROUTE / QUALIDADE DO LEITE E PERFIL DOS PRODUTORES DE UMA LINHA DE ENTREGA DE LEITE / CALIDAD DE LA LECHE Y EL PERFIL DE LOS PRODUCTORES DE UNA LINEA DE TRANSPORTE DE LA LECHE.** Patrícia Yoshida Faccioli-Martins, Marcela de Pinho Manzi, Glaucea Roberto Padovani, Benedito Donizete Menozzi, Helio Langoni..... 722
- ESTUDO DA DINÂMICA DA POPULAÇÃO DE CÃES VACINADA CONTRA A RAIVA NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU/SP DE 2005 A 2014 / STUDY OF THE CANINE POPULATION DYNAMICS VACCINATED AGAINST RABIES IN THE CITY OF BOTUCATU/SP FROM 2005 TO 2014/ ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS VACUNADOS CONTRA LA RABIA EN LA CIUDAD DE BOTUCATU/SP DE 2005 A 2014.** Selene Daniela Babboni, Fábio Sossai Possebon, Gumercindo Oliveira Junior, José Rafael Modolo..... 733

EDITORIAL

SUPERBACTÉRIAS

Pode-se dizer que o mundo é das bactérias. No corpo humano há 39 trilhões delas, contra 30 trilhões de células humanas. Essa convivência geralmente é pacífica e nada se percebe. Entre essas, há as denominadas “superbactérias”. São espécies normais como a *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae* que vivem em nosso corpo. O que elas têm de diferente são genes que as tornam resistentes aos antibióticos. A carbapenemase é uma enzima que confere resistência aos antibióticos carbapenêmicos que são eficazes contra quase todas as bactérias. Essa enzima é que torna a KPC uma superbactéria e sério problema de saúde pública.

Bactérias como *Klebsiella spp* têm a capacidade de passar sua resistência para outras espécies mais perigosas. Um tipo de bactéria pode transferir seu “superpoder” para outra completamente diferente. O que ocorre é a transferência de genes entre as diferentes espécies de enterobactérias. Sabe-se que 80% dos antibióticos produzidos nos EUA são usados na criação de animais como bovinos, suínos e na avicultura para frangos. Esses animais recebem ração contendo antibióticos como promotores de crescimento, para que cresçam mais rápido e sem doenças. O uso maciço desses medicamentos estimula o surgimento dessas superbactérias que podem infectar humanos. É comum encontrar-se bactérias multirresistentes a vários antimicrobianos, o que tem dificultado a prática da terapêutica anti-infecciosa em medicina veterinária e humana. É necessária conscientização para o uso adequado e racional dos antimicrobianos para minimizar a seleção de variantes de bactérias resistentes aos antibióticos.

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: Gene expression: an overview of methods and applications for cancer research; Situação epidemiológica mundial da brucelose humana; Linfoma canino: revisão de literatura com ênfase no linfoma difuso de grandes células B; Glaucoma, apoptose e sildenafil: compreensão de uma doença sem solução e uma possível abordagem de tratamento. Os relatos de caso: Fotossensibilização hepatógena em cabrito – Relato de caso; Megaesôfago congênito em um cão; Alterações tegumentares e no eletroferograma de proteínas plasmáticas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1759) macho e fêmea, provocadas por radiação gama; Estimativa da idade gestacional em cadelas utilizando as medidas fetais e a organogênese obtidas por ultrassonografia; Avaliação imunohistoquímica de plasmocitoma cutâneo em um cão: Relato de caso; Síndrome hipereosinofílica idiopática em cão: uma insólita descrição no nordeste do Brasil. As comunicações curtas: Economical evaluation of ractopamine inclusion in diets of finishing gilts; Prevalência de anticorpos para o Vírus da diarreia viral bovina, Herpesvírus bovino Tipo 1 e Vírus da leucose enzoótica bovina em búfalos de água da Ilha de Marajó; Características da carcaça e qualidade da carne de bovinos terminados em sistema de integração lavoura-pecuária; Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella abortus* em ovinos da região médio-norte matogrossense. Os artigos originais: Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de bubalinos da raça Murrah em maturidade sexual; Origem e distribuição do nervo isquiático de ovinos da raça Morada Nova; Utilização de dietas de alto conteúdo de volumosos sobre o peso dos órgãos do sistema digestório em coelhos; *Toxoplasma gondii*: Soroprevalência em ovinos com aptidão leiteira na mesoregião oeste de Santa Catarina, Brasil; Bem estar de equinos de tração e perfil sócio-econômico dos carroceiros de Santa Maria, Rio Grande do Sul; Performance of heifers from different genetic groups without anthelmintic treatment; Eficácia

de aditivo à base de parede celular de levedura na dieta de leitões intoxicadas com zearalenona; Avaliação sorológica da toxoplasmose em bubalinos de três mesorregiões do estado do Pará; Eficácia acaricida da associação de Cipermetrina, Fenthion e Clorpirifós em bovinos naturalmente infestados por *Rhipicephalus microplus* na Amazônia matogrossense; Milk quality and profile of producers from a milk pick-up route; Estudo da dinâmica da população de cães vacinada contra a raiva no município de Botucatu/SP de 2005 a 2014..

Prof. Helio Langoni
Editor-Chefe

GENE EXPRESSION: AN OVERVIEW OF METHODS AND APPLICATIONS FOR CANCER RESEARCH

Marina Mitie de Souza Monobe¹
Rodrigo Costa da Silva²

ABSTRACT

Gene expression is the study of how the genotype gives rise to the phenotype by investigating the amount of transcribed mRNA in a biological system. A lot of methods have been standardized to identify the variation in gene expression, including subtractive hybridization, differential display, serial analysis of gene expression, microarray hybridization, and RNA-seq sequencing. Most of techniques have been focused in cancer research and diagnosis, producing a huge amount of data, which allowed to understand the cancer progression and pathways, discover and evaluate new treatment interventions, new molecular tools for diagnosis and prognosis, and analyze the survival time in human and animal patients. In this way, gene expression techniques brought new important perspectives for the medical and veterinary fields, and further researches focusing oncology will provide much more knowledge concerning the pathways and interaction of healthy and tumor cells, improving the perspectives of the daily interventions by the oncologists and clinicians.

Keywords: gene sequencing, gene expression, molecular techniques, genotype, veterinary oncology.

EXPRESSÃO GÊNICA: UMA VISÃO GERAL DOS MÉTODOS E APLICAÇÕES NA PESQUISA DO CÂNCER

RESUMO

A expressão genética é o estudo de como o genótipo dá origem ao fenótipo a partir da investigação da quantidade de RNAm transcrito em um sistema biológico. Vários métodos já foram padronizados para identificar variações na expressão gênica, dentre eles a hibridização subtrativa, “differential display”, análise em série da expressão genética, hibridização de microarranjo, e sequenciamento por RNA-seq. A maioria das técnicas tem focado na pesquisa e diagnóstico do câncer, gerando enorme quantidade de dados, o que permitiu compreender a progressão do câncer e suas vias, descobrir e analisar novas intervenções terapêuticas, novas ferramentas moleculares para o diagnóstico e prognóstico, e analisar o tempo de sobrevivência em pacientes humanos e animais. Desta forma, as diferentes técnicas de expressão gênica trouxeram novas e importantes perspectivas para a área médica e veterinária, e novas pesquisas focadas em oncologia fornecerão muito mais conhecimento sobre as vias e interações entre células saudáveis e tumorais, melhorando as perspectivas das intervenções diárias pelos oncologistas e clínicos.

Palavras-chave: sequência gênica, expressão gênica, técnicas moleculares, genótipo, oncologia veterinária.

¹ D.V.M. PhD Candidate, Department of Pathobiology and Population Medicine, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Mississippi State USA. Contato principal para correspondência.

² D.V.M., PhD, Postdoctoral Associate Department of Pathobiology and Population Medicine, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Mississippi State.

EXPRESIÓN GÉNICA: UNA VISIÓN GENERAL DE LOS MÉTODOS Y APLICACIONES EN LA PESQUISA DE CÁNCER

RESUMÉN

La expresión génica es el estudio de cómo el genotipo da lugar al fenotipo mediante la investigación de la cantidad de RNAm transcrito en un sistema biológico. Una gran cantidad de métodos fueron estandarizados para identificar variaciones en la expresión génica, incluyendo la hibridación sustractiva, “differential display”, análisis en serie de la expresión génica, la hibridación de microarrays, y la secuenciación por RNA-seq. La mayoría de las técnicas se han centrado en la investigación y diagnóstico del cáncer, produciendo una gran cantidad de datos, lo que permitió entender la progresión del cáncer y las vías, descubrir y evaluar nuevas intervenciones de tratamiento, nuevas herramientas moleculares para el diagnóstico y el pronóstico, y analizar el tiempo de supervivencia en pacientes humanos y animales. De esta manera, las técnicas de expresión génica trajeron nuevas perspectivas importantes para el campo de la medicina veterinaria, y nuevas investigaciones centradas en oncología proporcionarán mucho más conocimiento acerca de las vías y la interacción de las células sanas y tumorales, mejorando las intervenciones diarias por los oncólogos y los clínicos.

Palabras clave: secuencia génica, expresión génica, técnicas moleculares, genotipo, oncología veterinaria.

INTRODUCTION

Gene expression is a highly regulated mechanism that controls the function and adaptability of all living cells in which a gene information is converted to a functional gene product that can be either a protein or non-coding genes such as transfer ribonucleic acid (tRNA) or small nuclear RNA (snRNA) (1,2). The control of gene expression is the main point on understanding the interaction genotype: phenotype (3), because this process is used for all known life. Protein formation involves four main steps: transcription, RNA splicing, translation and posttranslational modification. During transcription, a single strand mRNA is complementary copied from one strand of a template DNA by the RNA polymerase. While transcription occurs, some modifications on the mRNA, i.e., RNA splicing, in which introns are removed from the sequence. After that, the new mRNA is used as a template to assemble a chain of amino acids to form the protein (4). Gene expression studies the amount of transcribed mRNA in a biological system and its importance to the cell function.

Sequencing techniques that lead to the knowledge of the entire genome sequences have been stimulating researchers to define their function (3). As genes with related functions are usually regulated together, techniques that evaluate global gene expression provide an important way for the initial identification and clustering of these genes. The functional gene sequence clustering provides enough information to direct additional experiments at defining the precise function of certain gene product.

The analysis of the gene expression can be done by targeting a single specific gene, also known as low-to-mid plex (reporter gene, Northern, Western, fluorescent “in situ hybridization – FISH, slot and dot blotting, semiquantitative and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction – RT-PCR, and nuclease protection assays), or all genes that differ in expression among different experimental samples, also known as higher plex (subtractive hybridization, differential display, serial analysis of gene expression, microarray hybridization, RNA-seq sequencing), or that differ between healthy and cancer patients (5). Gene expression and pathway analysis allows identify several biological processes and

molecular functions that may be involved also with infectious (i.e., *Mycobacterium bovis*-infected bovine leukocytes) (6-8), and non-infectious (i.e., exercise-induced stress in equine, and canine and bovine cancers) (9-12).

In this way, the present paper was aimed to review the most important methods for the gene expression analysis in different experimental samples, highlighting the advantages and disadvantages of each one, and provide some applications in cancer research.

Methods of gene expression analyzes.

Subtractive hybridization

The subtractive hybridization method was first described in 1983 by Sargent and Dawig to create a cDNA library (13) and generated probes (14) of different expressed genes. The principle of this methodology is to differentiate the expressed genes by hybridizing cDNA from one sample (tester sample) to an excess of mRNA from a second or control sample (driver). The transcripts that are expressed in both samples form a mRNA/cDNA hybrid molecule, whereas the sequence expressed only in the tester maintains as a single strand cDNA. Then, double and single strands are separated using hydroxylapatite chromatography, and the eluted single strands can be cloned, sequenced or used directly as probes for screening libraries. The problems with this method include the requirement of a large amount of mRNA (i.e. 270 µg for the first described protocol against 2µg of mRNA usually used on microarrays' protocol), and the observation of errors on identifying rare transcripts. After that, this protocol was updated along the time, and a similar protocol known as suppression subtractive hybridization (SSH) was created.

SSH differentiates from the original protocol by the selective amplification of differentially expressed transcripts and elimination of the separation single-double strand step (15). This protocol is based on the extraction of mRNA from two experimental samples (tester and driver) and performance of a RT-PCR, which will result in cDNA formation. Then the cDNA testers are bonding with two different adapter oligonucleotides (1 and 2) and until the second hybridization, the reactions of the tester-adapter 1 and 2 are separated done. A first subtractive hybridization combine the excess of cDNA drivers with the testers in two separate reactions in which denaturation occurs and single stranded molecules can re-hybridize. One reaction involves the tester 1 and the other the tester 2. After the first hybridization, four possible molecules may result: single strand tester, double strand tester, hybrid tester-driver transcript and double strand driver. The second hybridization mixes all products from the two types of adapters. Then, the result can be a double strand expressing the two types of adapters, double strand with the same type of adapter, single strand tester 1 or 2, double strand adapter 1 or 2 with a driver, or a single strand driver. A PCR is performed using primers that recognize the adapter 1 (forward primer) and 2 (reverse primer). This reaction will result in the amplification of the double strand cDNA containing the two types of adapters (Figure 1).

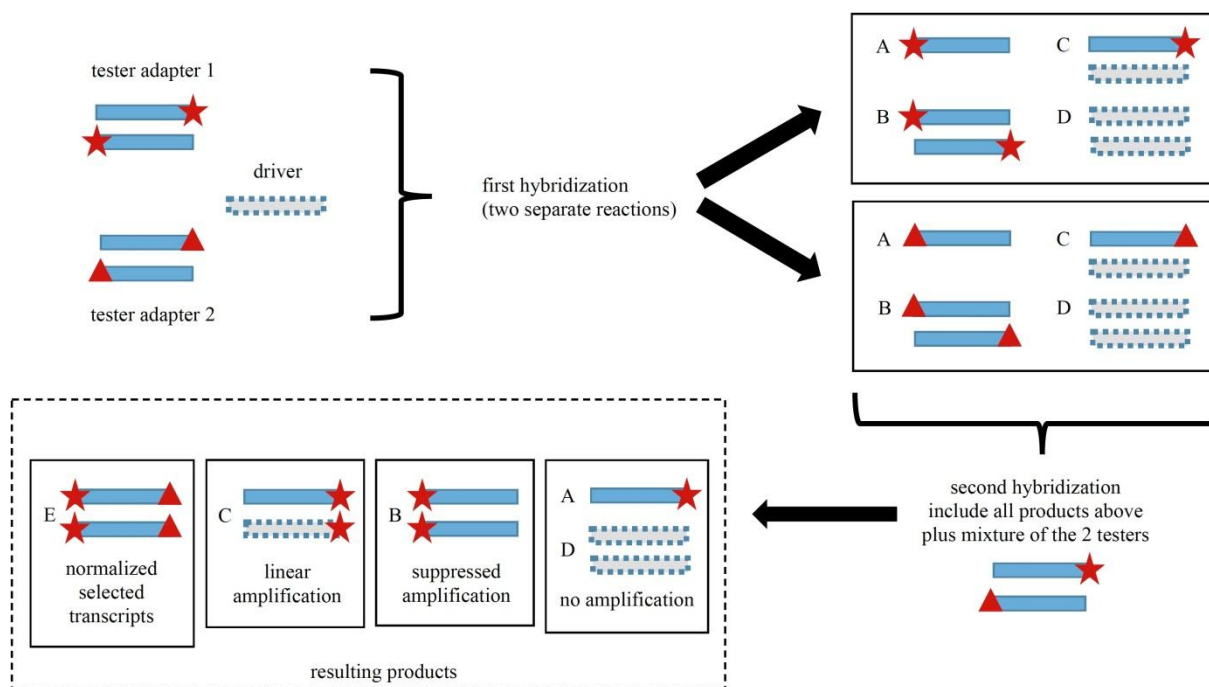


Figure 1. Suppression Subtractive Hybridization (SSH). This method includes two reaction steps. First step is carried out with two separated reactions, each one with an excess of driver and one type of Tester Adapter. Each reaction will result four types of products: (A) single stranded tester transcripts (B) double stranded tester transcripts (B) hybrids of tester and driver transcripts (D) double stranded driver. The second hybridization step includes products generated from the first step plus additional denatured driver cDNA. Possible resulting products include same type ones from the first step plus (E) a double stranded driver formed by the two types of adapters. A final PCR reaction is done to selectively amplify the amount of (E) drivers. Figure adapted from [Moody \(5\)](#).

The advantage using SSH is that it does not require prior knowledge of the transcript sequence to isolate it and does not require specialized equipment or analysis only industrialized kits. However, the limitation is that it can only apply for a matched pair treatment comparison and it is not a quantitative method ([5](#)).

SSH has been widely used in cancer research. For example, one performed research using normal cells and colorectal cancer cells found out that 37 different genes are overexpressed in this type of cancer and some of them may provide novel points for therapeutic intervention ([16](#)). Another research using hormone-responsive and hormone-nonresponsive breast carcinoma proved that a specific set of genes is responsible for regulating the estrogen receptors and causing the hormone-responsive breast carcinoma. These genes are not expressed in the other type of breast cancer neither in normal mammary cells, which means that its expression can help providing an accurate diagnosis and prognosis for these patients ([17](#)).

Differential display

RNA fingerprinting technique includes two different protocols: differential display and arbitrary primed PCR (RAP-PCR). Both protocols are based on PCR amplification of random subsets of genes from two or more samples that will lead to a different pattern of PCR product bands visualized during electrophoresis. This “unique” transcript pattern is called RNA fingerprint ([18](#)).

These methods include RNA extraction, RT-PCR forming the cDNA and a main PCR reaction that include one same forward primer and 12 to 20 different reverse primers. This PCR reaction results in more than 240 combinations of sequences that are enough to represent

all the mRNA present in the original RNA sample. After this reaction, the PCR products are labeled and an electrophoresis on polyacrylamide gel is performed (Figure 2). The differentially expressed gene is represented by comparing the presence and/or intensity of the bands in the different samples (19). These PCR products might be selected, purified from the gel and reamplified by PCR to be used in sequencing and other techniques.

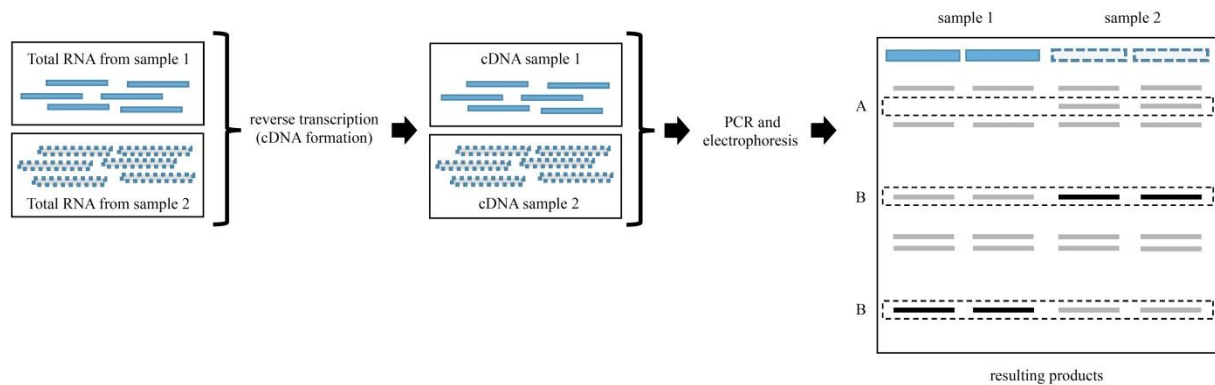


Figure 2. Differential display (RNA fingerprint method). Technique includes extraction of total RNA from two or more samples that are reverse transcribed to cDNA. Then, random cDNAs are amplified in duplicate by PCR using different combinations of forward and reverse primers. The amplified products are visualized by gel of electrophoresis and each sample will have a “unique” pattern of transcripts’ products. Some fragments might appear only in one sample but not in other (A), some might have higher or lower intensity expression comparing to the other sample (B). Adapted from [Moody \(5\)](#).

The main difference between differential display and RAP-PCR is that differential display use anchored primer, which recognizes the Poly-A tail on the mRNAs while the RAP-PCR use arbitrary specific sequence primer with approximately 10 base pairs (19, 20).

The advantages include comparison of multiple samples and identification of up and down regulated genes. However, both protocols are not quantitative and are time consuming. Several false positive have also been described (21).

At cancer research, many researches in prostate cancer found out a highly specific gene (differential display code 3 gene, DDC3) that has been used as a marker for the diagnosis of this cancer and as a target for gene therapy (22-24). In gene therapy, studies focusing the regulation of DDC3 have observed better results in chemotherapy and regression of the cancer (23). Other different studies at the cancer field involve the identification of expression of specific genes after some kind of treatment. Murata et al. (25) analyzed the expression of the PHLDA1 gene in oral cancer cell lines in humans. They observed the overexpression of this gene in oral cancer and verified its significant suppression by hydrogen-sulfide oral therapy. Thus, the use of hydrogen-sulfide can prevent the oral cancer and help during its therapy in humans. In the same way, Finocchiaro et al. (26) have used a gene target therapy based on the high expression of interferon- β genes at the melanoma cancer cells in dogs.

Expressed Sequence Tag sequencing

The conception of expressed sequence tag sequencing (EST) was first mentioned in 1991 (27). The principle includes the random selection of clones from a cDNA library and the performance of a single sequence reaction to produce 300-500 bp of sequence per clone (Figure 3). The differentially expressed genes are identified by the different number of times it appears at the EST library when compared with a control sample. Higher numbers of counted times in an EST library means higher gene expression (28). EST method usually needs to be combined with other different gene expression methods because it is not an

accurate qualitative and quantitative data. It is often generated from normalized cDNA libraries.

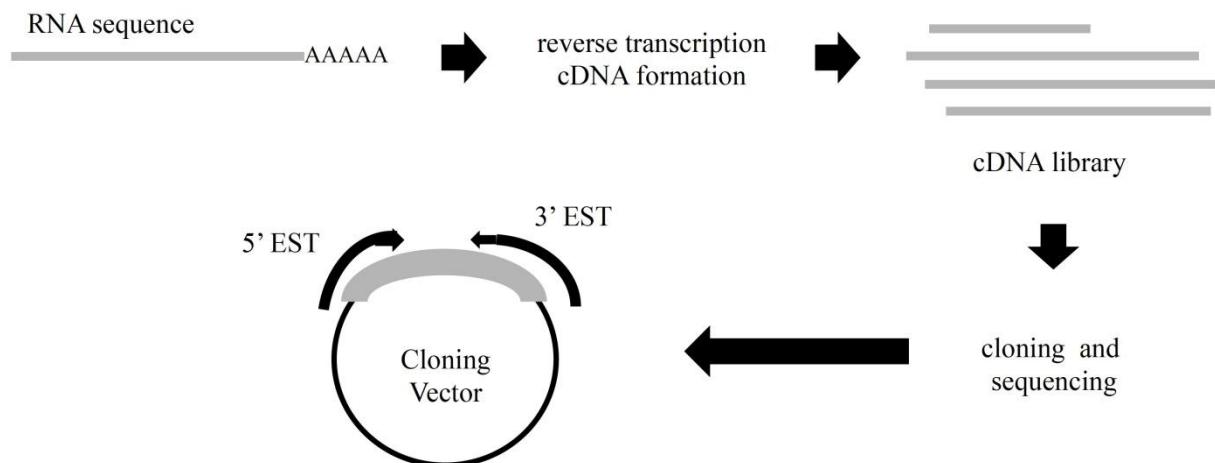


Figure 3. Expressed Sequence Tag sequencing (EST). EST is a short sub-sequence of cDNA selected from a cDNA library with 300-500 bp length. Different expressed genes are identified by the amount of sequences produced by the clones when compared with a control sample. Adapted from [Moody \(5\)](#).

Cancer research rarely uses EST only. However, the development of EST databases and normalized cDNA library may increase the use of this technique combined with other ones. The first description of the profile gene expression in breast cancer using EST combined with differential display was in 1994 ([29](#)). They concluded that the both methods combined still have great limitations mainly caused by the high heterogeneity of normal and cancer tissue leading to a large numbers of different EST libraries. Moreover, the contamination of breast cancer tissue with normal breast tissue during the procedure also leads to misidentification of the specific expressed genes in cancer tissue. Therefore, the use of EST remains uncommon especially in cancer research area.

Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)

Although SAGE was first described in 1995 ([30](#)), it has been used recently in the cancer research combined with a new EST generation. This combined technique also known as Tag-seq allows the identification of more genes when compared with the SAGE protocol only. The researchers tested this method in breast cancer and concluded it is an accurate, sensitive and reproducible method to produce gene expression profile in cancers in general ([31](#)). Besides the cancer area, this method is also relevant to study gene expression profiling in other disease pathways.

Actually, SAGE is an accelerated version of EST sequencing in which short sequence tags (SAGE tags) are used to identify a gene transcript (Figure 4). The protocol includes RNA extraction and RT-PCR performance using a biotin-tagged primer. The resulted cDNA is digested by a specific endonuclease known as *NlaIII*, which recognizes 4 (four) base pairs (bp) sequence CATG. The digested fragments are purified and then two linkers, A and B, are added in separate reactions. These linkers are complementary sequence of the PCR primers and serve as recognition sequence for another endonuclease *FokI*. So, a second digestion step is done. The *FokI* recognizes the linkers and cleaves the cDNA at 9 (nine) bp downstream. The products are purified again, ligated together and amplified by PCR. A final digestion step using the *NlaIII* is performed to cleave away the linkers, producing ditags with 9bp from two different transcripts. Multiple ditags are ligated together, cloned and sequenced to produce the SAGE sequence data ([5](#)).

In sum, SAGE tag is a nine base sequence locate specifically downstream from the last endonuclease recognition site of a transcript. Once each unique SAGE tag represents a unique transcript, it allows an overview of all genes expressed in the original RNA sample. The differences in gene expression can be identified by comparing the amount of specific SAGE tags in different libraries (32).

The advantages of SAGE are it is an accurate, quantitative and cumulative method. The disadvantages are that it requires specific equipment and misidentification of tags may occur. Misidentification includes from producing sequence errors to misidentification of the region in a database. Moreover, depending on the specific enzyme used in the protocol, it may fail to identify the transcripts (33).

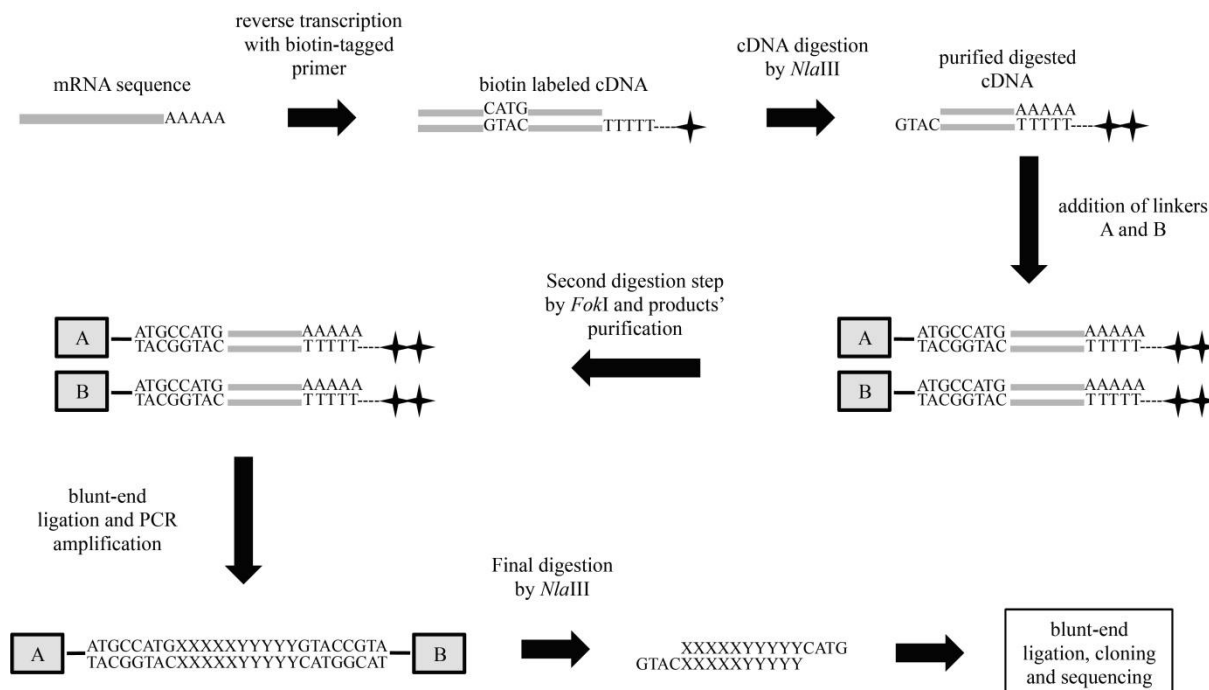


Figure 4. Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). Adapted from Moody (5).

Microarray hybridization, RNA/DNA microarray

Hybridization-based techniques like microarray rely on and are limited to the transcripts bound to the array slides (3). The microarray technology was first described in 1995 (34). However, increasing improvements and changes on microarrays techniques and equipment still makes it one of the most common and newly technique in a variety of fields (35). Even that, microarrays are only as good as the bioinformatic data available for the model organism's genome and transcriptome, the complete set of transcripts in a cell (36).

Nowadays, different types of microarrays protocols are available such as protein microarray, RNA microarray, DNA microarray and Glycan microarray. The difference among them is what they are measuring. In other words, if the microarray is used to measure the amount of RNA it is called RNA microarray (35).

The principle is the hybridization of two DNA or mRNA, for RNA microarray, sequences that have complementary base pair. The first step includes purification of the samples and obtainment of all DNA or cDNA. After that, these sequences are fluorescently or radioactively labeled and added in a microarray containing sequence fragments representing a great variety of genes. Hybridization between the DNA/cDNA samples and the sequences in the microarray occurs, followed by washing off the non-specific bonding sequences. Once hybridized, the sequences release a fluorescent signal, which is captured by the equipment

(Figure 5). The hybridization signal is proportional to the abundance of that mRNA transcript or DNA sequence from the original sample (37).

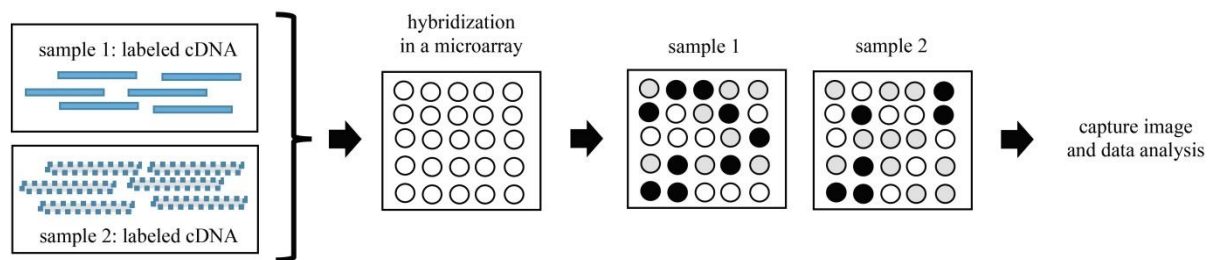


Figure 5. Microarray hybridization. The method includes reverse transcription of mRNA from two samples (i.e., control and experimental sample) into cDNA and labeling them. All cDNAs are hybridized in a microarray containing DNA fragments of different specific genes. Each sample generates a signal when hybridization occurs. The intensity of the signal is proportional to the abundance of the initial mRNA used. Signals from different samples are compared to identify differences in gene expression. Adapted from Moody (5).

Three different types of microarrays are commercial available: microarrays that include oligonucleotide chips made by the synthesis of short oligos directly on slide glass (Affymetrix Technology), microarrays made by spotting pre-synthesized oligos into glass slides or nylon membranes and cDNA microarrays made by spotting amplified PCR products from cDNA library clones onto glass slides or nylon membranes (5).

The selection of gene fragments also known as probes, which are spotted on the array, is one of the most important part. Even though it is possible to select more than 3,000-10,000 sequences, it might be possible that these sequences are not the best representation for a type of experiment (5). Each experiment should have its own cDNA/DNA library and the use of controls is required.

The analysis of the array data is divided in three main steps: identification and quantification of the hybridization signal, visualization of the data and clustering techniques. The clustering step include the organization of the genes in groups with similar expression patterns and it can be done by multiple available software (38).

Microarray technology is considered an accurate, sensitive, quantitative and qualitative method. Although it requires technological and specific equipment with high cost, it is main actual method used in gene expression research (35).

Cancer research has been widely using microarrays to generate gene expression profiling. In breast cancer, the discovery of the *DUSP4* gene led to the use of its expressed transcript as a molecular marker for the diagnosis of the negative breast cancer, an aggressive type of breast cancer. This gene is responsible for the resistance of the cancer cells to chemotherapy drugs (39). Another interesting research using this method was in the lung cancer area. By analyzing the different gene expression profiling between nasal cells from patients with lung cancer and healthy patients, the researchers found out that non-neoplastic cells from nasal tissue from patients with lung cancer express the same specific biomarkers of the lung cancer cells. Thus, they suggested a new non-invasive method of diagnosis of lung cancer once the usual diagnosis is performed by collecting samples directly from the cancer cells (40,41). Microarrays have added important results in the cancer area. Due that, this method has been being modified, improved and widely used in veterinary medicine, mainly in focusing canine mammary carcinoma (42-44) and osteosarcoma (45). Fowles et al. (45) observed that microarray gene expression based models built in an intra- or interspecies manner can successfully predict the drug response in canine osteosarcoma, which may improve outcome in dogs and serve as pre-clinical validation for similar methods in human cancer research.

In various types of cancer, i.e. canine mammary carcinoma, different intracellular signaling pathways are perturbed. Thus, patients with pathologically the same type of cancer often have different genetic defects in their tumors, which also result in different responses to the anticancer treatment (43). To solve this gap, Pawlowski et al. (43) suggested that both molecular and pathological characterization of the tumor can complement one another. Also, microarray gene expression can discriminate metastatic canine mammary carcinomas from non-metastatic ones, as observed by Klopffleisch et al. (42), in which 265/1,011 (26.21%) significantly differentially expressed genes in metastatic, but not in non-metastatic canine carcinoma, are related to human breast cancer and, vice versa, parts of a human prognostic gene signature were identified in the expression profiles of the metastatic canine tumors, which allows the identification of prognostic molecular signatures for potential therapeutic targets.

Rao et al. (44) used cDNA microarray to characterize the canine mammary carcinoma cell lines by the expression profiling, and concluded that the identification of major differences observed in the signaling pathways allows its use to develop new therapies directed towards specific pathways.

RNA-Sequencing (RNA-Seq) or Whole Transcriptome Shotgun Sequencing (WTSS)

RNA-Seq is a powerful and recent approach to the analysis of the transcriptome that uses the capabilities of next-generation sequencing (NGS) to detect and quantify the interest RNA from a genome at a moment (46-48). It provides a more precise measurement of levels of transcripts and their isoforms, and a better transcriptome analysis of the genome with higher resolution than actual methods (48,49).

RNA-Seq detects annotated transcripts as microarrays also do, besides novel sequences and splice variants (36), and provides additional tools by the generation of large amount of data, with an increased base coverage of whole DNA sequences in human, and animal genome (6,9,10,50-52). This technique looks at different populations of RNA to include total RNA, small RNA, such as miRNA, tRNA, and ribosomal profiling (53), also known as key players in cancer development and progression (54).

The basic components of the RNA-Seq technology in the clinical context include 5 (five) major steps: RNA extraction from clinical samples, NGS library preparation, sequencing, data analysis, and data interpretation/reporting (54). It allows the increased base coverage of a DNA sequence, higher sample throughput, and the use of data to characterize exon junctions, detect non-coding RNA (7), alternative gene spliced transcripts, post-transcriptional modifications, gene fusion, mutations/SNPs, and changes in gene expression (Figure 6) (55). Furthermore, existing data sets can be re-evaluated as new sequences (56).

RNA-Seq has a more wide coverage than microarrays, once arrays target the identification of known common alleles that represent approximately 500,000 to 2,000,000 SNPs of the more than 10,000,000 in the genome (57). Because the libraries are not usually available to detect and evaluate rare allele variant transcripts (58), and the arrays are only as good as the SNP databases they are designed from, it limits its use for research purposes (59).

The sample processing method for RNA-Seq involves fragmenting transcripts, and more fragments will be available for sequencing as longer is the transcript (60). This length bias is one limitation not observed for microarrays, as well as the proportional expression levels of the degree of hybridization to probes. Although microarrays are reliable and more cost effective than RNA-Seq for gene expression profiling in model organisms, it is still more routinely used. Nowadays the techniques can be complementary used to each other (3). Additionally, biases in both methods exist for higher abundance transcripts and underscore

the need for validation of results, which can be validated by other molecular techniques, i.e., quantitative PCR (qPCR), or proteomics (61).

Microarrays have been used a lot for clinical applications, and probably will be approved earlier than RNA-Seq for diagnostic use, mainly focusing the application on bioinformatic data (3). As cancer is characterized by genetic lesions directly affecting genes, i.e., point mutation, insertion, deletion, translocation, exon-skipping and gene fusion, RNA-Seq can detect these mutant genes in lesions, and measure the transcript abundance (54,62), as well as gene fusions, which can result from many types of genetic lesions, e.g., translocation, deletion and inversion; it allows the identification of biomarkers for cancer risks, subtypes and stages of progression (54), discover cancer specific isoforms, global transcriptomic alterations and post-transcriptional changes on large scale (63), reflecting on the cancer diagnosis, and prognosis of the human (54), and animal disease (11).

In dogs, the breed-specific cancer susceptibility combined with recent advances in high-throughput sequencing technologies (e.g., RNA-Seq) allows the use of pet dog populations to find often subtle mutations that promote cancer susceptibility and progression (10). A good example of the applicability of this technology on cancer field is in canine osteosarcoma, the best example of breed-enriched cancer, with an incidence rate of about 52 per 100,000, keeping dogs as a good model for human osteosarcoma studies (51,52). Not only osteosarcoma, but also histiocytic sarcoma and bladder cancer can use dogs as a model for RNA-Seq analysis. In this way, RNA-Seq can provide knowledge to expand the existing areas of research, and detect the misexpression of many genes between human and animal, affected and normal tissues (64).

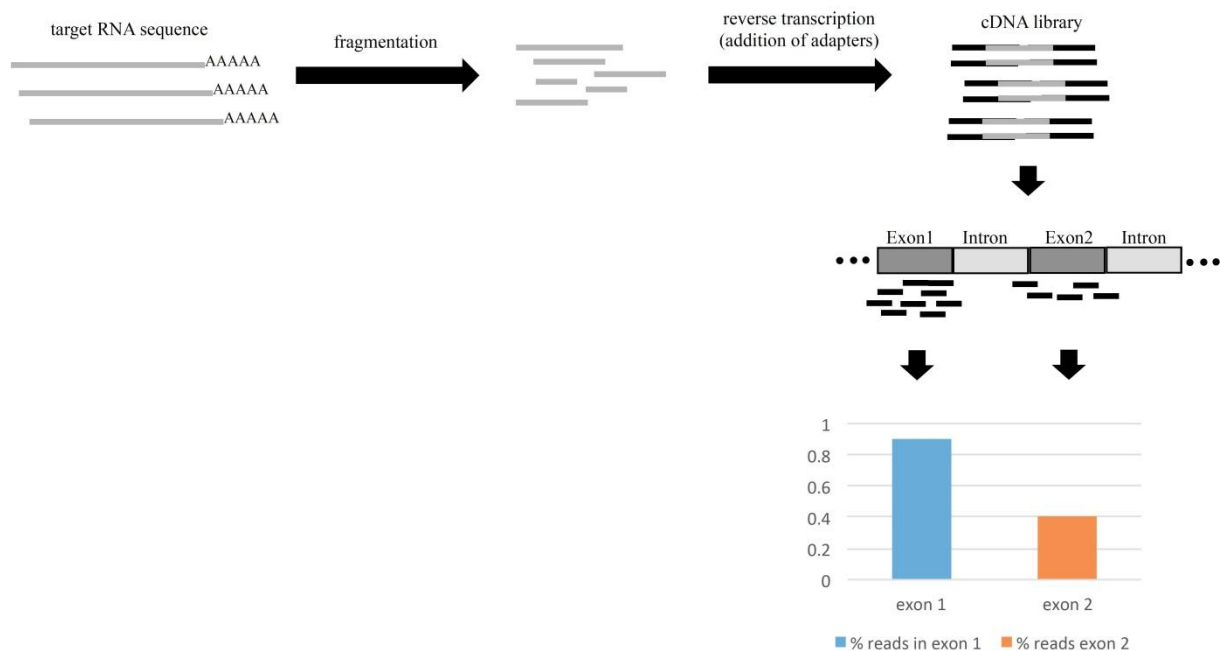


Figure 6. RNA-Seq method.

FINAL CONSIDERATIONS

The evaluation of gene expression is an effective way to identify important genes related to the regulation and progress of cancers in general. Several techniques and protocols were developed for this purpose and currently researches are modifying and improving techniques to facilitate the continuing discovery in this area. The application of gene expression methods in cancer research involves from the study of different biological pathways involved in the cancer progression, development of different markers that can be used in the diagnosis and prognosis of specific cancers and the development of different

protocols of treatments. Protocol treatments include the synthesis of specific targets, which can be combined with radioisotopes or chemotherapy drugs leading them to specific attack cancer cells, minimizing the patient's clinical signs; and gene therapy, which include the use of vectors to modify the expression of cancer genes. Therefore, gene expression methods are a powerful tool for the cancer research area.

REFERENCES

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Control of gene expression. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science; 2007. p.1112-30.
2. Hoopes L. Introduction to the gene expression and regulation topic room. Nat Educ. 2008;1(1):160.
3. Mantione KJ, Kream RM, Kuzelova H, Ptacek R, Raboch J, Samuel JM, et al. Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq. Med Sci Monit Basic Res. 2014;20:138-42.
4. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Expression of the genome. In: Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Molecular biology of the gene. 7th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2014. p.423-608.
5. Moody DE. Genomics techniques: an overview of methods for the study of gene expression. J Anim Sci. 2001;79(E-suppl):E128-35.
6. McLoughlin KE, Nalpas NC, Rue-Albrecht K, Browne JA, Magee DA, Killick KE, et al. RNA-seq transcriptional profiling of peripheral blood leukocytes from cattle infected with *Mycobacterium bovis*. Front Immunol. 2014;5:396.
7. Arnvig KB, Comas I, Thomson NR, Houghton J, Boshoff HI, Croucher NJ, et al. Sequence-based analysis uncovers an abundance of non-coding RNA in the total transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 2011;7(11):e1002342.
8. Qian F, Chung L, Zheng W, Bruno V, Alexander RP, Wang Z, et al. Identification of genes critical for resistance to infection by West Nile virus using RNA-Seq analysis. Viruses. 2013;5(7):1664-81.
9. Capomaccio S, Vitulo N, Verini-Supplizi A, Barcaccia G, Albiero A, D'Angelo M, et al. RNA sequencing of the exercise transcriptome in equine athletes. PLoS One. 2013;8(12):e83504.
10. Davis BW, Ostrander EA. Domestic dogs and cancer research: a breed-based genomics approach. ILAR J. 2014;55(1):59-68.
11. Patel AK, Bhatt VD, Tripathi AK, Sajnani MR, Jakhesara SJ, Koringa PG, et al. Identification of novel splice variants in horn cancer by RNA-Seq analysis in Zebu cattle. Genomics. 2013;101(1):57-63.

12. Beane J, Vick J, Schembri F, Anderlind C, Gower A, Campbell J, et al. Characterizing the impact of smoking and lung cancer on the airway transcriptome using RNA-Seq. *Cancer Prev Res.* 2011;4(6):803-17.
13. Sargent TD, Dawid IB. Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science.* 1983;222(4620):135-9.
14. Davis MM, Cohen DI, Nielsen EA, Steinmetz M, Paul WE, Hood L. Cell-type-specific cDNA probes and the murine I region: the localization and orientation of Ad alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(7):2194-8.
15. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(12):6025-30.
16. Hufton SE, Moerkerk PT, Brandwijk R, de Bruine AP, Arends JW, Hoogenboom HR. A profile of differentially expressed genes in primary colorectal cancer using suppression subtractive hybridization. *FEBS Lett.* 1999;463(1-2):77-82.
17. Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV, Weigel RJ. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(4):1116-23.
18. Parmigiani G, Garrett ES, Irizarry RA, Zeger SL. The analysis of gene expression data: an overview of methods and software. In: *The analysis of gene expression data: methods and software.* New York: Springer; 2003. p.1-45.
19. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 1992;257(5072):967-71.
20. Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(19):4965-70.
21. Janzen MA, Kuhlert DL, Jungst SB, Louis CF. ARPP-16 mRNA is up-regulated in the longissimus muscle of pigs possessing an elevated growth rate. *J Anim Sci.* 2000;78(6):1475-84.
22. Hu E, Wang D, Chen J, Tao X. Novel cyclotides from *Hedyotis diffusa* induce apoptosis and inhibit proliferation and migration of prostate cancer cells. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(3):4059-65.
23. Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G. New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology.* 2003;62(5 Suppl 1):34-43.
24. Tatsumi Y, Nakagawara A, inventors; Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc. Chiba-Prefecture, assignee. Cancer marker and therapeutic agent for cancer. United States patent US 008202690B2. 2012 Jun 19.

25. Murata T, Sato T, Kamoda T, Moriyama H, Kumazawa Y, Hanada N. Differential susceptibility to hydrogen sulfide-induced apoptosis between PHLDA1-overexpressing oral cancer cell lines and oral keratinocytes: role of PHLDA1 as an apoptosis suppressor. *Exp Cell Res.* 2014;320(2):247-57.
26. Finocchiaro LM, Fondello C, Gil-Cardeza ML, Rossi UA, Villaverde MS, Riveros MD, et al. Cytokine-enhanced vaccine and interferon-beta plus suicide gene therapy as surgery adjuvant treatments for spontaneous canine melanoma. *Hum Gene Ther.* 2015;26(6):367-76.
27. Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science.* 1991;252(5013):1651-6.
28. Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L, Efstratiadis A. Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(20):9228-32.
29. Watson MA, Fleming TP. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res.* 1994;54(17):4598-602.
30. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 1995;270(5235):484-7.
31. Morrissy AS, Morin RD, Delaney A, Zeng T, McDonald H, Jones S, et al. Next-generation tag sequencing for cancer gene expression profiling. *Genome Res.* 2009;19(10):1825-35.
32. Datson NA, van der Perk-de Jong J, van den Berg MP, de Kloet ER, Vreugdenhil E. MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(5):1300-7.
33. Hanriot L, Keime C, Gay N, Faure C, Dossat C, Wincker P, et al. A combination of LongSAGE with Solexa sequencing is well suited to explore the depth and the complexity of transcriptome. *BMC Genomics.* 2008;9:418.
34. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995;270(5235):467-70.
35. Sealfon SC, Chu TT. RNA and DNA microarrays. *Methods Mol Biol.* 2011;671:3-34.
36. Howard BE, Hu Q, Babaoglu AC, Chandra M, Borghi M, Tan X, et al. High-throughput RNA sequencing of pseudomonas-infected *Arabidopsis* reveals hidden transcriptome complexity and novel splice variants. *PLoS One.* 2013;8(10):e74183.
37. Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet.* 2002;32 Suppl:490-5.
38. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):14863-8.

39. Baglia ML, Cai Q, Zheng Y, Wu J, Su Y, Ye F, et al. Dual specificity phosphatase 4 gene expression in association with triple-negative breast cancer outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;148(1):211-20.
40. Perez-Rogers JF, Gerrein J, Anderlind C, Kusko RL, Campbell JD, Wang TW, et al., editors. Leveraging gene expression in the bronchial airway to develop a nasal biomarker for early detection of lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society 2014 International Conference*; 2014; San Diego. San Diego; ATSJournals; 2014.
41. Walter K, Holcomb T, Januario T, Yauch RL, Du P, Bourgon R, et al. Discovery and development of DNA methylation-based biomarkers for lung cancer. *Epigenomics.* 2014;6(1):59-72.
42. Klopfleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber AD. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer.* 2010;10:618.
43. Pawlowski KM, Maciejewski H, Dolka I, Mol JA, Motyl T, Krol M. Gene expression profiles in canine mammary carcinomas of various grades of malignancy. *BMC Vet Res.* 2013;9:78.
44. Rao NA, van Wolferen ME, van den Ham R, van Leenen D, Groot Koerkamp MJ, Holstege FC, et al. cDNA microarray profiles of canine mammary tumour cell lines reveal deregulated pathways pertaining to their phenotype. *Anim Genet.* 2008;39(4):333-45.
45. Fowles JS, Brown KC, Hess AM, Duval DL, Gustafson DL. Intra- and interspecies gene expression models for predicting drug response in canine osteosarcoma. *BMC Bioinformatics.* 2016;17(1):93.
46. Morin R, Bainbridge M, Fejes A, Hirst M, Krzywinski M, Pugh T, et al. Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *Biotechniques.* 2008;45(1):81-94.
47. Chu Y, Corey DR. RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Ther.* 2012;22(4):271-4.
48. Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. *Curr Protoc Mol Biol.* 2010; Suppl 89:1-13.
49. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63.
50. Gnimpieba EZ, Chango A, Lushbough CM. RNA-Seq gene and transcript expression analysis using the BioExtract Server and iPlant Collaborative. In: *Proceedings of the 5th ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology, and Health Informatics (ACM-BCB 2014)*; 2014 Sept 20-23; Newport Beach, CA. Newport Beach, CA: Association for Computing Machinery; 2014. p.661-9.

51. Rankin KS, Starkey M, Lunec J, Gerrand CH, Murphy S, Biswas S. Of dogs and men: comparative biology as a tool for the discovery of novel biomarkers and drug development targets in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58(3):327-33.
52. Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hotz B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res*. 2007;27(1A):155-64.
53. Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc*. 2012;7(8):1534-50.
54. Wan M, Wang J, Gao X, Sklar J. RNA sequencing and its applications in cancer diagnosis and targeted therapy. *North Am J Med Sci*. 2014;7(4):156-62.
55. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature*. 2009;458(7234):97-101.
56. Roberts A, Schaeffer L, Pachter L. Updating RNA-Seq analyses after re-annotation. *Bioinformatics*. 2013;29(13):1631-7.
57. Ravi I, Baunthiyal M, Saxena J. *Advances in biotechnology*. New Delhi: Springer; 2014.
58. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res*. 2008;18(9):1509-17.
59. Siu H, Zhu Y, Jin L, Xiong M. Implication of next-generation sequencing on association studies. *BMC Genomics*. 2011;12:322.
60. Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol*. 2010;11(2):R14.
61. Fu X, Fu N, Guo S, Yan Z, Xu Y, Hu H, et al. Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. *BMC Genomics*. 2009;10:161.
62. Atak ZK, Gianfelici V, Hulselmans G, De Keersmaecker K, Devasia AG, Geerdens E, et al. Comprehensive analysis of transcriptome variation uncovers known and novel driver events in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS Genet*. 2013;9(12):e1003997.
63. Eswaran J, Horvath A, Godbole S, Reddy SD, Mudvari P, Ohshiro K, et al. RNA sequencing of cancer reveals novel splicing alterations. *Sci Rep*. 2013;3:1689.
64. Märtson A, Kõks S, Reimann E, Prans E, Erm T, Maasalu K. Transcriptome analysis of osteosarcoma identifies suppression of wnt pathway and up-regulation of adiponectin as potential biomarker. *Genom Discov*. 2013;1(3):1-9.

Recebido em: 19/06/2015

Aceito em: 26/09/2016

SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA MUNDIAL DA BRUCELOSE HUMANA

Anna Paula Vitirito Maurelio¹
Bianca Paola Santarosa²
Danilo Otávio Laurenti Ferreira³
Mayra Teixeira Alas Martins²
Antonio Carlos Paes⁴
Jane Megid⁴

RESUMO

A brucelose é uma zoonose de grande relevância no contexto de saúde pública. A contaminação humana pode ocorrer por contato direto ou indireto com a fonte de infecção animal. A doença ocorre em humanos por quatro principais espécies de *Brucella*: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* e *Brucella canis*. Atualmente, a sua incidência é cerca de cinco vezes superior aos números oficiais, sobretudo devido à falta de diagnóstico e o não cumprimento da declaração obrigatória. A distribuição geográfica coincide com a endemia animal, sendo uma doença ocupacional e mais frequente em regiões rurais. Os mecanismos de patogênese da *Brucella* devem-se à sua capacidade de sobrevivência no meio intracelular, sendo que os lipopolissacarídeos exercem papel fundamental. A brucelose é uma doença sistêmica, e a sua apresentação e duração do quadro clínico permite caracterizá-la em formas aguda, crônica e localizada. Laboratorialmente, o teste sorológico de triagem preconizado é a soroaglutinação rápida com antígeno acidificado tamponado (AAT) e o confirmatório os testes de soroaglutinação lenta em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol ou a fixação do complemento. O cultivo bacteriano e testes de reação em cadeia pela polimerase (PCR) são importantes para identificação da espécie de *Brucella* em questão. O tratamento é extremamente longo, em torno de 42 dias. O principal protocolo estabelecido utiliza doxiciclina em associação com rifampicina. A prevenção da brucelose em humanos depende do controle e erradicação da doença nos animais. Observaram-se altas taxas de prevalência em países subdesenvolvidos, como os do norte da África, Oriente Médio, América Central e América do Sul.

Palavras-chave: Brucelose, distribuição mundial, humanos, prevalência.

HUMAN BRUCELLOSIS EPIDEMIOLOGICAL SITUATION IN THE WORLD.

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonosis of great importance in the public health context. Human contamination can occur by direct or indirect contact with the source of animal infection. The disease occurs in humans by four main species of *Brucella*: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* and *Brucella canis*. Currently, its incidence is about five times higher than the official figures, mainly due to lack of diagnosis and failure to comply with the mandatory declaration. The geographic distribution coincides with animal endemic, being an

¹ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Área Enfermidades Infecciosas dos Animais, (FMVZ-UNESP/Botucatu.

² Departamento de Clínica Veterinária, Área Clínica de Grandes Animais. FMVZ-UNESP/Botucatu. Correspondência.

³ Casa da Agricultura de Agudos-SP, EDR de Bauru-SP. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), Secretaria da Agricultura e Abastecimento (SAA) do Estado de SP.

⁴ Professor(a) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Área Enfermidades Infecciosas dos Animais. FMVZ-UNESP/Botucatu.

occupational disease and more frequent in rural areas. The *Brucella* pathogenesis mechanisms are due to their ability to survive intracellularly, and the lipopolysaccharide play a fundamental role. Brucellosis is a systemic disease, and its presentation and duration of the clinical condition allows to characterize it as acute, chronic, localized forms. Laboratory, the recommended screening serologic test is the rapid agglutination test with buffered acidified antigen (AAT) and the confirmatory tests of slow agglutination test in sera treated by 2-mercaptoethanol or complement fixation. The bacterial culture and polymerase chain reaction (PCR) are important for identification of *Brucella* species in question. The treatment is extremely long, about 42 days. The main doxycycline established protocol used in combination with rifampicin. The prevention of brucellosis in humans depends on the control and eradication of the disease in animals. There are high prevalence rates in developing countries, such as the northern Africa, the Middle East, Central America and South America.

Keywords: Brucellosis, human, prevalence, worldwide distribution.

SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA MUNDIAL DE LA BRUCELOSIS HUMANA

RESUMEN

La brucelosis es una zoonosis de gran importancia en el contexto de la salud pública. Contaminación humana puede ocurrir por contacto directo o indirecto con la fuente de infección animal. La enfermedad ocurre en los seres humanos por cuatro principales especies de *Brucella melitensis*: *Brucella*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* y *Brucella canis*. Actualmente, su incidencia es aproximadamente cinco veces mayor que las cifras oficiales, debido principalmente a la falta de diagnóstico y el incumplimiento de la declaración obligatoria. La distribución geográfica coincide con endemia animal, siendo una enfermedad profesional y más frecuentes en las zonas rurales. Los mecanismos de la patogénesis de *Brucella* se deben a su capacidad de sobrevivir intracelularmente, y el lipopolisacárido juegan un papel fundamental. La brucelosis es una enfermedad sistémica, su presentación y duración de la condición clínica permite caracterizarla como, las formas agudas, crónicas localizadas. En laboratorio, la prueba serológica de detección recomendada es la prueba de aglutinación rápida con antígeno tamponado acidificado (AAT) y las pruebas confirmatorias de prueba de aglutinación lenta en sueros tratados con 2-mercaptoetanol o fijación del complemento. La reacción de la cultura y la cadena de la polimerasa bacteriana (PCR) son importantes para la identificación de especies de *Brucella* en cuestión. El tratamiento es muy largo, unos 42 días. El principal protocolo establecido doxiciclina se utiliza en combinación con rifampicina. La prevención de la brucelosis en humanos depende del control y la erradicación de la enfermedad en los animales. Se observaron altas tasas de prevalencia en los países en desarrollo, como el norte de África, Oriente Medio, América Central y América del Sur.

Palabras clave: La brucelosis, la distribución en todo el mundo, humano, la prevalencia.

INTRODUÇÃO

A brucelose, também conhecida como “febre ondulante”, “febre do Mediterrâneo” ou “febre de Malta”, é uma importante zoonose e a infecção é quase sempre transmitida por contato direto ou indireto com animais infectados ou seus subprodutos. É uma enfermidade de distribuição universal, que acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos marcantes, por acometer rebanhos (1).

É uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella* spp, caracterizado nos seres humanos, principalmente, por quadro febril acompanhado por inúmeros sinais e sintomas

inespecíficos. Destacam-se, entre eles, a mialgia e artralgia, que podem mimetizar uma série de doenças, infecciosas ou não, com tendência à cronificação e capaz de afetar qualquer aparelho ou sistema (2,3).

A brucelose, embora subdiagnosticada e subestimada, é uma das mais importantes zoonoses bacterianas, com mais de meio milhão de casos novos em humanos reconhecidos anualmente, principalmente em países em desenvolvimento. É considerada de elevada endemicidade em áreas do Mediterrâneo, Península Arábica, Índia, México, América Central e América do Sul. Com isso, mesmo locais livres de brucelose animal podem apresentar casos importados devido à circulação de pessoas de áreas livres em áreas endêmicas. Em algumas áreas chegam a apresentar prevalência de dez casos por 100.000 habitantes e, embora seja raramente fatal nos seres humanos (letalidade de 0,1%) compromete o desempenho profissional, podendo manifestar quadros clínicos severos e o tratamento é bastante prolongado (3).

Atualmente, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (4), julga-se que, mesmo nos países desenvolvidos, a verdadeira prevalência da brucelose pode ser cinco ou mais vezes superiores aos números oficiais sugeridos. Este fato é atribuído ao subdiagnóstico e à subdeclaração "obrigatória". A estrutura para o diagnóstico da brucelose humana no Brasil ainda é incipiente, sendo importante e pertinente sua implantação e implementação (5).

Este trabalho se caracteriza como uma revisão dos principais aspectos da brucelose em humanos e a situação epidemiológica em diversas localidades do mundo.

REVISÃO DE LITERATURA

Histórico

A brucelose foi inicialmente descrita em humanos no início do século XIX, a partir de casos de febre sem causa específica, ocorridos na Ilha de Malta, no Mar Mediterrâneo, sendo por isso denominada Febre de Malta. A primeira descrição clínica da doença foi efetuada por Marston em 1859 (1,6).

Em 1887, David Bruce isolou o micro-organismo, até então denominado *Micrococcus melitensis*, responsável pela "febre de Malta" em um soldado britânico nas ilhas de Malta. Posteriormente, foi renomeado *Brucella melitensis* em sua homenagem (6).

Em 1905, Zammit demonstrou, ainda em Malta, a natureza zoonótica da *B. melitensis* realizando o isolamento da bactéria no leite de cabras. Bang e Stribolt, em 1917, isolaram o agente causador do aborto enzoótico dos bovinos e o chamaram de "*Bacillus abortus*" sendo posteriormente denominada *Brucella abortus* (7).

Agente Etiológico

As bactérias do gênero *Brucella* são pequenas bactérias Gram-negativas (0,6 x 0,6 x 1,5µm), cocobacilares e imóveis. Como não se decorem pelo ácido acético a 0,5% na técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificado (ZNM), são classificadas como ZNM-positivas. São aeróbicas, capnofílicas e catalase-positivas. Apresentam reação positiva à oxidase, com exceção de *B. ovis* e de *B. neotomae*. Todas as outras espécies de *Brucella* são urease-positivas, exceto *B. ovis*. Alguns biotipos de *B. abortus* e *B. ovis* requerem 5 a 10% de CO₂ para isolamento primário. Meios de cultura necessitam ser enriquecidos com sangue ou soro para o cultivo (8).

Atualmente são reconhecidas dez espécies de *Brucella*, classificadas com base em seus hospedeiros preferenciais. A *B. melitensis* acomete preferencialmente caprinos e ovinos; *B. abortus* bovinos e bubalinos; *B. suis* suídeos, lebres, renas e roedores; *B. neotomae* rato do deserto; *B. canis* caninos; *B. ovis* ovinos; *B. ceti* cetáceos; *B. pinnipedialis pinípedes* e *B.*

microti camundongo de campo (9). Recentemente, foi isolada e caracterizada *Brucella inopinata* em infecção de implante mamário em humano (10). Isolou-se de sopo uma bactéria semelhante a *B. inopinata* que potencialmente pode ser uma nova espécie de *Brucella* spp (11).

As *Brucellas* não são espécie-específicas, portanto podem ser transmitidas a outras espécies animais (9).

As espécies *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis* e *B. ovis* possuem biotipos e são classificadas de acordo com a caracterização fenotípica, sorotipagem, fagotipagem, sensibilidade a corantes, necessidade de CO₂ para crescimento, produção de H₂S, multiplicação na presença de tionina e fucsina básica e aglutinação com anti-soros monoespecíficos (A, M, R) (9,12). *B. abortus* possui sete biotipos, designados 1 a 6 e 9; *B. melitensis* três biotipos 1 a 3 e *B. suis* cinco biotipos designados de 1 a 5. A diferenciação dessas variantes é de grande importância epidemiológica e em menor extensão quanto à gravidade da doença em seres humanos (1).

Epidemiologia

A brucelose é uma zoonose de âmbito internacional de extrema relevância em termos de saúde pública. A doença, em humanos, já foi identificada em todo o mundo, mas especialmente na bacia do Mediterrâneo, na península arábica, no subcontinente indiano, e partes do México, da América Central e do Sul.

Atualmente, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (4), julga-se que, mesmo nos países desenvolvidos, a verdadeira incidência da brucelose não é precisa devido à falta de diagnósticos precisos e à falta de notificação de casos, que deveriam ser de caráter compulsório. A incidência humana varia de acordo com a densidade populacional dos rebanhos locais, o grau de endemia animal, o nível socioeconômico e os hábitos alimentares da população (13).

Além da acentuada assimetria regional, a brucelose também apresenta disparidade na distribuição por sexos, constatando-se maior incidência no sexo masculino, com razão de 2:1, com principal faixa etária dos 55 aos 64 anos, sendo rara na infância (provavelmente, por menor exposição deste grupo etário à contaminação cutânea e respiratória). Aparentemente, é uma zoonose dos meses de primavera, com pico de diagnóstico de novos casos nos meses de abril, maio e junho, coincidindo com o aumento do número de partos dos animais (em especial dos pequenos ruminantes) e, também, com o aumento da quantidade de leite cru disponível para consumo (14).

Nos animais, a brucelose é caracterizada por infecção de caráter crônico e persistente. A localização da *Brucella* preferencialmente em órgãos reprodutores é responsável pelas principais manifestações clínicas, que são esterilidade e abortamento (1). As *Brucellas* podem ser encontradas em grande quantidade no leite, urina e produtos de abortamento oriundo de animais infectados. Conseqüentemente, a brucelose tornou-se uma doença ocupacional para agricultores, veterinários, trabalhadores dos centros de abate e técnicos de laboratório (15).

As vias de transmissão para a espécie humana incluem o contato direto com animais ou com suas secreções, em soluções de continuidade cutâneas, aerossóis contaminados, inoculação no saco conjuntival ou ingestão de produtos não pasteurizados, em torno de 25% dos casos (16). Neste último caso, a *Brucella* pode permanecer viável de duas semanas até três meses (13), por isso, a ingestão de produtos lácteos contaminados é considerada a via de transmissão mais importante para humanos. Os principais alimentos implicados na transmissão de *Brucella abortus* aos humanos são leite cru e queijos processados com este produto (17,18). O consumo de produtos lácteos e queijo do México implicaram em 45% dos casos humanos reportados na Califórnia de 1973 a 1992 (19).

A ingestão de carne é uma origem de infecção pouco habitual, devido à baixa concentração do micro-organismo na musculatura (20). Em temperaturas abaixo de 5° C, o seu crescimento e multiplicação são inibidos, mas persistem mesmo a temperaturas de congelamento. Outro condicionante da viabilidade da *Brucella* é a acidez, sendo a bactéria inativada em pH inferior a 4,2. É inativada em 15 segundos à temperatura de 72°C e em três minutos a 62 a 63°C (pasteurização). No entanto, em zonas endêmicas, é preconizado o uso de temperaturas mais elevadas (85°C), para garantir a inocuidade, dado que o período de tempo decorrido desde a obtenção do produto e o seu processamento pode ser grande e a sua conservação insuficiente, permitindo, desta forma, proliferação elevada das bactérias. A presença de *Brucella* em queijo curado permanece controversa. Apesar de alguns autores terem identificado bactérias viáveis em queijos até 100 dias (21) parece ser aceitável considerar 60 dias de cura como tempo suficiente para garantir a inocuidade do produto.

Outras formas de apresentação de queijo, como o requeijão, mostrou-se seguro quando obtido pela acidificação do leite. No entanto, se obtido do leite coalhado, as *Brucella* podem sobreviver até 30 dias (21).

Há outras formas de transmissão humana possíveis, mas muito improváveis, salientando-se a contaminação dos vegetais por fezes e urina de animais infectados (21). A transmissão inter-humana é rara. Todavia, foram identificados casos de transmissão sexual, intrauterina e por aleitamento materno (22,23).

Notificação de Brucelose Humana

A brucelose representa impacto importante no mundo inteiro sobre a saúde humana e a indústria animal. Na maioria dos países, a brucelose é uma doença de notificação obrigatória (24).

De acordo com a Portaria do Ministério da Saúde nº 104, de 25 de janeiro de 2011, os surtos de brucelose, assim como de outras doenças de veiculação hídrica e alimentar, são enquadrados como eventos de potencial relevância em saúde pública quando existe alteração no padrão epidemiológico da doença (25).

Dessa forma, no Brasil, quanto à notificação, não é obrigatória quando ocorrem casos isolados, mas na vigência de surtos, deve ser notificada, realizada a investigação epidemiológica e adotadas as medidas de controle indicadas (26).

No entanto, no estado do Tocantins (26), há determinação para que todos os casos suspeitos de brucelose humana sejam notificados, conforme o Protocolo de Direcionamento para Suspeita Clínica, Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento dos Casos de Brucelose Humana. Este documento objetiva orientar os profissionais da rede estadual de atenção do SUS e das áreas técnicas de vigilância estadual para o manejo dos casos em sua área de abrangência.

Patogenia

O estabelecimento e as consequências da infecção por bactérias do gênero *Brucella* variam de acordo com a quantidade de micro-organismos e a suscetibilidade do hospedeiro. Ao penetrar no organismo do hospedeiro, as *Brucellas* são fagocitadas nas membranas das mucosas, e são transportadas para os linfonodos regionais. Persistem dentro de macrófagos driblando o sistema imune, inibindo a função do fagolisossomo, principal mecanismo de sobrevivência intracelular. A produção de superóxido dismutase e de catalase desempenha importante papel na resistência bacteriana frente aos processos oxidativos celulares (8).

A bacteremia intermitente resulta na disseminação e na localização junto aos órgãos reprodutivos e glândulas acessórias. Em casos crônicos, a bactéria pode se localizar em

articulações, em discos intervertebrais, sistema nervoso central, pericárdio, rins, sistema oftálmico e pele (1,8,27).

Manifestações clínicas

B. abortus, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* e *Brucellas* de mamíferos marinhos são considerados importantes patógenos humanos. Nos seres humanos, brucelose pode ser uma enfermidade séria, debilitante e, por vezes, doença crônica que pode afetar uma variedade de órgãos. A maioria dos casos ocorre devido à exposição ocupacional ou a ingestão de produtos lácteos não pasteurizados (27,28).

A brucelose é caracterizada como uma enfermidade de caráter febril, com evolução aguda ou subaguda, geralmente marcada por febre intermitente acompanhada por mal estar, anorexia, prostração, e que, na ausência de tratamento específico, pode persistir durante semanas ou meses. Em geral, alguns sinais mais específicos podem ocorrer, porém a hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia presentes são extremamente inespecíficos e podem ocorrer em diversas enfermidades. A fase aguda pode progredir para uma crônica com recaída, levando ao quadro denominado "síndrome da fadiga crônica" (1).

O período de incubação é de uma a três semanas, podendo se estender até vários meses. *B. melitensis* é a causa mais importante da brucelose humana em todo o mundo, e está associada com infecção aguda, que apresenta manifestações clínicas em período inferior a dois meses, enquanto que a infecção com outras espécies de *Brucella* é geralmente subaguda, manifestando clínica entre dois meses a um ano ou crônica, que inicia os sintomas com mais de um ano pós infecção (1,28).

Evolução aguda

A febre alta (superior a 38°C) pode apresentar-se de forma remitente, intermitente, irregular ou ondulante (menos frequente, desde o advento dos antibióticos); todavia, apresenta, acentuação vespertina, prolongando-se durante a noite, com períodos de remissão matinal. A sudorese é profusa, predominantemente noturna. As queixas álgicas incluem artralgias de pequenas e grandes articulações, mialgias e cefaleias. Outros sintomas frequentemente observados são anorexia, astenia, obstipação, náuseas, vômitos, tosse seca, alterações comportamentais, humor depressivo, alterações do sono e perda ponderal (14).

Evolução crônica

Distinguem-se por longa evolução marcada por frequentes recidivas. Como outras doenças sistêmicas, a brucelose pode atingir quaisquer órgãos ou sistemas. No entanto, poderá sobressair o envolvimento de um órgão específico. Envolvimento do sistema osteoarticular pode ocorrer em 20 a 60% dos casos, atingindo frequentemente várias articulações de forma assimétrica, sobretudo grandes articulações de carga (por ordem de frequência, coluna lombar, articulação sacroilíaca, articulação coxofemural, joelho e articulação tíbiotársica). Muitas vezes, o doente recorre ao seu médico por fortes dores na articulação sacroilíaca ou sacrolombar (29).

A osteomielite é uma lesão que ocorre predominantemente na coluna (mais frequentemente no segmento lombar), sendo raro o seu desenvolvimento em outra localização. Atinge, caracteristicamente e de forma precoce, a região anterior da face superior do corpo vertebral, evoluindo para espondilodiscite com lesões erosivas, com ou sem formação de abscessos paravertebrais e posterior fusão dos corpos vertebrais. O espectro de lesões osteoarticulares inclui artrite, osteomielite espondilótica, tenossinovites e bursites (14).

As manifestações neurológicas da doença resultam da localização da *Brucella* no sistema nervoso central, particularmente nas meninges (neuromeningobrucelose). O envolvimento do sistema nervoso central que ocorre em apenas 5% dos casos é caracterizado por meningite (ocorrendo rigidez da nuca em menos de 50% dos casos), meningoencefalite, meningorradiculonevrite, meningomielite ou lesão de nervos cranianos, sendo mais frequentemente atingido o VIII par (27).

As manifestações renais são raras. Em fase precoce, predominam os quadros de glomerulonefrite e pielonefrite, ao contrário das fases tardias, em que a pielonefrite crônica é mais frequente. Apesar das principais manifestações de brucelose em animais ser a esterilidade e os abortamentos espontâneos, em humanos não é mais frequente quando comparado a doenças bacterianas de outras origens (2).

Lesões em trato reprodutivo podem ocorrer, sendo comum apresentação clínica de orquite, epididimite e vesiculite seminal (27).

Lesões hepatobiliares podem ocorrer com frequência, pois o fígado é um importante órgão reticuloendotelial, levando a doença hepática granulomatosa indistinguível clinicamente de outras enfermidades (14).

Lesões cardiovasculares, embora de rara ocorrência (menos de 2% dos casos), a endocardite é responsável pela maioria da mortalidade. A valvulopatia é mais exuberante e frequente na válvula aórtica, outra situação identificada é a dos aneurismas micóticos, principalmente aórticos, e também a pericardite (30).

Relativamente raras, as formas cutâneas são caracterizadas predominantemente por lesões de hipersensibilidade, sob a forma de exantema máculo-papular, petéquias ou úlceras, destacando-se o eritema nodoso (1).

Afecções respiratórias em geral, são observadas quando ocorre contaminação por aerossóis, mais frequentemente observadas em magarefes e técnicos de laboratório. Apresentação clínica pode variar desde síndromes gripais até pneumonias, abscessos pulmonares, derrame pleural e adenopatias hilares. Raramente são identificados os microorganismos na expectoração. Quando há acometimento do sistema oftalmológico observam-se quadros de exoftalmite, sendo a uveíte uma consequência tardia, mediada por fatores imunológicos (14).

Diagnóstico

O diagnóstico da brucelose humana não pode ser efetuado exclusivamente pelos achados clínicos devido à grande variedade de manifestações clínicas da doença. É essencial a realização de testes bacteriológicos e sorológicos. Em pacientes febris oriundos de áreas endêmicas ou que viajaram recentemente para estes locais, a brucelose deve ser considerada como um diagnóstico diferencial. Além de outros quadros de febre de origem obscura, endocardite bacteriana, febre tifoide, dentre outras infecções. Por esta razão, a anamnese é essencial para direcionar o diagnóstico. Um teste rápido de triagem deve ser realizado: aglutinação em placa com antígeno acidificado tamponado, corado pelo Rosa Bengala, que é rápido e sensível, porém seus resultados necessitam ser confirmados por testes bacteriológicos ou testes sorológicos (1,14,27).

É necessário conhecer as vantagens e limitações de cada um para aplicação e interpretação mais precisa. As provas sorológicas atuais permitem diagnóstico preciso em mais de 95% dos casos, porém é necessário combinar algumas provas, como o teste Rosa Bengala e aglutinação em soro que detecte anticorpos aglutinantes (IgM, IgG e IgA), com outras que detectem os anticorpos não-aglutinantes que aparecem em etapas mais tardias, como o teste de Coombs Ig-G ou o ELISA-IgG. Estes métodos não se aplicam a *B. canis* e *B. ovis*, cujos diagnósticos requerem provas que detectem anticorpos que reagem aos antígenos lipopolissacarídeos específicos do fenótipo rugoso. As provas devem ter nível ótimo de

especificidade e de sensibilidade. Os métodos podem ser diretos ou indiretos (detecção de anticorpos contra *Brucella* spp). Os métodos diretos incluem o isolamento e a identificação do agente, imunistoquímica e métodos de detecção de ácidos nucleicos, principalmente a reação da polimerase em cadeia (PCR). Quanto aos métodos indiretos, o conhecimento da dinâmica das imunoglobulinas nos diferentes estágios da resposta imune tem orientado o desenvolvimento de inúmeros testes sorológicos. Estes testes visam demonstrar a presença de anticorpos anti-*Brucella* spp em vários fluidos corporais, como soro sanguíneo, leite, muco vaginal e sêmen. A resposta sorológica à infecção por *Brucella* sofre influência de muitos fatores, como o período de incubação da doença, que é muito variável e durante o qual a sorologia pode ser negativa; outros fatores são a natureza do desafio e a variação individual à infecção. Os testes sorológicos são classificados de acordo com o antígeno utilizado na reação. Nos testes de aglutinação (lenta, Rosa Bengala, de Coombs), de fixação do complemento ou imunofluorescência indireta, os antígenos são células inteiras de *Brucella* spp. Já nos testes de imunodifusão em gel (dupla ou radial), ELISA (indireto e competitivo) e outros, o antígeno é representado pelo lipopolissacarídeo da parede celular (S-LPS) da *Brucella* spp. semipurificado (29).

Tratamento

O elemento essencial no tratamento de todas as formas de brucelose humana é a administração de antibióticos eficazes para um período de tempo adequado. A antibioticoterapia deve ser instaurada precocemente, mesmo em pacientes que apresentem melhora clínica espontânea. Em pacientes com complicações, tratamento adicional, incluindo intervenção cirúrgica, será necessário. Brucelose aguda não complicada, quase que invariavelmente, responde bem ao adequado tratamento antibiótico. Uma variedade de fármacos antimicrobianos tem atividade *in vitro* contra as espécies de *Brucella*, no entanto, os resultados dos testes de sensibilidade de rotina nem sempre se correlacionam com a eficácia clínica *in vivo* (1).

A Organização Mundial da Saúde (4) elaborou protocolos específicos para tratamento da brucelose. O esquema de tratamento preferencial do paciente adulto e criança de oito a 14 anos consiste na administração de doxiciclina associada à rifampicina, com intervalo de 12 horas pelo período de 42 dias sem interrupção. Em crianças menores de oito anos, preconiza-se o uso de sultametoxazol com trimetoprim associado à rifampicina a cada 12 horas por 42 dias, ou ainda estreptomicina a cada 24 horas por 21 dias ou gentamicina a cada 24 horas durante 10 dias. A OMS ainda elaborou protocolos alternativos para gestantes, lactentes e pessoas que apresentem intolerância à rifampicina e para tratamento de infecções causadas pelas estirpes vacinais RB51 e B-19 (3).

Prevenção e Controle

O controle da brucelose requer colaboração multidisciplinar entre os serviços médicos humano e animal na vigilância ativa em nível local, e monitoramento integrado da doença em nível regional, nacional e internacional (31).

Medidas de controle da brucelose são baseadas na prevenção dos fatores de risco. A vigilância é um elemento fundamental para a gestão de programas de prevenção e controle (24).

A prevenção da brucelose em humanos depende, sobretudo, do controle e erradicação da doença nos animais (14). A vacinação e o controle sanitário dos rebanhos (eliminação dos animais doentes) são as principais medidas de controle (26). Intervenções no rebanho devem sempre ser acompanhadas por informação massiva, educação e programas de comunicação (32).

Torna-se, também, fundamental a adoção de medidas de proteção nas diferentes atividades profissionais como a proteção individual ao manipular fetos ou produtos de abortos (9). Em uma exploração animal, as pessoas devem utilizar equipamentos de proteção individual (EPIs): luvas, óculos, máscaras e botas; fazer a eliminação (abate sanitário) dos animais excretadores (doentes), assim como dos produtos excretados de animais doentes (sangue, vísceras, abortos, carcaças), além de cuidados no momento da imunização dos animais (33). Nos laboratórios deve-se atentar para o atendimento aos quesitos de biossegurança e boas práticas laboratoriais (26).

Ações e medidas de vigilância sanitária para reprimir a atividade clandestina de abate de animais para consumo humano devem ser postas em execução, como objetivo de prevenir o risco potencial de infecção brucélica de caráter zoonótico (34). A inspeção sanitária dos produtos de origem animal é uma medida de controle importante (26), visto que, de acordo com o artigo 163 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, devem ser condenadas as carcaças bovinas com lesões extensas de brucelose e nos casos de lesões localizadas, encaminham-se as carcaças à esterilização pelo calor depois de removidas e condenadas as partes atingidas (35).

A população deve ser orientada para apenas consumir leite ou derivados lácteos pasteurizados ou fervidos (26).

Situação Epidemiológica Mundial da Brucelose Humana

Estudos realizados sobre a frequência de casos de brucelose humana no mundo foram realizados analisando-se dados nacionais, ou subnacionais quando consideradas as regiões específicas do país. Foram baseados em taxas de casos diretamente reportados e estudos de soroprevalência. Observou-se grande variação regional na incidência de brucelose, um exemplo seria a disparidade no Norte da África e Região do Oriente Médio em que a incidência foi calculada a partir de um estudo de soroprevalência no Iraque resultando em 52,3 casos a cada 100.000 pessoas por ano em região rural, e 268,8 casos a cada 100.000 pessoas por ano em área considerada semirural. Os valores encontrados no período de 2002 a 2012 segundo o País e região são apresentados na Tabela 1 (36).

Tabela 1. Incidência de casos de brucelose por país (Casos por 100.000 pessoas/ano). Registros relacionados ao período de 2002 a 2012 (36).

PAÍS	NÍVEL DO ESTUDO	INCIDÊNCIA POR 100.000 PESSOAS/ANO
Norte da África e Oriente Médio		
Egito	Subnacional	0.28-70.00
Iraque	Subnacional	52.29-268.81
Iran	Subnacional	073-141.60
Jordânia	Nacional	25.70-130.00
Omã	Subnacional	11.01
Palestina	Subnacional	8.00
Arábia Saudita	Nacional	137.61
	Subnacional	6.00-149.54
Turquia	Subnacional	11.93-49.54
África Subsaariana		
Chade	Subnacional	34.86
Europa Ocidental		
Alemanha	Nacional	0.03
Grécia	Subnacional	4.00-32.49
Itália		1.4
Ásia Central		
Quirguistão	Nacional	88.00
América Central e Sul da América Latina		
Argentina	Subnacional	12.84
México	Subnacional	25.69
América do Norte		
EUA	Subnacional	0.02-0.09

No continente Africano, a brucelose já foi constatada em 40 dos 49 países africanos, representando 82%. Em 40,8% (20/49) desses países, representa um grande problema, em 20,4% (10/49), um problema moderado e nos outros dez países, um problema menor para a saúde humana e economia. Porém em nove deles que não referem à enfermidade avalia-se que apresentem a enfermidade, porém não realizaram a devida notificação. Dentre os países com brucelose detectada, 35 (48,5%) referem prevalência extremamente elevada, tornando-se importante problema de saúde pública e economia (37).

No sul da Arábia Saudita foram analisadas amostras sorológicas de 4900 indivíduos selecionados aleatoriamente com 19,2% de positividade, sendo que dentre os positivos apenas 2,3% apresentavam a doença na sua forma ativa. Os principais fatores de risco identificados foram contato com animais domésticos e consumo de produtos de origem animal sem tratamento térmico (38).

Cetinkaya et al. (39) avaliaram uma área rural do oeste de Anatólia, na Turquia. Foram selecionados aleatoriamente 1052 indivíduos, colhidas amostras de sangue e submetidas a testes sorológicos. Dentre elas, 51 (4,8%) eram soropositivas para *Brucella* spp.

No Noroeste da península do Peloponeso, na Grécia, em uma região rural foram sorologicamente testados para *Brucella* spp 414 pessoas, representando 7,5% da população do município investigado. Foi encontrado soropositividade em 140 amostras (33,8%) (40).

Foi realizado estudo retrospectivo na América Latina a partir de 1.933 estirpes de *Brucella* isoladas de seres humanos e animais. Foram selecionadas amostras em países da América Latina entre 1986 e 1991 e na Argentina entre 1994 e 2006. Durante o primeiro período 50% das estirpes eram de seres humanos, principalmente da Argentina, México e Peru, *B. suis* foi a principal causa de infecção na Argentina e *B. melitensis* foi responsável pela maioria das infecções em outros países. Na Argentina, nos anos posteriores, *B. melitensis*

e *B. suis* foram observadas mais frequentemente do que no primeiro período, enquanto o isolamento de *B. abortus* diminuiu comparativamente (41).

Spinola e Costa (42) efetuaram investigação sorológica da brucelose em trabalhadores de frigorífico que apresentam contato direto com animais e na área de abate em Salvador-BA. Foram examinadas amostras sorológicas de 85 pessoas com positividade de 66,4%, também foi realizado questionário epidemiológico e nenhum dos trabalhadores apresentava sinais clínicos da enfermidade.

Realizou-se inquérito epidemiológico na região Norte do Paraná, com o emprego de questionário e exames sorológicos de 150 trabalhadores de um frigorífico, com objetivo de determinar a sua prevalência e identificar o risco ocupacional. Foi observada prevalência de 0,66%, não sendo considerada nesta região como enfermidade predominantemente ocupacional (43).

Em Jataizinho, Paraná, foi realizado um levantamento sorológico de brucelose avaliando-se 63 propriedades rurais. Foram colhidas amostras de soro de 270 pessoas, das quais 25 (12,1%) mostraram-se positivas aos testes sorológicos (44).

Em maio de 2012, em um laboratório localizado em Minas Gerais, Brasil, foi detectado um surto de brucelose entre seus funcionários após falhas mecânicas em importantes componentes laboratoriais de segurança, a capela de fluxo laminar e a capela de segurança. Dentre os 11 indivíduos expostos, três deles apresentaram soroconversão e manifestações clínicas (45) demonstrando o risco da manipulação deste agente potencialmente patogênico.

No Brasil, de acordo como Sistema de Informações Hospitalares do SUS - SIH/SUS (25), do Ministério da Saúde, de janeiro de 2008 a abril 2011, houve 108 internações devido à brucelose, no âmbito do SUS, sendo 13 na Região Norte, 17 na Região Nordeste, 34 na Região Sudeste, 38 na Região Sul e seis na Região Centro-Oeste. A média de dias de internação por brucelose no Brasil, naquele período, foi de 9,5 dias. Com relação ao número de óbitos ocorridos, foram quatro durante este mesmo período, sendo um óbito na Região Nordeste, um na Região Sudeste e dois na Região Sul do Brasil.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta revisão revelou que a brucelose humana descrita em quase todo mundo pode ser provocada pelas diversas espécies de *Brucella* já descritas. É uma enfermidade de difícil tratamento e com variadas formas clínicas já relatadas. Os casos estão associados, em sua grande maioria, com a doença ocupacional e ingestão de subprodutos de origem animal sem tratamento térmico prévio.

Baseando na alta prevalência da enfermidade, principalmente em áreas rurais, ressalta-se a importância da educação continuada em saúde no que se refere ao consumo de produtos de origem animal não pasteurizado, aos cuidados a serem tomados na manipulação de animais e a importância dos programas nacionais de controle e erradicação da brucelose como medida de controle da enfermidade animal minimizando o risco para a saúde humana.

Uma abordagem integrada entre saúde humana e serviços veterinários permitiria a melhor compreensão da dinâmica da enfermidade na espécie humana, colaborando assim para novas pesquisas e conseqüentemente refletindo em melhorias na saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Corbel MJ, Ariza J, Banai M, Cosivi O, Diaz R, Dranovskaya EA, et al. Brucellosis in humans and animals. Geneva: World Health Organization; 2006.
2. Young EJ. Human Brucellosis. Infect Dis. 1983;5:321-42.

3. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Estado de Santa Catarina. Protocolo Estadual de vigilância e manejo clínico da brucelose humana. Florianópolis: DIVE; 2012. p.1-30.
4. Organização Mundial da Saúde. Comitê mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Geneva: OMS; 1986. p.149. (Informes Técnicos 740).
5. Ferreira Neto JS. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil: bases para as intervenções. Goiânia; 2009 [cited 2014 Nov 10]. Available from: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewFile/7669/5442>.
6. Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res.* 2005;36:313-26.
7. Pacheco G, Melo MT. Brucelose. Rio de Janeiro: IBGE; 1956.
8. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Maguire D. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed; 2007.
9. Poester FP. Brucelose. In: Napoli L, Sartor DR, Martins JP. Manual de zoonoses. Porto Alegre: CMRV; 2009. p.9-21.
10. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:801-8.
11. Eisenberg T, Hamann H-P, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, et al. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl Environ Microbiol.* 2012;10:301-15.
12. Cloeckaert A, Vizcaíno N. DNA Polymorphism and Taxonomy of *Brucella* Species. In: López-Goñi I, Moriyón, I. *Brucella: molecular and cellular biology*. Pamplona: Horizon Bioscience; 2004. p.1-23.
13. Carvalho MS, Barroso MR, Pinhal F, Mota Tavares F. Brucelose, alguns aspectos epidemiológicos. *Med Interna.* 1995;2:259-61.
14. Pessegueiro P, Barata C, Correia J. Brucelose: uma revisão sistematizada. *Med Interna.* 2003;10:91-100.
15. Young EJ, Suvannoparrat U. Brucellosis outbreak attributed to ingestion of unpasteurized goat cheese. *Arch Intern Med.* 1975;135:240-3.
16. Syrjamaki C, Migliazza A, Yarborough JW, Meyer LE. *Brucella abortus* endocarditis following ingestion of cow's blood. *Nebr Med J.* 1984;69:141-2.
17. Langoni H, Ichihara SM, Silva AV, Pardo RB, Tonin FB, Mendonça LJP, et al. Isolation of *Brucella* spp from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2000;37(6).

18. Namiduru M, Gungor K, Dikenso YO, Baydar I, Ekinçi E, Darooglan I, et al. Epidemiological, clinical and laboratory features of brucellosis: a prospective evaluation of 120 adult patients. *Int J Clin Pract.* 2003;51:20-4.
19. Chomel B, Debess E, Mangiamele D, Reilly K, Farver T, Sun R, et al. Changing trends in the epidemiology of human brucellosis in California from 1973 to 1992: a shift toward foodborne transmission. *J Infect Dis.* 1994;170:1216-23.
20. Enright FM. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In: Nielson K, Duncan JR. *Animal Brucellosis.* Boca Raton, Fla: CCR Press; 1990. p.301-20.
21. Carvalho MP, Souza LS, Carvalho JA, Araújo BM. Fatores de risco e soroprevalência da Brucelose em assentamento rural no Município de Aragominas - TO, Brasil. *Cad UniFOA.* 2013;22:81-93.
22. Ruben B, Band JD, Wong P, Colville J. Person-to-person transmission of *Brucella melitensis.* *Lancet.* 1991;337:14-5.
23. Barnett B. Brucellosis: congenital transmission in Galveston. *Dis Prev News.* 1996;56:1-2.
24. Pan American Health Organization. Case definitions: Anthrax, Brucellosis and Rabies. *Epidemiol Bull.* 2000;21:12-14.
25. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 104, de 25 de Janeiro de 2011. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
26. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
27. Acha NP, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 3rd ed. Washington: PAHO; 2003. vol.1.
28. Megid J, Mathias A, Robles CA. Clinical manifestations of Brucellosis in domestic animals and humans. *Open Vet Sci J.* 2010;4:119-26.
29. Lawinsky MLJ, Ohara PM, Elkhoury MR, Faria NC, Cavalcante KRLJ. Estado da arte da brucelose em humanos. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2010;1:75-84.
30. Gomez-Huelgas R, De Mora M, Parras JJ, Nuño E, SanRoman CM. *Brucella* and acute pericarditis: fortuitous or causal association? *J Infect Dis.* 1986;154:544.
31. World Health Organization. Operational research in tropical and other communicable diseases: final report summaries 2001-2002. Cairo: WHO; 2004.

32. Zinsstag J, Schelling E, Roth F, Bonfoh B, Savigny D, Tanner M. Human benefits of animal interventions for zoonosis control. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:527-31.
33. Nociti RP, Nociti DLP, Silva GCP, Avila MO. Fatores de risco associados à brucelose em médicos veterinários com predisposição ocupacional em Mato Grosso, Brasil. In: *Anais 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*; 2008; Gramado. Gramado: CONBRAVET; 2008.
34. Freitas JA, Galindo GAR, Santos EJC, Sarraf KA, Oliveira JP. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. *Rev Saude Publica*. 2001;35:101-2.
35. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Decreto nº 30.691, de 29 de Março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília: MAPA; 1952.
36. Dean A, Crump L, Greter H, Schelling E, Zinsstag J. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency. *PLOS Negl Trop Dis*. 2012;6:1-9.
37. Thimm B, Wundt W. The epidemiological situation of brucellosis in Africa. *Dev Biol Stand*. 1976;31:201-17.
38. Alballa SR. Epidemiology of human brucellosis in southern Saudi Arabia. *J Trop Med Hyn*. 1995;98:185-9.
39. Cetinkaya Z, Aktepe OP, Ciftci IH, Demirel R. Seroprevalence of human brucellosis in a rural area of Western Anatolia, Turkey. *J Health Popul Nutr*. 2005;23:137-41.
40. Bikas C, Jelastopulu E, Leotsinidis M, Kondakis X. Epidemiology of human brucellosis in a rural area of north-western Peloponnese in Greece. *Eur J Epidemiol*. 2003;18:267-74.
41. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect*. 2008;136:496-503.
42. Spinola AG, Costa MD. Brucelose humana em operários de um frigorífico no município de Salvador, Bahia, Brasil. *Rev Saude Publica*. 1972;6:157-65.
43. Gonçalves DD, Teles PS, Reis CR, Lopes FMR, Freire RL, Navarro IT, et al. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2006;48:135-40.
44. Gonçalves DD, Benitez A, Lopes-Mori FM, Alves LA, Freire RL, Navarro IT, et al. Zoonoses in humans from small rural properties in Jataizinho, Parana, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2013;44:125-31.
45. Rodrigues ALC, Silva SKL, Pinto BLA, Silva JB, Tupinambás U. Outbreak of laboratory-acquired *Brucella abortus* in Brazil: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46:791-4.

Recebido em: 03/12/2014

Aceito em: 28/09/2016

LINFOMA CANINO: REVISÃO DE LITERATURA COM ÊNFASE NO LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B*

Maria Claudia Lopes Silva¹
Julio Lopes Sequeira²

RESUMO

Os linfomas não Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães, no entanto, sua etiologia não está bem estabelecida e há diversos fatores que devem contribuir para seu desenvolvimento, como alterações no sistema imune, fatores ambientais e alterações genéticas. A neoplasia pode ocorrer em qualquer idade, mas afeta, predominantemente, animais de meia idade a idosos. Anatomicamente, os linfomas caninos podem ser classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e solitário, com cinco estágios clínicos e dois subestágios. Nos últimos anos, foram utilizadas diversas classificações humanas, além de classificação proposta para os animais domésticos. A imunofenotipagem dos linfomas está incorporada aos sistemas mais atuais de classificação, assim como a determinação da expressão de marcadores biológicos de proliferação e apoptose. O Linfoma Difuso de Grandes Células B (DLBCL) é o subtipo mais frequente, tanto no cão quanto em humanos. Os DLBCLs são neoplasias formadas por células linfoides B caracterizadas por um padrão de crescimento difuso e podem apresentar pelo menos cinco variantes que estão relacionadas com padrões distintos de comportamento biológico, inclusive nos cães. No entanto, rotineiramente, estes tumores são apenas classificados como DLBCLs sem considerar suas particularidades morfológicas, seu perfil imunoistoquímico e seu índice proliferativo. Por isso, a World Health Organization (WHO) propõe que, nos trabalhos de pesquisa, estas variantes sejam investigadas detalhadamente com o intuito de identificar as diferenças que possibilitem discriminar novas entidades.

Palavras-chave: linfoma, cão, DLBCL, imunofenotipagem.

CANINE LYMPHOMA: LITERATURE REVIEW EMPHASIZING ON DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA

ABSTRACT

Non Hodgkin lymphomas (LNHs) are the most common hematopoietic tumors of dogs. However, its etiology is not well established and there are many probable factors that may lead to its development such as immune system aberrations, environmental elements and genetic changes. The tumor may occur at any age but it predominantly affects middle age to elderly dogs. Canine lymphoma can be anatomically divided into multicentric, digestive, thymic, cutaneous or solitary and also into five clinical and two subclinical stages. Lately various human classifications and also one proposed for domestic animals have been used. Lymphoma immunophenotyping is incorporated into current classification systems as well as determination of biological markers for proliferation and apoptosis. Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) is the most frequent subtype both in dogs and humans. DLBCLs are tumors composed of lymphoid B cell characterized by a diffuse growth pattern. DLBCLs may present at least five variants which relates to different patterns of biological behavior including in dogs. However, routinely these tumors are only classified as DLBCLs without

* Apoio e financiamento: Agências FAPESP - 2013/02253-3

¹ Residência em Patologia Veterinária pela FMVZ-UNESP-Botucatu. Contato principal para correspondência.

² Professor da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" Campus Botucatu.

taking into account its morphologic characteristics, immunohistochemical profile and proliferation index. On account of this the World Health Organization (WHO) proposes that on research projects those variants are thoroughly investigated in order to identify differences that enable establishment of new entities.

Keywords: lymphoma, dog, DLBCL, immunophenotyping.

LINFOMA CANINO: REVISION DE LITERATURA CON ENFASIS EN LINFOMA DIFUSO DE CELULAS B GRANDES

RESUMEN

Los linfomas no Hodgkin (LNH) son las neoplasias hematopoyéticas más comunes en los perros, sin embargo, su etiología no está bien conocida. Existen varios factores que pueden contribuir con su desarrollo, como cambios en el sistema inmunológico, factores ambientales y alteraciones genéticas. El cáncer puede ocurrir en cualquier edad, pero se sabe que afecta principalmente a animales de mediana edad y animales más viejos. Anatómicamente, el linfoma canino se puede clasificar en multicéntrico, digestivo, tímico, cútaneo y solitario, con cinco estadios clínicos y dos subestadios. En los últimos años se han utilizado diversas clasificaciones en humano, y se han propuesto para los animales domésticos. El inmunofenotipaje de los linfomas se ha incorporado a la mayoría de los sistemas actuales de clasificación, igualmente, la determinación de marcadores biológicos de proliferación y apoptosis. Los linfomas difuso de células B grandes (DLBCL) es el subtipo más común en el perro y en el hombre. Los DLBCL son neoplasias que están formadas por células linfoides B caracterizadas por un patrón de crecimiento difuso y pueden presentar por lo menos cinco variantes que están relacionados con diferentes patrones de comportamiento biológico, incluso en perros. Sin embargo, usualmente estos tumores se clasifican sólo como DLBCL sin tener en cuenta sus características morfológicas, su perfil inmunohistoquímico y su índice de proliferación. Por lo tanto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere que en estos estudios, estas variantes sean investigadas a profundidad con el fin de identificar las diferencias que permiten identificar nuevas entidades.

Palabras clave: linfoma, perro, DLBCL, immunophenotyping.

INTRODUÇÃO

Os linfomas não-Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães e estes têm sido propostos como modelo de ocorrência espontânea para o estudo da etiologia e protocolos de tratamento dos LNHs humanos (1,2,3). Já há algum tempo a classificação morfológica dos LNHs caninos têm se baseado com sucesso nas diferentes classificações propostas para os LNHs humanos (4,5). Em humanos, aproximadamente um terço de todos os linfomas em adultos são linfomas difusos de grandes células B, o qual é também o tipo de LNH mais frequente nos cães (5,3)

Nas classificações de LNHs humanas, principalmente a WHO, os subtipos são caracterizados por dados epidemiológicos, clínicos, fenotípicos e genéticos, que permitem a identificação de entidades morfológicas (1,3). Esta também tem sido a tendência para a classificação atual dos linfomas caninos, visto que cada vez mais há trabalhos que focam em alterações genéticas similares às encontradas em humanos, as quais podem permitir maior acurácia na classificação e potencialmente desenvolvimento de terapia mais eficaz para determinados tipos de linfoma (6,7,8,3).

Atualmente, a imunofenotipagem dos linfomas está incorporada aos sistemas de classificação dos linfomas caninos, assim como a determinação da expressão de marcadores biológicos como Ki-67, caspase-3 e p53 (9). A determinação do índice proliferativo, utilizando-se o Ki67, pode aumentar a acurácia da classificação dos linfomas e facilitar a diferenciação entre determinados subtipos que são morfológicamente semelhantes como o linfoma de zona marginal, utilizando-se os índices proliferativos e apoptóticos maiores apresentados pelos DLBCLs (10).

Na espécie humana, os linfomas de alto grau que possuem maior índice de positividade para caspase-3 respondem melhor ao tratamento (11). Este tipo de avaliação ainda é pouco comum nas neoplasias caninas, porém, nos linfomas caninos, empregando-se as classificações de Kiel e Working Formulation, observou-se grande variação no percentual de células positivas, não sendo constatada diferença entre os linfomas de alto e baixo grau e entre os diferentes imunofenótipos (9). A determinação do percentual de células positivas para caspase-3 e a aplicação de classificações mais atuais, como as propostas para os animais domésticos (4) e para os seres humanos (12) nos linfomas caninos, mais especificamente os DLBCLs, podem auxiliar no estabelecimento de um perfil mais detalhado destas neoplasias.

Na literatura, a expressão do p53 alterado no linfoma varia de 22 a 60% dos casos (9,13,14,15). Sueiro et. al (14) não detectaram correlação da expressão do p53 com imunofenótipo e grau de malignidade das neoplasias. Em estudo recente, não foi constatada diferença nos níveis de expressão e frequência da mutação do gene p53 entre os grupos de animais portadores de linfomas sensíveis e resistentes à quimioterapia (16). Em outro estudo, foi observado que a expressão do p53 teria impacto negativo na sobrevida total do animal, mas não influenciaria no tempo de recorrência da doença (15). Assim, na Medicina Veterinária, o papel desempenhado pelo p53 é controverso (9,14).

O presente estudo teve como objetivo revisar as principais características do linfoma canino, considerando aspectos de etiologia, epidemiologia, diagnóstico e tratamento, com ênfase no subtipo Linfoma Difuso de Grandes Células B.

REVISÃO DE LITERATURA

Os linfomas não Hodgkin (LNHs) são as neoplasias hematopoiéticas mais comuns nos cães (17,18), com incidência variando de 13 a 33 casos por 100.000 cães, o que os torna mais comuns nesta espécie do que em humanos. Quando se leva em conta apenas cães idosos, a prevalência pode chegar a 84 por 100.000, já para cães com menos de um ano, cai para 1,5 por 100.000 cães (19). Existem trabalhos que apontam números ainda mais altos, como é o caso de um estudo da população de Golden retrievers na Alemanha em que se observou o valor de 116 por 100.000 cães. (20).

Ainda não está bem estabelecida uma causa para o linfoma, mas há fatores que devem contribuir para o desenvolvimento da doença. Aberrações no sistema imune foram observadas em cães com linfoma, além de aumento da ocorrência em cães com doenças autoimunes. Não foi comprovado, no entanto, uma relação de causa e efeito. Em humanos, o risco de se desenvolver câncer no sistema linforreticular é maior em pessoas com imunossupressão. Acredita-se que isso seja devido ao fato que pode ocorrer superexpressão de alguns oncogenes em linfócitos destes pacientes, o que eventualmente levaria ao desenvolvimento da neoplasia (21).

Foi teorizado ainda associação à exposição a produtos químicos, potencialmente por terem efeito imunossupressor. Outra possível causa para o linfoma seria infecção viral, sendo esta ainda não comprovada em cães, mas observada em alguns tipos de leucemia e linfoma em humanos. Em estudo realizado na cidade de São Paulo, foi observada associação positiva entre cães que residem fora da residência perto de ruas e avenidas movimentadas e aumento no risco de desenvolvimento de linfoma, sugerindo que a poluição ambiental advinda do

trânsito de veículos pode estar associada com a doença (22). Além destas causas, estão aumentando os estudos com relação às anormalidades cromossômicas, já tendo sido observadas alterações numéricas (20) e ainda translocações cromossômicas (23).

Alterações epigenéticas são eventos precoces durante a carcinogênese e a hipermetilação de ilhas CpG em regiões promotoras de genes supressores de tumor é um mecanismo bem conhecido de silenciamento gênico que contribui para o desenvolvimento e progressão tumoral. Inibidor de Via do Fator Tecidual 2 (TFPI-2) é um supressor de tumor envolvido na inibição de invasão. O silenciamento do TFPI-2 é amplamente relatado em várias malignidades humanas, mas pouco avaliado no linfoma (24).

Em 2014, Ferraresso et al. (24) investigaram a expressão do TFPI-2 no Linfoma Difuso de Grandes Células B canino comparando com linfoma normal e observaram hipermetilação em 77% das amostras tumorais. Verificaram ainda que o nível de metilação estava significativamente aumentado comparado ao controle e a análise identificou 82% dos loci com hipermetilação, com aumento médio de 2 a 120 vezes. A análise de expressão gênica confirmou diminuição da expressão do TFPI-2 nos DLBCLs comparado a linfonodo normal, sugerindo que a sua hipermetilação regula negativamente a transcrição. Foi encontrada ainda correlação positiva entre nível de metilação e idade do animal, provendo a primeira indicação de modificações epigenéticas no DLBCL associadas com a idade. No futuro, este achado pode ser considerado em associação para o prognóstico e terapia.

Os cães exibem biologia tumoral, influência ambiental, comportamento biológico tumoral e aberrações genéticas semelhantes ao homem. A incidência de linfoma em humanos e cães é semelhante, o tipo mais comum de LNH é o mesmo em humanos e no cão – linfoma difuso de células B– e os mesmos agentes quimioterápicos são utilizados e por isso a doença na espécie canina tem sido proposta como modelo para o estudo da etiologia e de protocolos de tratamento dos LNHS humanos (1,2,3,25).

Anatomicamente, os linfomas caninos podem ser classificados em: multicêntrico, digestivo, tímico, cutâneo e extranodal ou solitário. De acordo com a World Health Organization (WHO), os linfomas caninos podem ser classificados em cinco estágios clínicos e dois subestágios os quais refletem o grau de envolvimento dos órgãos afetados e sinais clínicos apresentados pelo animal, respectivamente (26). Assim a extensão da doença pode ser descrita e a maioria dos linfomas caninos se apresenta em estágios avançados, III, IV ou V (21,27,28,29). Os sinais clínicos associados são variáveis e dependem entre outros fatores da localização do tumor (26).

Na forma multicêntrica, que é a mais comumente encontrada (1,22,27,29,30), o achado mais consistente é linfadenopatia indolor generalizada, com possível hepatoesplenomegalia e envolvimento da medula óssea. A forma mediastinal é relatada como a segunda apresentação mais comum (30). É caracterizada pelo aumento dos linfonodos mediastínicos craniais e/ou timo, e os sinais clínicos incluem dispneia, tosse, intolerância ao exercício e regurgitação (21).

Cães com a forma alimentar ou digestiva comumente apresentam sinais gastroentéricos inespecíficos como êmese, diarreia e perda de peso. Linfonodos mesentéricos, fígado e baço também podem estar envolvidos (21). O linfoma cutâneo no cão pode ser generalizado ou multifocal e histologicamente pode ser dividido em epiteliotrópico (normalmente de origem T) e não epiteliotrópico (normalmente de origem B). Os tumores podem se apresentar na forma de nódulos, placas, úlceras, eritroderma e dermatite esfoliativa (26). A forma extranodal ou isolada é mais incomum e pode afetar qualquer tecido do corpo, sendo sítios comuns o tecido ocular e neural (31)

Os linfomas podem ser divididos ainda de acordo com sua origem em linfomas de células B e T, sendo que o T é apontado como de pior prognóstico (17). Na literatura internacional, tem-se o linfoma B como o de maior ocorrência nos cães (1,32), já na literatura brasileira foi observado tanto predominância de linfomas T (27,33), quanto de linfoma B (28).

Foi levantada a hipótese que essa variação se deve ao número limitado de indivíduos avaliados, assim, um estudo mais amplo poderia eliminar uma possível variação regional em relação ao imunofenótipo da neoplasia (29).

Não há predisposição sexual para o desenvolvimento de linfoma, mas já foi observada em alguns estudos tendência de maior ocorrência em machos (27,31,33,34,35).

O linfoma pode ocorrer em qualquer idade, mas afeta, predominantemente, animais de meia idade a idosos (20). Estudos relatam médias variando de 5,9 a 9,5 anos (17,22,27,29,30,34,36).

A predisposição racial para o desenvolvimento do linfoma na espécie canina tem sido descrita (1). Raças com risco aumentado de linfoma incluem Bouvier des Flandres, Rottweiler, Doberman, Pastor Alemão, São Bernardo, Labrador, Golden retriever, Scottish terrier, Setter e Bull Mastiff (17,19,34). Algumas raças de pequeno porte frequentemente acometidas pelo linfoma incluem o Poodle e o Scottish Terrier (17). Raças com menor acometimento incluem Dachshund, Poodle toy, Yorkshire terrier e Pomeranians (21,26).

No Brasil, a presença de animais sem raça definida é sempre expressiva e, portanto, isto se reflete nos resultados das casuísticas que têm sido publicadas. Dentre as raças mais observadas, a ocorrência é maior em animais de grande porte como Pastor Alemão, Boxer, Dobbermann e Rottweiler (27,30).

Foi observada uma maior probabilidade de desenvolver determinado imunofenótipo do linfoma de acordo com a raça. Os Boxers têm risco aumentado de desenvolver neoplasias T, assim como Bullmastiff e raças Sptiz e cães asiáticos de “colo”, enquanto que Border Collie, Baset Hound, Cocker Spaniel, Doberman, Pastor Alemão e provavelmente Rottweiler são afetados principalmente por neoplasias B (36,37). Devido à ocorrência em grupos de raças que possuem origem em comum, acredita-se que o risco aumentado de desenvolvimento de doenças linfoproliferativas de origem T pode ter surgido em algum ancestral, enquanto que o risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias B pode surgir de diferentes fatores de risco ou combinações que tiveram origem durante o processo de seleção da raça (37).

Já há algum tempo, a classificação morfológica dos LNHS caninos tem se baseado com sucesso nas diferentes classificações propostas para os LNHS humanos – classificação atualizada de Kiel, Working Formulation for Clinical Usage (WF), Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL) e mais recentemente a classificação da World Health Organization (WHO) – levando em conta caracteres epidemiológicos, clínicos, fenotípicos e genéticos, que em humanos permitem a identificação de entidades morfológicas (1).

Na Medicina Veterinária, todos esses sistemas propostos foram aplicados na medida em que eram desenvolvidos (1,4,21). Mesmo que sem concordância entre os especialistas veterinários sobre qual seria o mais adequado, os resultados foram animadores (4). Independentemente da classificação utilizada, a principal diferença identificada entre seres humanos e cães foi a predominância dos linfomas mais agressivos nesta última espécie, sendo os linfomas foliculares pouco frequentes (38). No entanto, o valor do cão como modelo da doença humana depende da possibilidade de distinção dos principais subgrupos de linfomas em ambas as espécies com uma classificação confiável dos LNHS caninos seguindo esquemas atualmente utilizados para os LNHS humanos (1).

E, humanos, aproximadamente um terço de todos os linfomas em adultos são Linfomas Difusos de Grandes Células B (Diffuse Large B Cell Lymphoma – DLBCL), que é considerado a forma mais comum de linfoma não Hodgkin no mundo ocidental. O DLBCL está associado a um histórico agressivo, com média de sobrevida de menos de um ano em pacientes não tratados (39). Segundo os autores que utilizaram a classificação da WHO, o subtipo de LNH mais frequente nos cães é o DLBCL (3,5).

Nas classificações mais antigas o DLBCL é correspondente aos subtipos histiocítico difuso e misto histiocítico-linfocítico difuso na Rappaport; célula de centro de folículo grande

clivada e não clivada e imunoblástico B na Lukes Collins; difuso de grandes células, imunoblástico de grandes células, difuso misto de pequenas e grandes células na Working Formulation e linfoma difuso de grandes células B na REAL (40).

A proposta da Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos da World Health Organization (WHO) é baseada na classificação REAL/WHO utilizada nos linfomas humanos (4,35). Ela tem sido utilizada por vários autores em diferentes espécies, porém, sem que haja consenso na sua adequação para os LNHs caninos. Grupos importantes no estudo deste tipo de neoplasia ainda consideram que a classificação de Kiel atualizada (41) não deve ser descartada (1).

Na classificação atualizada de Kiel, os subtipos correspondentes aos DLBCL são os linfomas centroblasticos monomórficos e polimórficos, os imunoblásticos B e os anaplásicos de grandes células B (41), que correspondem também ao maior percentual dos casos encontrados, mais de 50%, quando se aplica esta classificação aos linfomas caninos (1).

Os autores que utilizaram a Classificação de Kiel já demonstraram a importância dessa classificação para os linfomas caninos, sendo esta classificação utilizada ainda em trabalhos de pesquisa recentes (1). O aspecto comparativo ou a correspondência entre as duas classificações – WHO e Kiel – torna-se importante na avaliação dos Linfomas de Grandes Células B (Tabela 1), na medida em que a classificação de Kiel serve como parâmetro para o estabelecimento do prognóstico nos cães (21).

Os DLBCLs são neoplasias de padrão de crescimento difuso formadas por células linfoides B que possuem núcleo de tamanho igual ou que excede o tamanho do núcleo de um macrófago normal ou que corresponde a mais de duas vezes o tamanho de um linfócito normal (12). A classificação da WHO propõe que os patologistas utilizem somente o termo Linfoma Difuso de Grandes Células B como diagnóstico final. Esta recomendação acompanha a proposta contida na classificação REAL (42), pois a identificação de subtipos de DLBCL seria de difícil reprodução entre os patologistas e alguns subtipos seriam ainda controversos. No entanto, a Classificação da WHO também propõe que estes subtipos sejam considerados nos trabalhos de pesquisa com o intuito de demonstrar as diferenças no comportamento biológico das diversas variantes procurando estabelecer novas entidades (12).

Segundo a Classificação Histológica dos Tumores Hematopoiéticos dos Animais Domésticos da WHO, os DLBCLs podem apresentar pelo menos cinco variantes que estão relacionadas a comportamentos biológicos diversos - o Linfoma de Células B Rico em Células T, o Linfoma Imunoblástico de Grandes Células, o Linfoma de Grandes Células B (não clivadas e clivadas), o Linfoma de Células B Tímico (mediastinal B) e o Linfoma Intravascular de Grandes Células B – descritos nas espécies domésticas, inclusive nos cães (4). Porém, estes tumores geralmente são incluídos entre os DLBCLs sem que sejam descritas em detalhe suas características morfológicas, seu perfil imunoistoquímico e seu índice proliferativo.

O Linfoma de Células B Rico em Células T é caracterizado por progressão lenta, composto por uma população mista de células T pequenas clivadas e células B neoplásicas grandes, sendo que esta última população pode compor 5% ou menos do total da população celular. As lesões, geralmente, envolvem os linfonodos e podem aparecer como aumento de apenas um linfonodo periférico. Este subtipo tem sido comparado à lesão pulmonar conhecida como granulomatose linfomatosa em humanos (4).

Tabela 1. Correspondências entre as classificações da Kiel (41), WHO International Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals (4) e WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (12) em relação ao DLBCL.

KIEL	WHO (2002)	WHO (2008)
Centroblásticos monomórficos e polimórficos	Linfoma de Grandes Células B (não clivadas e clivadas)	DLBCL, NOS variante centroblástica
Imunoblásticos B	Imunoblástico de Grandes Células	DLBCL, NOS variante imunoblástica
Anaplásicos de grandes células B	-	DLBCL, NOS variante anaplásica
Linfomas de células B com alta quantidade de células T	Linfoma B ricos em células T	DLBCL, NOS rico em células T/histiócitos
-	-	DLBCL, NOS variantes raras
Linfoma esclerosante de grandes células B do mediastino	Linfoma de Células B Tímico (mediastinal B)	Linfoma de grandes células B mediastinal (tímico)
Linfoma angio endoteliótropico (intravascular)	Linfoma Intravascular de Grandes Células B	Linfoma Intravascular de Grandes Células B
-	-	DLBCL primário do SNC
-	-	DLBCL cutâneo primário, tipo perna
-	-	DLBCL EBV+ dos idosos
-	-	Linfoma de grandes células B ALK+
-	-	DLBCL associado à inflamação crônica
-	-	Linfoma plasmoblástico
-	-	Linfoma de efusão primária
-	-	Granulomatose linfomatosa
-	-	Linfoma de grandes células B, surgindo em doença de Castleman multicêntrica associada à HHV8.
-	-	Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre DLBCL e linfoma de Burkitt.
-	-	Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre DLBCL e linfoma de Hodgkin clássico.

O Linfoma Imunoblástico de Grandes Células exibe agressividade moderada, com arquitetura difusa composta por células grandes com núcleo redondo a oval ou clivado, mitoses frequentes, quantidade variável de citoplasma, que se cora fortemente, membrana nuclear espessa, cromatina reticular e periférica, e normalmente nucléolo único central. Macrófagos de corpos tangíveis são presentes e numerosos (4).

O Linfoma de Grandes Células B (não clivadas e clivadas) possui agressividade moderada, composto por população de células linfóides grandes relativamente uniforme,

núcleo vesiculoso, cromatina reticular e dois a três nucléolos proeminentes periféricos. Macrófagos de corpos tangíveis e figuras de mitose são frequentes (4).

Um tipo raro que acomete o mediastino é o Linfoma de Células B Tímico (mediastinal B), mais frequentemente observado em cães jovens de raças de grande porte. As lesões têm desenvolvimento lento e os animais normalmente apresentam êmese após alimentação aparentemente devido à compressão esofágica. As lesões são tipicamente bem encapsuladas, exibem bandas de colágeno evidentes dando uma aparência macroscópica de timoma. Citologicamente, as células tumorais são grandes, com núcleo vesicular, nucléolo proeminente, podendo ser altamente indentados e ocasionalmente muito grande e multilobulado (4).

O Linfoma Intravascular de Grandes Células B é uma doença sistêmica caracterizada pela proliferação de *clusters* de células linfoides dentro do lúmen de pequenas veias e, em menor grau, artérias do coração, pulmão e sistema nervoso central. É uma doença rara que pode ter um aparecimento repentino de síncope e morte em um animal sem nenhuma manifestação clínica (4).

De acordo com a classificação da WHO de 2008, os subtipos correspondentes ao DLBCL são o DLBCL, sem outras especificações; o linfoma de grandes células B rico em células T/histiócitos; DLBCL primário do SNC; DLBCL cutâneo primário, tipo perna e DLBCL EBV positivo dos idosos (12).

As características citomorfológicas do DLBCL, sem outras especificações são diversas e podem ser divididas em variantes morfológicas comum e rara. As variantes morfológicas comuns compreendem a centroblastica, imunoblastica e anaplásica. As variantes raras podem apresentar estroma mixoide ou matriz fibrilar, alguns casos podem exibir formação de pseudorosetas, formato celular fusiforme ou mostrar características de células em anel de sinete. Grânulos citoplasmáticos, projeções de microvilos e junções intercelulares também podem ser vistos. Ele representa 25 a 30% dos LNH de adultos nos países ocidentais, sendo sua etiologia desconhecida. Normalmente, se apresenta como uma neoplasia dita primária ou como progressão de outro tipo neoplásico menos agressivo como, por exemplo, linfoma folicular e linfoma de zona marginal (12).

Diante de uma suspeita de linfoma, devem ser realizados exame físico completo, hemograma, bioquímico e urinálise, sendo o diagnóstico definitivo por exame citológico ou histopatológico (26). O diagnóstico e classificação do linfoma podem ser realizados de forma simples, eficaz e com baixo custo pelo exame citológico, sendo que a classificação de Kiel exibe melhor adequação por se basear em características morfológicas (43). No entanto, há algumas limitações. Devido à ausência de arquitetura tecidual não é possível observar uma desorganização da arquitetura normal ou invasão da cápsula, podendo dificultar a diferenciação entre um linfoma e uma hiperplasia reacional acentuada, a qual é caracterizada por muitas células linfoides grandes. Ainda, linfoma de células pequenas pode exibir poucos indícios de suas características de malignidade. Além disso, classificação em baixo, moderado e alto grau, que é realizada por meio das características citológicas e imunofenotipagem pode ser feita com maior acurácia no exame histopatológico (26).

O diagnóstico pode, também, ser realizado por técnicas moleculares tanto para o diagnóstico em si quanto para caracterizar melhor o tumor e incluem histo e citoquímica, imunoisto e imunocitoquímica; citometria de fluxo e PCR (21,44).

Ocasionalmente pode ser difícil a diferenciação entre uma proliferação maligna e benigna, situação a qual pode ser resolvida pela avaliação da clonalidade, uma vez que a clonalidade é um marco de malignidade, ou seja, é suposto que o tumor origine-se de um único clone (26).

Atualmente, a imunofenotipagem dos linfomas está incorporada aos sistemas de classificação do linfoma e a técnica de imunoistoquímica é o padrão ouro para essa determinação (44). Dessa maneira, o estabelecimento da origem T ou B das células

neoplásicas associado a sua morfologia permite o reconhecimento dos diferentes tipos de neoplasias linfoides (12).

Para a determinação do imunofenótipo, são utilizados marcadores linfocitários como os anticorpos policlonal anti CD3 e monoclonal anti CD79a, como marcadores pan T e pan B, respectivamente, tanto para humanos (12) quanto para os animais domésticos (1,4,5,38). Entretanto, esta determinação pode ser obtida com maior acurácia ampliando-se o painel de anticorpos. Nos seres humanos, os DLBCLs normalmente expressam vários marcadores pan B, porém a expressão de um ou mais destes marcadores pode estar ausente, impedindo ou dificultando a determinação do imunofenótipo quando se utiliza apenas um marcador (45).

Para os linfomas B, os mais utilizados nos linfomas humanos, além do anti CD79a, são o anti CD20 e o PAX-5 (anti- BSAP) entre outros (45). Deve-se ressaltar que a pouca reação cruzada entre os anticorpos específicos humanos e caninos restringe o painel utilizado nos linfomas dos cães, tanto para o diagnóstico quanto para o estadiamento (46). Nos cães, embora o marcador pan B mais amplamente utilizado seja o anti CD79a (4,10,32), o anti CD20 também tem sido utilizado em menor escala com o mesmo fim (46). Mais recentemente, a expressão da PAX-5 (anti BSAP) foi empregada como marcador imunoistoquímico pan pré B e pan B em amostras de linfomas de cães incluídas em parafina (33).

O CD79 é um heterodímero sinalizador que é expresso apenas pelas células B e em vários tipos de linfoma (47). A molécula é um heterodímero covalente que contém CD79a (Ig α , mb 1) e CD79b (Ig β , B29), ambas subunidades contém um único domínio Ig extracelular, um domínio transmembrana e um domínio de sinalização intracelular. O BCR (receptor de antígeno de células B) é um complexo entre CD79 e o Ig de superfície, todos estes componentes são necessários para a expressão do BCR na superfície celular. A ligação cruzada do BCR aciona o mecanismo de sinalização o que pode levar a apoptose ou na presença de sinal de resgate de células T pode levar a ativação e divisão celular, o que torna o CD79, além de marcador para linfoma B, um alvo de terapia anticâncer com anticorpos (48).

Já o CD20 é uma molécula de superfície celular específica de linfócitos B e sua ligação com anticorpo altera a progressão no ciclo celular e a diferenciação indicando que esta molécula é essencial na função dos linfócitos B. Ela é expressa em células pré B na medula óssea, principalmente após o rearranjo da cadeia pesada de Ig e sua expressão persiste até a diferenciação para plasmócitos. Os complexos multiméricos de CD20 podem formar canais de íons para condução de Ca^{2+} na membrana plasmática de células linfoides B. Pressupõe-se que o CD20 canino contenha domínios de sequências de aminoácidos consistindo de dois domínios extracelulares, quatro domínios transmembrana e três domínios intracelulares, sendo expresso por células mononucleares do sangue periférico, linfonodos e linfomas de células B, mas não em linfomas de células T ou linfomas não T - não B, assim como o CD20 humano (49).

A proteína ativadora específica de células B (BSAP) é um fator de transcrição de 52kD originalmente identificado como homólogo da proteína ativadora tecidual específica do ouriço do mar. A BSAP é codificada pelo gene PAX-5, um membro altamente conservado da família de genes de fatores de transcrição "paired Box" (PAX). Dentre as células hematopoiéticas a expressão do gene PAX5 é restrita a linhagem de células B. A transcrição do gene do PAX5 é iniciada em células pró B e é abundante nos estágios de maturação pré B e células B madura, mas é ausente em plasmócitos diferenciados. O PAX5 é um fator de transcrição essencial ao comprometimento da célula com a linhagem de linfócitos B, induzindo a expressão de vários genes e ao mesmo tempo reprimindo vias alternativas de diferenciação hematopoiética, o que torna possível a sua utilização como um marcador pan B (50)

A importância da detecção destes antígenos não reside somente na determinação do imunofenótipo. O CD20 tem sido utilizado amplamente como alvo de procedimentos terapêuticos nos linfomas B humanos que empregam anticorpos monoclonais como o

Rituximab, que é um anticorpo quimérico monoclonal IgG1 anti CD20 humano produzido por engenharia genética em camundongo. Acredita-se que o Rituximab aja sobre as células do linfoma induzindo a lise celular mediada por complemento, a citotoxicidade celular dependente de anticorpo e a indução direta de apoptose, atuando simultaneamente com a quimioterapia (39,51).

O uso de anticorpos monoclonais anti - CD20 para o tratamento de linfomas B aumentou significativamente a sobrevida dos pacientes, porém há pacientes refratários à terapia ou os que apresentam recorrência da doença (52). Linhagens celulares de linfoma B submetidas a tratamento *in vitro* por anticorpos anti CD20 mostraram que células de maior expressão de CD20 são mais sensíveis ao tratamento (53).

Especial atenção deve ser dada à dose utilizada para o tratamento, uma vez que com o uso de doses altas da droga os mecanismos efetores necessários para a atividade do medicamento podem ser saturados comprometendo a eficácia da terapia. Sob essas condições, uma reação chamada trogocitose predomina. Ela consiste na remoção do complexo CD20 – anticorpo monoclonal das células alvo por células efetoras que expressam receptores Fcγ permitindo que estas células malignas escapem sem danos e promovam a progressão do tumor (51).

Em cães, ainda não está bem estabelecido o uso e eficácia deste tipo de drogas, mas existem estudos promissores que apontam uma maior efetividade do tratamento quando associada quimioterapia tradicional a imunoterapia (2).

Assim sendo, a determinação do perfil imunofenotípico dos linfomas não só torna o diagnóstico mais acurado, mas também abre novas perspectivas para se estabelecer protocolos de tratamento mais específicos.

Nos estudos sobre neoplasias, inclusive linfomas, pode-se observar a necessidade de avaliar além do imunofenótipo, o índice de proliferação celular e a taxa de apoptose das células neoplásicas (54). Quando se trata especificamente dos linfomas, além do imunofenótipo, há a necessidade de se estabelecer os índices proliferativos, já que estes podem aumentar a acurácia da classificação deste tipo de neoplasia. No que diz respeito aos DLBCLs, pode-se reduzir a dificuldade na diferenciação entre estes e determinados subtipos morfológicamente similares, como o linfoma de zona marginal, utilizando-se os índices proliferativos e apoptóticos maiores apresentados pelos DLBCLs (10). Além disso, a correlação positiva entre o índice proliferativo, a morfologia celular, o imunofenótipo e o grau de malignidade já foi constatada (55).

Um estudo recente verificou que há uma variação significativa do tempo de sobrevida de cães com diferentes índices mitóticos. Em cães apresentando tumores com índices mitóticos menores que 20 mitoses por campo de grande aumento (400 X) e maiores que 21 mitoses por campo de grande aumento, foi observada sobrevida média de 188 e 31 dias respectivamente (35).

O marcador mais confiável para este tipo de avaliação da proliferação celular é o antígeno Ki-67 (MIB-1). Este antígeno é uma proteína de 345 kD que é expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto nas células em G0 e que pode ser detectada utilizando-se métodos imunistoquímicos (56).

Como foi mencionado anteriormente, outro índice relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é o índice apoptótico, pois o crescimento tumoral não é determinado somente pela porcentagem de células em proliferação e pelo tempo do ciclo celular (57). Um dos métodos empregados para este tipo de avaliação é a detecção imunistoquímica da expressão da caspase-3 (9). Estas enzimas estão presentes no citoplasma da maioria das células, na forma inativa como uma cadeia única de polipeptídeos e são ativadas quando esta cadeia é quebrada. A expressão de caspase-3 é utilizada em muitos distúrbios hematopoiéticos na espécie humana, inclusive nas leucemias e nos linfomas. Os linfomas de alto grau de malignidade apresentam uma expressão maior de caspase-3 que aqueles de baixo grau (58).

Na espécie humana, os linfomas de alto grau que possuem maior índice de positividade para caspase-3 respondem melhor ao tratamento (11).

Este tipo de avaliação ainda é pouco comum nas neoplasias caninas, porém, nos linfomas caninos empregando-se as classificações de Kiel e Working Formulation, observou-se grande variação no percentual de células positivas, não sendo constatada diferença entre os linfomas de alto e baixo grau e entre os diferentes imunofenótipos (9). Nos seres humanos, esta variação na expressão de caspase-3 nos DLBCLs já foi observada (58). Deve-se ainda ressaltar, no entanto, que entre os DLBCLs humanos, já foi constatado que os tumores de alto grau apresentam índices apoptóticos maiores que os linfomas de baixo grau de malignidade (11,58). A determinação do percentual de células positivas para caspase-3 e a aplicação de classificações mais atuais, como as propostas para os animais domésticos (4) e para os seres humanos (12) nos linfomas caninos, mais especificamente os DLBCLs, podem auxiliar no estabelecimento de um perfil mais detalhado destas neoplasias.

Outro marcador imunistoquímico relacionado com a apoptose é a expressão da proteína p53 mutante nas células neoplásicas. As mutações neste gene são as lesões gênicas mais frequentes nas neoplasias da espécie humana, sendo um importante indicador da resposta terapêutica dos LNHs humanos (59). A expressão do p53 alterado é superior a 30% nos linfomas de alto grau de malignidade de origem B (13). De acordo com Sueiro et al. (14), nos LNHs caninos cerca de 60% dos casos são positivos para a expressão do p53, porém, não foi detectada a correlação deste achado com os imunofenótipos e os graus de malignidade das neoplasias (9, 14). Outros estudos sugerem que essa taxa de positividade pode ser menor, chegando a até 22% dos LNH, sendo que a expressão do p53 teria impacto negativo na sobrevida total do animal, mas não influenciaria no tempo de recorrência da doença (15). Por outro lado, existe relato sobre número maior de células p53+ em linfomas T do que em linfomas B caninos (59). Em estudo recente, não foi constatada diferença dos níveis de expressão e da frequência da mutação do gene p53 entre os grupos de animais portadores de linfomas sensíveis e resistentes à quimioterapia (16).

Assim, na Medicina Veterinária, o papel desempenhado pelo p53 nas diferentes neoplasias é controverso, sendo ainda escassos os estudos que apresentam este tipo de abordagem. Quando se tratam dos linfomas caninos, as diferentes classificações utilizadas e a comparação entre grandes grupos que consideram apenas os imunofenótipos, sem considerar muitas vezes os subtipos de LNHs, podem explicar, pelo menos parcialmente, a discrepância dos resultados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O linfoma não-Hodgkins (LNH) é atualmente uma das neoplasias que mais acomete os cães, levando a significativa diminuição na longevidade e qualidade de vida dos animais afetados. É frequente também no homem e devido às semelhanças no comportamento biológico tumoral, influência ambiental, aberrações genéticas, incidência, tipo mais frequente e também tratamento, a doença no cão é utilizada como modelo de ocorrência espontânea para o estudo da etiologia e protocolos de tratamento dos LNHs humanos. Ela é uma doença heterogênea, uma vez que cada subtipo é uma entidade única, o que pode demandar diferentes abordagens. Assim, são necessários estudos que permitam diagnósticos mais precoces e acurados possibilitando terapias mais eficazes e conseqüentemente melhor prognóstico.

REFERÊNCIAS

1. Ponce F, Marchal T, Magnol JP, Turinelli V, Ledieu D, Bonnefont C, et al. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol.* 2010;47(3):414-33.
2. Comazzi S, Guscetti F, Marconato L. First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013. *Hematol Oncol.* 2013;32(2):68-71.
3. Ito D, Frantza AM, Modiano JF. Canine lymphoma as a comparative model for humannon-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014;159(3-4):192-201.
4. Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF. *Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals.* 2nd ed. Washington: Armed Forced Institute of Pathology; 2002.
5. Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzly F, et al. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization Criteria. *Vet Pathol.* 2011;48(1):198-211.
6. Frantz AM, Sarver AL, Ito D, Phang TL, Karimpour-Fard A, Scott MC, et al. Molecular profiling reveals prognostically significant subtypes of canine lymphoma. *Vet Pathol.* 2012;50(4):693-703.
7. Mudaliar MAV, Haggart RD, Miele G, Sellar G, Tan KA, Goodlad JR, et al. Comparative gene expression profiling identifies common molecular signatures of NF- κ B activation in canine and human diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *PLOS One.* 2013;8(9):1-17.
8. Richards KL, Motsinger-Reif AA, Chen H, Fedoriw Y, Fan C, Nielsen DM, et al. Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and post-germinal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. *Cancer Res.* 2013;73(16):5029-39.
9. Suzano SMC. Avaliação da proliferação celular, índice apoptótico e da expressão do P53 nos linfomas caninos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista ; 2007.
10. Valli VE. *Veterinary comparative hematopathology.* Iowa: Blackwell; 2007.
11. Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-Cell Diffuse Large-Cell Lymphoma. *Cancer Res.* 1999;59(20):5386-91.
12. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.

13. Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP. p53 in hematologic malignancies. *Blood*. 1994;84(8):2412-21.
14. Sueiro FAR, Alessi AC, Vassallo J. Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoeexpression. *J Comp Pathol*. 2004;131(2-3):207-13.
15. Dhaliwal RS, Kitchell BE, Ehrhart EJ, Valli VE, Dervisis NG. Clinicopathologic significance of histologic grade, Pgp, and P53 expression in canine lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2013;49(3):175-85.
16. Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Takahashi M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Quantitative analysis of mRNA for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma. *J Vet Med Sci*. 2010;72(9):1165-72.
17. Dobson JM, Blackwood LB, McInnes EF, Bostock DE, Nicholls P, Hoather TM, et al. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract*. 2001;42(8):377-84.
18. Rutley M, MacDonald V. Managing the canine lymphosarcoma patient in general practice. *Can Vet J*. 2007;48(9):977-9.
19. Vail DM, MacEwen EG, Young KM. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: Withrow SJ, MacEwen EG. *Small animal clinical oncology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Company; 2001. p.558-90.
20. Boerkamp KM, Teske E, Boon LR, Grinwis GCM, van den Bossche L, Rutteman GR. Estimated incidence rate and distribution of tumours in 4,653 cases of archival submissions derived from the Dutch golden retriever population. *BMC Vet Res*. 2014;10(34):1-10.
21. Teske E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non hodgkin's lymphoma. *Vet Q*. 1994;16(4):209-19.
22. 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.
23. Rütgen BC, Willenbrock S, Reimann-Berg N, Walter I, Fuchs-Baumgartinger A, Wagner S, et al. Authentication of primordial characteristics of the CLBL- 1 cell line prove the integrity of a canine B-Cell lymphoma in a murine in vivo model. *PLoS One*. 2012;7(6):e40078. doi:10.1371/journal.pone.0040078.
24. Ferrareso S, Bresolin S, Arico A, Comazzi S, Gelain ME, Riondato F, et al. Epigenetic silencing of TFPI-2 in canine diffuse large BCell lymphoma. *PLOS One*. 2014;9(4):1-10.
25. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med*. 2011;17(7):380-8.
26. Vail DM, Young KM. Hematopoietic tumors. In: Withrow SJ, Vail DM. *Small animal clinical oncology*. 4th ed. Missouri: Saunders; 2007. p.699-784.

27. Moreno K, Bracarense APFRL. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2007;44:46-52.
28. Cápua MLB, Coleta FED, Canesin APMN, Godoy AV, Calazans SG, Miotto MR, et al. Linfoma canino: clínica, hematologia e tratamento com o protocolo de Madison-Wisconsin. *Cienc Rural.* 2011;41(7):1245-51.
29. Neuwald EB, Teixeira LV, Conrado FO, Silva MOD, Hlavac NRC, González FHD. Epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects of canine lymphoma in the region of Porto Alegre, Brazil. *Pesqui Vet Bras.* 2014;34(4):349-54.
30. Sequeira JL, Franco M, Bandarra EP, Figueiredo LMA, Rocha NS. Características anatomo-clínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1999;51(3):245-9.
31. Figuera RA, Souza TM, Rodrigues A, Barros CSL. Aspectos clinicopatológicos de 43 casos de linfoma em cães. *MEDVEP: Rev Cient Med Vet Pequenos Anim Anim Estim.* 2006;4(12):139-46.
32. Vezzali E, Parodi AL, Marcato PS, Bettini, G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol.* 2010;8(1):38-49.
33. Fernandes TR. Classificação morfológica e imunoistoquímica em microarranjo de tecido (TMA) de linfomas não-hodgkin em cães conforme os critérios da Histological Classification of Hematopoietic Tumours of Domestic Animals (WHO) [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2014.
34. Pastor M, Chalvet-Monfray K, Marchal T, Keck G, Magnol JP, Fournel-Fleury C, et al. Genetic and environmental risk indicators in canine non-hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J Vet Intern Med.* 2009;23(2):301-10.
35. Valli VE, Kass PH, San Myint M, Scott F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet Pathol.* 2013;50(5):738-48.
36. Modiano JF, Breen M, Burnett RC, Parker HG, Inusah S, Thomas R, et al. Distinct B-cell and T-cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk. *Cancer Res.* 2005;65(13):5654-61.
37. Dobson JM. Breed-Predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet Sci.* 2013;2013:1-23. doi:10.1155/2013/941275.
38. Bienzle D, Vernau W. The diagnostic assessment of canine lymphoma: implications for treatment. *Clin Lab Med.* 2011;31(1):21-39.
39. Flowers R, Sinha R, Vose JM. Improving outcomes for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(6):393-408.

40. Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World health organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001. p.171-4.
41. Lennert K, Feller AC. Histopathology of non-hodgkin's lymphomas. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1992.
42. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999;17(12):3835-49.
43. Suzano SMC, Sequeira JL, Rocha NS, Pessoa AWP. Classificação citológica dos linfomas caninos. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2010;47(1):47-54.
44. Thalheim L, Williams LE, Borst LB, Fogle JE, Suter SE. Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *J Vet Intern Med.* 2013;27(6):1509-16.
45. O'Mahony OH, Riley A. CD20-negative follicular lymphoma. *Diagn Histopathol.* 2012;18(10):457-60.
46. Marconato L, Gelain ME, Comazzi S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol.* 2013;31(1):1-9.
47. Olejniczak SH, Stewart CC, Donohue K, Czuczman MS. A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. *Immunol Invest.* 2006;35(1):93-114.
48. Polson AG, Yu S, Elkins K, Zheng B, Clark S, Ingle GS, et al. Antibody-drug conjugates targeted to CD79 for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2007;110(2):616-23.
49. Kano R, Inoiue C, Okano H, Yamazaki J, Takahashi T, Watari T, et al. Canine CD20 gene. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;108(3-4):265-8.
50. Torlakovic E, Slipicevic A, Robinson C, Decoteau JF, Alfsen GC, Vyberg M, et al. Pax-5 expression in nonhematopoietic tissues. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(5):798-804.
51. Taylor RP, Lindorfer MA. Analyses of CD20 monoclonal antibody-mediated tumor cell killing mechanisms: rational design of dosing strategies. *Mol Pharmacol.* 2014;86(5):485-91.
52. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood.* 2010;115(22):4393-402.

53. Franke A, Niederfellner GJ, Klein C, Burtscher H. Antibodies against CD20 or B-cell receptor induce similar transcription patterns in human lymphoma cell lines. *PLoS One*. 2011;18(2):e16596. doi: 10.1371/journal.pone.0016596.
54. Kiupel M, Teske E, Bostock D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet Pathol*. 1999;36(4):292-300.
55. Suzano SMC, Sequeira JL, Pessoa AWP, Porto CD, Oliveira DE. Proliferação celular nos linfomas caninos. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2008;45(4):313-9.
56. Zacchetti A, Van Garderen E, Teske E, Nederbragt H, Dierendonck JH, Rutteman GR. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labeling by immunohistochemistry. *APMIS*. 2003;111(3):430-8.
57. Phillips BB, Kass PH, Naydan DK, Winthrop MD, Griffey SM, Madewell BR. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest*. 2000;12(2):111-7.
58. Dukers DF, Oudejans JJ, Vos W, Berge RL, Meijer CJLM. Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. *J Pathol*. 2002;196(3):307-15.
59. Sokolowska J, Cywinska A, Malicka E. p53 expression in canine lymphoma. *J Vet Med*. 2005;52(4):172-5.

Recebido em: 12/01/2015

Aceito em: 28/09/2016

GLAUCOMA, APOPTOSE E SILDENAFIL: COMPREENSÃO DE UMA DOENÇA SEM SOLUÇÃO E UMA POSSÍVEL ABORDAGEM DE TRATAMENTO

Diogo Sousa Zanoni^{1*}
Germana Alegro Da Silva²
José Luis Laus²
Renée Laufer Amorim³

RESUMO

Milhões de pacientes com glaucoma irão perder a visão, tornando-se uma necessidade desenvolver terapias neuroprotetoras que possam ser usadas, em conjunção com medicamentos hipotensores, para impedir a morte de células ganglionares da retina (CGR). Recentes avanços na compreensão da fisiopatologia do glaucoma são um fator chave na patogênese da neuropatia glaucomatosa. Com base nos achados em doenças semelhantes, a hipótese de que melhorando o fluxo sanguíneo do nervo óptico da retina possa resultar em uma proteção significativa nas CGR e prevenir a perda da visão no glaucoma. O sildenafil, uma droga vasodilatadora que inibe PDE5, aumentando assim os níveis de cGMP e prolongando seus efeitos, sendo que foi demonstrado melhorar a sobrevivência de várias lesões degenerativas. Esta breve revisão resume alguns dos avanços mais importantes que tiveram no entendimento sobre esta doença e um possível tratamento.

Palavras-chave: Apoptose, glaucoma, células ganglionares da retina.

GLAUCOMA, APOPTOSIS AND SILDENAFIL: COMPREHENSION OF A DISEASE WITHOUT SOLUTION AND A POSSIBLE APPROACH OF TREATMENT.

ABSTRACT

As millions of glaucoma patients lose sight, it has become accepted that there is a need to develop neuroprotective therapies that can be used, in conjunction with hypotensive drugs, to prevent retinal ganglion cell (RGC) death. Recent advances in the understanding of the pathophysiology of glaucoma is a key factor in the pathogenesis of glaucomatous neuropathy. Based on findings in similar diseases, hypothesize that improving retinal and optic nerve blood flow can result in significant RGC protection and prevent vision loss in glaucoma. Sildenafil, a vasodilative drug that inhibits PDE5, thereby increasing cGMP levels and prolonging NO effects, has been shown to improve survival in several injury. This short review briefly summarizes some of the most important advances that have taken in the understand about this disease and a possible treatment.

Keywords: Apoptosis, glaucoma retinal ganglion cell.

¹ Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil. Contato principal para correspondência.

* Apoio e financiamento: Agências: FAPESP.

² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista, em Jaboticabal, SP, Brasil.

³ Professora do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

GLAUCOMA, APOPTOSIS Y SILDENAFIL: COMPRESIÓN DE UNA ENFERMEDAD SIN SOLUCIÓN Y UN POSIBLE ENFOQUE DE TRATAMIENTO.

RESUMEN

Millones de pacientes con glaucoma pierden la visión, por lo que es una necesidad para desarrollar terapias neuroprotectoras que pueden utilizarse en conjunción con medicamentos hipotensores, para prevenir la muerte de las células ganglionares de la retina (CGR). Los recientes avances en la comprensión de la fisiopatología de glaucoma es un factor clave en la patogénesis de la neuropatía glaucomatosa. Con base en los hallazgos en enfermedades similares, la hipótesis de que la mejora del flujo sanguíneo de la retina nervio óptico puede dar lugar a una protección significativa en CGR y prevenir la pérdida de visión en el glaucoma. Sildenafil, un fármaco vasodilatador que inhibe la PDE5, lo que aumenta los niveles de cGMP y la prolongación de sus efectos, y se ha demostrado que mejora la supervivencia de diversas lesiones degenerativas. Esta breve revisión resume los avances más importantes que tenían el conocimiento de esta enfermedad y su posible tratamiento.

Palabras clave: Apoptosis; Glaucoma; Células ganglionares de la retina.

INTRODUCTION

Glaucoma is a leading cause of loss of vision and blindness in the world (1,2). It leads to visual impairment in 1-4% of the population over 40 years of age (3), though in some ethnic groups it may affect 20% or more of the population (4), with an estimated 80 million people worldwide by 2020 and, 8.4 million of them will be blind in both eyes (1). Despite these, glaucoma remains an “unsolved” disease, as evidenced by the growing number of patients, stressing the urgent need to develop new strategies to treat this blinding disease (1,4-6).

A pathophysiological hallmark of glaucoma is the gradual loss of retinal ganglion cells (RGC) and their axons, the optic nerve (ON) fibers, like other neurons conditions such as Alzheimer’s or Parkinson’s disease (7-9). Generally is accepted that glaucomatous degeneration of the optic nerve and retina is linked to the development of elevated intraocular pressure (IOP) (10). Because this, for many years it has been accepted that increase in IOP is the cause of the disease (11).

There are evidences that in humans, in animals and, in models of experimental glaucoma, high IOP causes ganglion cell loss, and that lowering IOP in affected eyes can attenuate the degenerative process (10). However, today it is recognized that IOP elevation is the main risk factor in glaucoma, but evidence suggests that local ischemia, leading to reduced ON perfusion, is a key event in the pathogenesis of glaucomatous neuropathy (12,13). Reduced levels of nitric oxide (NO), a potent vasodilative mediator, have been demonstrated in glaucoma patients and animal models of the disease (as well as in other neurodegenerative diseases) and are implicated in the impairment of ocular blood flow, leading to neuronal death and loss of vision (14,15).

Several risk factors have been proposed to contribute to glaucoma progression including elevated intraocular pressure, age, genetic background, thinner corneal thickness and vascular degeneration (10). The existence of any of these factors might determine an individual risk to develop glaucoma, but they are not necessarily the cause of this condition (16). Research into the pathogenesis of glaucoma has been aided by the development of animal models that undergo apoptotic RGC death (15).

Sildenafil, an approved drug for the treatment of erectile dysfunction, is an inhibitor of phosphodiesterase (PDE), an enzyme that degrades cGMP, the secondary messenger of NO.

Therefore, treatment with sildenafil has been shown to be neuroprotective in numerous models of neurodegenerative diseases, as elevated cGMP levels prolong the effect of NO and lead to vasodilation and improved circulation (17,18). Sildenafil treatment has resulted in increased neuronal survival, and even neurogenesis, in models of brain, spinal cord and cerebral injury (19,20).

This review aims to better understand the mechanism of cell death by apoptosis of the disease and its treatment adding.

SCIENTIFIC BACKGROUND

Glaucoma

Historically, glaucoma has been described as a disease caused by increased ocular pressure (IOP). Recently glaucoma has been considered a primary optic neuropathy, but this fact is not widely shared by the public and health-care professionals alike. An informal survey of mainstream dictionary definitions of glaucoma still reveals obsolete phrases such as 'increased intraocular pressure that results in a group of eye diseases characterized by pressure that is too high for the optic nerve to withstand' (21,22).

However, there is abundant evidence demonstrating that ocular hypertension alone is insufficient, but a necessary factor for the development or progression of glaucoma. The Cochrane Eyes and Vision Group define glaucoma as 'a disease characterized by defects in the visual field, damage to the nerve at the back of the eye, and usually raised pressure inside the eye.' This view of glaucoma as an optic neuropathy with elevated IOP as a modifiable risk factor rather than a causative agent for damage, although it still does not take into account the characteristic morphological and functional aspects of the disease (22).

Primary humans, glaucoma is classified into three principal types: primary open angle glaucoma (POAG), primary angle-closure glaucoma and congenital glaucoma. The POAG is the most common type in humans (23). However, for example, although high intraocular pressure is common among open-angle glaucoma patients, only a limited subset of individuals with ocular hypertension will develop this disease (23,24). Moreover, a significant number of patients presenting with glaucoma continue to lose vision despite responding well to therapies that lower eye pressure (16,24).

In dogs, the main protagonists of glaucoma in animals, can be classified based on the primary cause, in primary, secondary or congenital. Based on the appearance of gonioscopy drainage angle, open, closed or narrow and, according to the duration or with stage of evolution, chronic or acute. Chronic glaucoma is revealed with the progressive elevation of IOP. In contrast, the acute characterized by a sudden increase in IOP (25).

Glaucoma has been investigated for some 50 years in dogs. The highest incidence has been reported to Beagle, Welsh Springer Spaniel, and many other breeds. Uveitis and neoplasms are the most common eye diseases related to glaucoma. POAG studies in dogs showed that breeds Shiba-Inu and Shih-Tzu are the most affected, however, it is reported that the type of primary angle closure there is the most common in this breeds (25,26).

In humans, loss of vision in glaucoma patients is due to progressive death of RGCs and their axons, which constitute the ON fibers (7,8). Traditionally this neuronal and axonal death has been attributed to increase in intraocular pressure (IOP), but now recognized a significant portion of glaucoma cases present with normal or low IOP (27), and it is the main accepted that IOP elevation is one of several risk factors for the disease (13,27). Evidence suggests that another, as local ischemia, leading to reduced ON perfusion cause glaucomatous neuropathy is reduced blood flow in the inner retina and ON (28).

Current evidence shows that patients suffer from low ocular perfusion pressure, as well as abnormal vascular auto regulation capacity, impairing the ability to adapt to increased IOP

or decreased blood pressure (12,28). The result is RGC death and ON atrophy, as well as reperfusion injury and ON remodeling. Research into the pathogenesis of glaucoma has been aided by the development of animal models that undergo apoptotic RGC death (15,29,30).

The implication of these data is that current medical and surgical therapy, aimed at lowering IOP, has limited success in preserving vision in glaucoma patients. Therefore, it is evident that there is a pressing need to develop new therapeutic approaches that can be used, in conjunction with hypotensive drugs, to preserve vision (21).

Apoptosis

Apoptosis is a modality of programmed cell death that can be identified by different morphological characteristics and the involvement of specific proteins that regulate it (29,30). Cell death also is part of normal development and maturation cycle, and is also component of many response patterns of living tissues to xenobiotic agents (i.e. micro organisms and chemicals) and to endogenous modulations, such as inflammation and disturbed blood supply (31).

Cell death is a fundamental cellular response that has a crucial role in shaping our bodies during development and in regulating tissue homeostasis by eliminating unwanted cells. The first form of regulated or programmed cell death to be characterized was apoptosis (32). The term 'apoptosis', defined as a controlled type of cell death that can be induced by a variety of physiologic and pharmacological agents, was first described by Kerr, Wyllie, and Currie in 1972 to describe a morphologically distinct form of cell death on the basis of the following main morphologic criteria: cellular shrinkage, condensation and margination of the nuclear chromatin, DNA fragmentation, cytoplasmic vacuolization, membrane blebbing, cell lysis, and the formation of apoptotic bodies (33).

However, the apoptosis pathway was described in *Caenorhabditis elegans* in the early 1990s. Subsequent genetic analysis of mammalian apoptosis presented a more complex, in which individual apoptosis genes from *C. elegans* have expanded into large multi-protein families. These findings suggest a redundancy, functional specialization and compensatory regulation of mammalian apoptotic signalling and execution might be important features of mammalian apoptosis (32).

In some cases there is the type of stimuli and/or the degree of stimuli that determines if cells die by apoptosis or necrosis. At low doses, a variety of injurious stimuli such as heat, radiation, hypoxia and cytotoxic anticancer drugs can induce apoptosis but these same stimuli can result in necrosis at higher doses. Finally, apoptosis is a coordinated and often energy-dependent process that involves the activation of a group of cysteine proteases called "caspases" and a complex cascade of events that link the initiating stimuli to the final demise of the cell (34).

Using conventional histology, it is not always easy to distinguish apoptosis from necrosis, and they can occur simultaneously depending on factors such as the intensity and duration of the stimulus, the extent of ATP depletion and the availability of caspases. Necrosis is an uncontrolled and passive process that usually affects large fields of cells whereas apoptosis is controlled and energy-dependent and can affect individual or clusters of cells (34,35).

Necrosis processes characteristic features, such as organelle swelling, mitochondrial dysfunction, massive oxidative stress and rapid plasma-membrane permeabilization that are thought to be indicative of the catastrophic nature of cell death, rather than a result of cellular regulation. The general view of the relationship between apoptosis and necrosis is that milder insults to the cell cause apoptosis, whereas more intense insults induce uncontrollable necrosis. It is thought that apparently unregulated, the process accounts for the bulk of cell death events in acute pathologies (32,34).

The primary mechanism of RGC damage in glaucoma is not well understood, but there is evidence that neuronal loss in this disease occurs largely by apoptosis. This selfdestructive, genetically driven, death program is activated in all neurons. It is now widely accepted that neurotrophic factors promote neuronal survival by inhibiting default apoptotic pathways. During development of the nervous system, young neurons require trophic factors for their survival, differentiation and the establishment of synaptic connections (16,32).

Neurotrophic factors are produced in limited amounts; therefore only neurons exposed to optimal levels of these molecules survive, whereas less fortunate neurons are eliminated by apoptosis. In rodents, 65% of RGCs die during retinal development. Excess RGCs are eliminated in two successive phases of cell death in the retina: the first phase peaks at embryonic day 6, when RGCs differentiate; and the second phase coincides with the arrival of RGC axons to the brain, when these neurons become dependent on target-derived trophic support (16,36).

The induction of apoptosis can occur by external or internal stimulus. Two major general pathways of induction of apoptosis: receptor or extrinsic pathway and the mitochondrial or intrinsic pathway (29). The extrinsic pathway promotes the activation of caspase 8, which activates caspase 3 or cleaves at pro-apoptotic gene bcl-2 family, by linking to the Fas receptor and TNFR (37). The intrinsic pathway is mediated by internal stimuli of intracellular stress, as well as DNA lesion or disruption of the cell cycle or in metabolic pathways (30).

Once activated, the majority of the caspases have the ability to catalyze the activation of multiple other members of this family, resulting in amplification of the proteolytic cascade (37). The caspases is classified in two groups: the initiator caspases (caspase-2, 8, 9 and 10) and executors caspases (caspase-3, 6 and 7). The functional forms of the initiator caspases promote directly or indirectly the activation of executors caspases (29,30,37).

Both extrinsic and intrinsic pathways and at the point of the execution phase, considered the final pathway of apoptosis. It is the activation of the execution caspases that begins this phase of apoptosis. Execution caspases activate cytoplasmic endonuclease, which degrades nuclear material, and proteases that degrade the nuclear and cytoskeletal proteins (34).

In the extrinsic pathway, an active death receptor recruits the intracellular adaptor protein Fas-associated death domain which in turn recruits procaspase-8 to form a signaling complex. Caspase-8 is cleaved and activated through autoproteolysis leading to subsequent activation of caspase-3 and caspase-6. The expression of both initiator and effector caspases has been investigated in RGCs following acute or chronic optic nerve injury. Active, cleaved caspases- 3, -8 and -9 have been detected after optic nerve transection or crush, ocular hypertension as well as ischemic injury (16,30,38). Although caspase-3 was implicated in the primary and secondary waves of RGC apoptosis, it was active for a long period of time and with greater intensity during the primary wave of RGC loss (39).

Extrinsic apoptotic signals include an array of death-receptor ligands: Tnf- α , Fas-l, and TNF-related apoptosis-inducing ligands (TRAIL) that bind to their respective receptors to induce cell death. Death receptor activation results in the recruitment of the intracellular adaptor Fas-associated death domain (FADD), which typically recruits the initiator procaspase-8 leading to caspase-8 activation followed by executioner caspase-3 activation and cell death (16).

In the intrinsic pathway, cytochrome C is released from the mitochondria and together with Apaf-1 and procaspase-9 forms the apoptosome, which facilitates caspase-9 activation and downstream cleavage of caspase-3. Cytochrome C, which is released from damaged mitochondria, promotes the formation of a heptameric 'apoptosome' megacomplex of APAF1 and caspase-9 (a member of the CED 3-like Cys protease family). This leads to the conformational change and activation of caspase-9. Activated caspase-9 in turn cleaves and

activates downstream caspases, including caspase-3, caspase-6 and caspase-7 that carry out the execution phase of apoptosis (16,32).

The BAX protein is normally present in the cytoplasm of a cell, but upon activation of the cell death signal, it will translocate and insert into the mitochondrial outer membrane. Several studies suggest that BAX monomers can form a multisubunit pore structure large enough to allow the escape of molecules like cytochrome C. Knock-out mice lacking a functional Bax gene exhibit several supernumerary populations of neurons, including retinal ganglion cells, indicating the importance of Bax in regulating neuronal programmed cell death during development (40,41).

The central hypothesis of excitotoxic injury is that excess glutamate binds to cell surface ionotropic glutamate receptors, primarily N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors (NMDAR), triggering massive Ca influx and activation of pro-apoptotic signaling cascades in neurons. Elevation of endogenous glutamate and activation of glutamate receptors have been shown to contribute to a variety of acute and chronic neurological disorders, including stroke, trauma, seizures, and various forms of dementia and neurodegeneration (42,43)

In the retina, excess glutamate has been proposed to underlie common neurodegenerative disorders such as retinal artery occlusion and glaucoma. A vast number of studies have now demonstrated that adult RGCs are exquisitely sensitive to exogenously applied NMDA, which triggers rapid death of these neurons, and that inhibitors of NMDAR and/or downstream pathways are neuroprotective in experimental models of retinal ischemia and glaucoma (16,43,44).

Neuroprotection and sildenafil

Though therapy for glaucoma is focused on reducing IOP, much has been dedicated to the development of drugs that provide neural protection. Substances have been suggested as candidates for neuroprotective therapy based on inhibition mechanisms of degeneration and apoptosis of RGCs, in order to promote their survival (45). Nitric oxide (NO) is a gaseous molecule labile released from endothelial cells. It induces vasodilation, increased blood flow and decreased vascular resistance. Its inhibition leads to reduced perfusion. It is not therefore surprising that vascular endothelial dysfunction, resulting in decreased levels of NO, is found in glaucoma patients developing increased retinal vascular resistance. Deficient production of NO is therefore a participant in the pathogenesis of glaucoma, while the increased synthesis and release may prevent the progression of harmful manifestations (14,17,18,46).

Vasoactive agents were tested, including tadalafil and sildenafil employed in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil is a new vasoactive drug that has been developed for the treatment of erectile dysfunction. It increases intracellular cGMP through inhibition of PDE enzyme as well as by enhancement of NO/cGMP mediated signaling. There is experimental evidence that increasing intracellular cGMP can prevent oxidative stress induction and lipid peroxidation (47,48).

Therefore, treatment with sildenafil has been shown to be neuroprotective in numerous models of neurodegenerative diseases, as elevated cGMP levels prolong the effect of NO and lead to vasodilation and improved circulation (17,18). Sildenafil treatment has resulted in increased neuronal survival, and even neurogenesis, in models of brain, spinal cord and cerebral injury (19,20).

It enhances the vasodilator effect of nitric oxide (NO) on the sinusoidal and vessel smooth muscles of the corpus cavernous and increases the arterial blood flow into the sinusoids. Therefore, treatment with sildenafil has been shown to be neuroprotective in numerous models of neurodegenerative diseases, as elevated cGMP levels prolong the effect of NO and lead to vasodilation and improved circulation (17,18). Sildenafil treatment has

resulted in increased neuronal survival, and even neurogenesis, in models of brain, spinal cord and cerebral injury (19,20).

The sildenafil has powerful cardioprotective effects and could reduce apoptosis and necrosis in cardiac tissues after ischemia–reperfusion injury (49). Ebrahimi et al. (50) observed that sildenafil reduced diabetes-induced cardiac cell apoptosis at the end of the first and second weeks, when it reached its peak value. Previous studies have also shown the cardioprotective effects of sildenafil in different experimental models. Fisher et al. (51) demonstrated that sildenafil attenuated cardiomyocyte apoptosis in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. Salloum et al. (49) also showed that acute and prolonged treatment with sildenafil during myocardial infarction (MI) was associated with myocardial salvage from necrosis, reduction of apoptosis, prevention of adverse cardiac remodeling and heart failure, and improved survival. In the eye the sildenafil can affect ocular blood flow and choroidal volume due to its effects on vascular smooth muscles. It may also have vasodilator effects on choroidal sinusoids and retinal vessels similar to the vasodilation of corpora cavernosa sinusoids (52).

This drug is frequently used in older patients with erectile dysfunction and vascular diseases. This population is also at risk of many ophthalmological diseases, such as senile macular degeneration, glaucoma, diabetic retinopathy or ischaemic ocular problems (53). In contrast, studies showed that NO causes increased DNA damage, apoptosis, neurotoxicity and inflammation. When the concentration of NO is more than 1 mM, the predominant effects mediated by him include deamidation, oxidation or nitration of DNA via interaction of NO with superoxide or oxygen radicals. When the concentration is less than 1 μM, their actions are direct, without interacting with superoxide radicals or oxygen, may regulate physiological activities by different signaling pathways (54).

In the eye the sildenafil can affect ocular blood flow and choroidal volume due to its effects on vascular smooth muscles. It may also have vasodilator effects on choroidal sinusoids and retinal vessels similar to the vasodilation of corpora cavernosa sinusoids (53). This drug is frequently used in older patients with erectile dysfunction and vascular diseases. This population is also at risk of many ophthalmological diseases, such as senile macular degeneration, glaucoma, diabetic retinopathy or ischaemic ocular problems (52).

FINAL CONSIDERATIONS

Glaucoma is a common eye disease that is usually associated with an elevated IOP. As our understanding of the process of ganglion cell death in glaucoma becomes more comprehensive to develop new therapeutic strategies that target this process. The focus of these new strategies include prevent damage to the axons in the optic nerve, prevention of ganglion cell soma death, and the reactivation of surviving ganglion cell somas to initiate the regrowth or repair of damaged axons. As scientific investigation, a more precise definition of these targets and development of the therapies needed to treat them will be included in the advancements of glaucoma research.

REFERENCES

1. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:262-7.
2. Sakata K, Sakata LM, Sakata VM, Santini C, Hopker LM, Bernardes R, et al. Prevalence of glaucoma in a South Brazilian population: Projeto Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:4974-9.

3. Leske MC. Open-angle glaucoma: an epidemiologic overview. *Ophthalmic Epidemiol.* 2007;14:166-72.
4. Duggal P, Klein AP, Lee KE, Iyengar SK, Klein R, Bailey-Wilson JE, et al. A genetic contribution to intraocular pressure: the beaver dam eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:555-60.
5. Schmier JK, Halpern MT, Jones ML. The economic implications of glaucoma: a literature review. *Pharmacoeconomics.* 2007;25:287-308.
6. Baltmr A, Duggan J, Nizari S, Salt TE, Cordeiro MF. Neuroprotection in glaucoma - Is there a future role?. *Exp Eye Res.* 2010;91:554-66.
7. Hayreh SS, Peer J, Zimmerman MB. Morphologic changes in chronic high-pressure experimental glaucoma in rhesus monkeys. *J Glaucoma.* 1999;8:56-71.
8. Nickells RW. From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma. *Can J Ophthalmol.* 2007;42:278-87.
9. Lin IC, Wang YH, Wang TJ, Wang IJ, Shen YD, Chin NF, et al. Glaucoma, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease: an 8-year population-based follow-up study. *Plos One.* 2014;9:1-6.
10. Nickells RW. Ganglion cell death in glaucoma: from mice to men. *Vet Ophthalmol.* 2007;10:88-94.
11. Sommer A. Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 1989;107:186-8.
12. Flammer J, Mozaffarieh M. What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy? *Surv Ophthalmol.* 2007;52:S162-73.
13. Quigley HA. Glaucoma. *Lancet.* 2011;377:1367-77.
14. Doganay S, Evreklioglu C, Turkoz Y, Er H. Decreased nitric oxide production in primary open-angle glaucoma. *Eur J Ophthalmol.* 2002;12:44-8.
15. Reichstein D, Ren L, Filippopoulos T, Mittag T, Danias J. Apoptotic retinal ganglion cell death in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Expe Eye Res.* 2007;84:13-21.
16. Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31:152-81.
17. Johnston KC. Effect of sildenafil (Viagra) on cerebral blood vessels. *Neurology.* 2005;65:785-94.
18. Orejana L, Barros-Miñones L, Jordán J, Puerta E, Aguirre N. Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. *Neurobiol Aging.* 2012;33:625.e11-20.
19. Serarslan Y, Yönden Z, Ozgiray E, Oktar S, Güven EO, Söğüt S, et al. Protective effects of tadalafil on experimental spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci.* 2010;17:349-52.

20. Ozdegirmenci O, Kucukozkan T, Akdag E, Topal T, Haberal A, Kayir H, et al. Effects of sildenafil and tadalafil on ischemia/reperfusion injury in fetal rat brain. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24:317-23.
21. Weinreb RN. Glaucoma neuroprotection: What is it? Why is it needed? *Can J Ophthalmol.* 2007;42:396-8.
22. Vrabcic JP, Levin LA. The neurobiology of cell death in glaucoma. *Eye.* 2007;21:S11-4.
23. Ofri R, Dawson WW, Foli K, Gelatt KN. Primary open-angle glaucoma alters retinal recovery from a thiobarbiturate: spatial frequency dependence. *Exp Eye Res.* 1993;56:481-8.
24. Friedman DS, Wilson MR, Liebmann JM, Fechtner RD, Weinreb RN. An evidence-based assessment of risk factors for the progression of ocular hypertension and glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2004;138:S19-31.
25. Plummer CE, Regnier A, Gelatt N. The canine glaucomas. *Vet Ophthalmol.* 2013;2:1053-4.
26. Scott EM, Boursiquot N, Beltran WA, Dubielzig RR. Early histopathologic changes in the retina and optic nerve in canine primary angle-closure glaucoma. *Vet Ophthalmol.* 2013;16:76-86.
27. Crish SD, Calkins DJ. Neurodegeneration in glaucoma: progression and calcium-dependent intracellular mechanisms. *Neuroscience.* 2011;176:1-11.
28. Flammer J, Orgül S, Costa VP, Orzalesi N, Krieglstein GK, Serra LM, et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21:359-93.
29. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol.* 2007;53:335-54.
30. Luchs A, Pantaleão C. Apoptose e modelos in vivo para estudo das moléculas relacionadas a este fenômeno. *Einstein.* 2010;8:495-507.
31. Clavien PA, Rudiger HA, Selzner M. Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol.* 2000;17:869-79.
32. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature.* 2008;9:378-90.
33. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-57.
34. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-516.
35. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol.* 2003;40:481-95.

36. Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery JG, et al. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med.* 1998;4:967-71.
37. Parolin MB, Reason IJ. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases. *Arg Gastroenterol.* 2001;38:138-44.
38. Hanninen VA, Pantcheva MB, Freeman EE, Poulin NR, Grosskreutz CL. Activation of caspase 9 in a rat model of experimental glaucoma. *Curr Eye Res.* 2002;25:389-95.
39. Levkovitch-Verbin H, Dardik R, Vander S, Melamed S. Mechanism of retinal ganglion cells death in secondary degeneration of the optic nerve. *Exp Eye Res.* 2010;91:127-34.
40. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292:727-30.
41. Kirkland RA, Windelborn JA, Kasprzak JM, Franklin JL. A Bax-induced pro-oxidant state is critical for cytochrome c release during programmed neuronal death. *J Neurosci.* 2003;22:6480-90.
42. Kalia LV, Kalia SK, Salter MW. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol.* 2008;7:742-55.
43. Ning B, Aida T, Yanagisawa M, Katou S, Sakimura K, Mishina M, et al. NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina. *Mol Brain.* 2013;6:1-9.
44. Seki M, Soussou W, Manabe S, Lipton SA, et al. Protection of retinal ganglion cells by caspase substrate-binding peptide IQACRG from N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:1198-207.
45. Sandalon S, Könnecke B, Levkovitch-Verbin H, Ofri R. Functional and structural evaluation of lamotrigine treatment in rat models of acute and chronic ocular hypertension. *Exp Eye Res.* 2013;115:47-56.
46. Toda N, Nakanishi-Toda M. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26:205-38.
47. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emami B, Fooladian F, Zafari K. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2003;135C:331-6.
48. Milani E, Nikfar S, Khorasani R, Zamani MJ, Abdollahi M. Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2005;140:251-5.
49. Salloum FN, Abbate A, Das A, Houser JE, Mudrick CA, Qureshi IZ, et al. Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H1398-406.

50. Ebrahimi F, Shafaroodi H, Asadi S, Nezami BG, Ghasemi M, Rahimpour S, et al. Sildenafil decreased cardiac cell apoptosis in diabetic mice: reduction of oxidative stress as a possible mechanism. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87:556-64.
51. Fisher PW, Salloum F, Das A, Hyder H, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation*. 2005;111:1601-10.
52. Marmor MF. Sildenafil (Viagra) and ophthalmology. *Arch Ophthalmol*. 1999;117:518-9.
53. Koksall M, Ozdemir H, Kargi S, Yesilli C, Tomaç S, Mahmutyazicioglu K, et al. The effects of sildenafil on ocular blood flow. *Acta Ophthalmol*. 2005;83:355-9.
54. Lee NPY, Cheng CY. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. *Biol Reprod*. 2004;70:267-76.

Recebido em: 30/06/2015

Aceito em: 06/10/2016

FOTOSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA EM CABRITO – RELATO DE CASO

Juliana Paniago Lordello Neves¹
Ana Eliza dos Santos Silveira¹
Noeme Sousa Rocha²
Letícia Ferrari Crocomo²
Carlos Eduardo Fonseca Alves³
Marcos Barbosa Ferreira⁴
Frederico Guilherme Oliveira da Silva⁴
Wolff Camargo Marques Filho⁴

RESUMO

A sensibilidade da pele à luz solar acarretando em dermatite é conhecida por fotossensibilização. Objetivou-se relatar um caso de intoxicação por *Brachiaria decumbens* em um cabrito, atendido no Hospital Veterinário da Universidade Anhanguera-Uniderp. Foi atendido um caprino, proveniente do município de Bandeirantes, Mato Grosso do Sul, mantido em pastagens de *Brachiaria decumbens*. O animal tinha histórico de isolamento do rebanho há 15 dias, apresentando dor abdominal com sifose. Ao exame físico observou-se icterícia severa, prostração e aumento de volume das articulações dos membros anteriores. Ao exame de ultrassonografia foi percebido aumento da vesícula biliar sendo que seu conteúdo se apresentava sedimentado. No quinto dia, pós-internação, houve piora no quadro clínico levando o animal a óbito. À necropsia pôde-se observar icterícia, fígado com consistência friável e aspecto de noz moscada, a vesícula biliar estava aumentada de volume com conteúdo muito viscoso. À histologia se observaram acentuada retenção biliar e múltiplas células gigantes multinucleadas com citoplasma espumoso e grânulos de pigmento amarelado. Os ductos biliares estavam proliferados e, em alguns, observa-se na luz, cristais refringentes. Nos macrófagos foram observadas imagens negativas de cristais. Esses achados são compatíveis com morte causada por intoxicação por *Brachiaria* spp. Conclui-se que, em função do quadro clínico, necropsia e histopatológico, trata-se de um caso de intoxicação por *Brachiaria decumbens*.

Palavras-chave: Braquiária, caprinos, fotossensibilização.

PHOTOSENSITIZATION IN A KID GOAT – CASE REPORT**ABSTRACT**

This paper is a case report of poisoning by *Brachiaria decumbens* in a goat treated in the Veterinary Hospital of the University Anhanguera-Uniderp. The animal coming from Bandeirantes city, Mato Grosso do Sul State, where was maintained in *Brachiaria decumbens* pastures. It had a history of herd isolation for 15 days, presenting abdominal pain with sifose. Physical examination revealed severe jaundice, prostration and swelling of the joints of the forelimbs. On examination of ultrasonography was perceived increase in gallbladder and its contents are presented sedimentation. On the fifth day after admission, there was deterioration in the clinical picture leading the animal to death. At necropsy could observe jaundice, friable liver with nutmeg aspect, the gallbladder had increased volume with very viscous content.

¹ Médica Veterinária Residente, Universidade Anhanguera-Uniderp. Contato principal para correspondência.

² Professora da FMVZ, Unesp-Botucatu.

³ Pós-doutorando Unesp-Botucatu.

⁴ Professor da Universidade Anhanguera-Uniderp.

Histologically were observed marked biliary retention and multiple giant cells with foamy cytoplasm and yellowish pigment granules. The bile ducts were proliferated, and some have light refringent crystal. Macrophages containing negative images of crystals were observed. These findings are consistent with death from poisoning by *Brachiaria* spp. We conclude that, depending on the clinical picture, necropsy and histopathology, it is a case of poisoning by *Brachiaria decumbens*.

Keywords: Braquiaria, goats, photosensitization.

FOTOSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA EM CABRITO – REPORTE DE UN CASO

RESUMEN

La sensibilidad de la piel a la luz solar que resulta en dermatitis es conocida como fotosensibilidad. Este estudio tuvo como objetivo informar de un caso de envenenamiento por *Brachiaria decumbens* en uno cabrito el Hospital Veterinario de la Universidad Anhanguera-Uniderp. Asistieron Una cabra, de la ciudad de Bandeirantes, Mato Grosso do Sul, mantenida en pastos de *Brachiaria decumbens*. El animal tenía una historia de aislamiento manada durante 15 días, se presenta con dolor abdominal. El examen físico reveló severa ictericia, postración y hinchazo de las articulaciones de las extremidades anteriores. En el examen de ultrasonido fue percibido aumentó la vesícula biliar y que se presentó su contenido asentado. En el quinto día de post-hospitalización, el empeoramiento del cuadro clínico que llevo el animal a óbito. En la necropsia se observó ictericia, hígado con una consistencia crujiente y aspecto nuez moscada, la vesícula biliar se incrementó en volumen con contenido muy viscoso. En la histología se observó retención de bilis aguda y múltiples células gigantes con citoplasma espumoso y gránulos de pigmento de color amarillento. Los conductos biliares se proliferaron, y en algunos se observo en la luz cristales refringentes. En los macrófagos se observaron imágenes negativas de cristales. Estos resultados son consistentes con la muerte por envenenamiento por *Brachiaria* spp. En conclusión, dependiendo del cuadro clínico, la necropsia y la histopatología, se trata de un caso de envenenamiento por *Brachiaria decumbens*.

Palabras clave: Braquiaria, cabras, fotosensibilización.

INTRODUÇÃO

A sensibilidade da pele à luz solar acarretando em dermatite é conhecida por fotossensibilização, que pode ser causada por alterações genéticas no caso das porfirinemias (1) ou, também, pela ingestão de agentes fotossensibilizantes diretos (fotossensibilização primária) como observado na intoxicação por *Froelichia humboldtiana* (2), e ou indiretos (fotossensibilização secundária ou hepatógena), comumente observada em bovinos e ovinos e raramente em caprinos (3,4) criados em pastagens de *Brachiaria* spp. as quais possuem a saponina litogênica protodioscina que provoca lesões no parênquima hepático e ductos biliares, impedindo a eliminação da porfina filioeritrina, um metabólito normal da biotransformação da clorofila que, ao não ser excretada, deposita-se nas camadas superficiais da pele e, quando exposta aos raios UV, liberam energia calorífica intensa, necrosando o tecido (5).

A doença também pode ser causada pelo fungo *Pithomyces chartarum*, produtor da toxina esporodesmina (6), entretanto, as características histológicas da lesão nos hepatócitos não são condizentes com as observadas nos casos de intoxicação pelas *Brachiaria* spp. cujas

alterações histológicas são caracterizadas por colangiohepatopatia associada a cristais de saponinas esteroidais, semelhantes às encontradas nas intoxicações por *Narthecium ossifragum* (7) e *Tribulus terrestris* (8) e em pastagens de *Brachiaria* spp. (3). Em caprinos os sinais clínicos são semelhantes aos encontrados em ovinos e bovinos (3); dependendo da gravidade das lesões hepáticas, pode ocorrer morte súbita, quando não se observam as lesões de pele ou, nos casos moderados, os animais procuram sombra, ficam apáticos ou inquietos, emagrecem, apresentam opacidade de córnea, mucosas ictéricas, edemas e eczemas na face, barbela e orelhas evoluindo, após uma semana em média, para dermatites severas principalmente nas faces e orelhas, além de outras áreas de pele expostas à luz solar (9). O presente trabalho é um relato de caso de intoxicação por *Brachiaria decumbens* em um cabrito, atendido no setor de grandes animais do Hospital Veterinário da Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande, MS, Brasil.

RELATO DE CASO

No dia 16 de julho de 2014, foi atendido no Hospital Veterinário da Anhanguera-Uniderp um caprino, macho, com sete meses de idade, 25 Kg, sem raça definida, proveniente da fazenda Caprivale, município de Bandeirantes/MS, mantido em pastagens de *Brachiaria decumbens* e suplementado com ração peletizada. O proprietário havia adquirido o animal e, após a quarentena, sem que houvesse observação de qualquer patologia evidente, inseriu-o no rebanho. O cabrito começou a apresentar histórico de isolamento por 15 dias, apresentando dor abdominal com sifose, sendo que foi medicado na propriedade com amoxicilina, enrofloxacina, N-butilbrometo de hioscina, cálcio e polivitamínico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao exame físico observou-se icterícia severa, prostração, apatia, urina concentrada, aumento de volume das articulações dos membros anteriores e estertores pulmonares, os parâmetros fisiológicos apresentavam-se sem alterações. No hemograma observaram-se plaquetas severamente aumentadas, leucocitose e anemia. A sorologia sanguínea não apresentou alterações.

Ao exame de ultrassonografia foi percebido aumento exagerado da vesícula biliar com sedimentação no conteúdo. As radiografias revelaram líquido no pulmão, suspeitando-se de pneumonia. Iniciou-se a fluidoterapia baseada na aplicação de cloreto de sódio 0,9% intravenoso (IV) (solução fisiológica 0,9%® 500mL), polivitamínico IV (10mL/animal), ceftiofur intramuscular (IM) (4,4mg/Kg) e dipirona sódica, IV (25mg/Kg). No terceiro dia de tratamento o animal apresentou melhora clínica demonstrando-se ativo, porém nos exames laboratoriais constataram-se anemia, leucocitose e plaquetas aumentadas, sendo necessária a aplicação de glicose 50%, IV (1mL/Kg) e solução com acetilmetionina, cloreto de colina, frutose, inositol, pantotenato de cálcio e cloridrato de arginina, IV (25mg/Kg) diluídos em cloreto de sódio 0,9%.

No quarto dia de internação o animal se apresentou extremamente prostrado. Observou-se na região torácica efusão com secreção purulenta e o abdômen se apresentava severamente distendido, sem presença de gás. Administrou-se novamente produto polivitamínico diluído em soro glicosado 5% IV (1mL/Kg), oxitetraciclina, IM (20mg/Kg), diacetato de 4,4-diazoaminodibenzimidina e pirazolona, IM (3,5 mg/Kg) e dipirona sódica. No quinto dia houve piora no quadro clínico com prostração aguda, aumento de volume na região torácica com característica flutuante e hipotermia, com características de choque séptico, porém o quadro evoluiu para óbito no mesmo dia.

À necropsia pôde-se observar icterícia em toda a carcaça, líquido torácico de coloração amarelada, fígado com consistência friável e aspecto de noz moscada, a vesícula biliar apresentava-se distendida e com bile escura e espessa.

À histologia, observaram-se linfonodos com depleção do tecido linfoide, o fígado com perda da arquitetura do parênquima, os hepatócitos estavam tumefeitos com núcleo variando de ovais com cromatina frouxa a núcleos picnóticos, e ainda foram observadas mortes celulares individuais. Há acentuada retenção biliar e múltiplas células gigantes multinucleadas com citoplasma espumoso e grânulos de pigmento amarelado. Os ductos biliares estão proliferados e em alguns, observa-se na luz do ducto, cristais refringentes (Figura 1A). Nos macrófagos são observadas imagens negativas de cristais de saponina (Figura 1B), achados compatíveis com morte causada por intoxicação por *Brachiaria* spp.

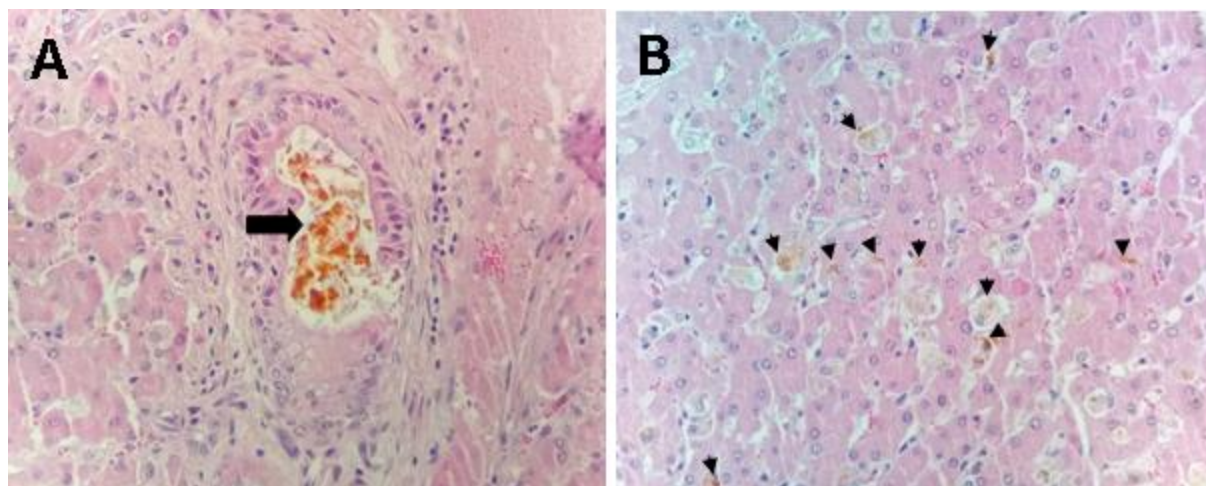


Figura 1. (A) Fotomicrografia de corte histológico de fígado de cabrito SRD intoxicado por *Brachiaria decumbens*. São evidenciados cristais refringentes de saponinas na luz do ducto biliar e (B) fotomicrografia de corte histológico de fígado do mesmo animal. São observadas imagens negativas de cristais de saponinas dentro dos macrófagos.

O primeiro relato de caso de intoxicação de caprinos por *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul foi publicado por Lemos et al. (3), onde se observaram animais acometidos pela intoxicação na proporção de 11,11% e 15% em dois rebanhos estudados. No presente relato de caso o animal estudado apresentava idade similar àquela dos caprinos intoxicados em 1998.

A sintomatologia clínica observada não foi suficiente para o diagnóstico de fotossensibilização hepatógena devido à diferença dos sinais clínicos apresentados pelo caprino, comparado aos dados de literatura (3). A sorologia sanguínea do animal do presente estudo também não foi suficiente para o diagnóstico, pois não apresentava a atividade das enzimas hepáticas AST e GGT elevadas, o que poderiam indicar lesões em hepatócitos, nos ductos biliares e colestase respectivamente (10). Os procedimentos médico veterinários realizados antes de o cabrito ser enviado ao hospital podem ter tido influência na sintomatologia clínica e sorologia sanguínea realizados, impedindo a identificação da fotossensibilização hepatógena.

Os outros dados laboratoriais e a evolução do caso foram provavelmente secundários à necrose hepática, debilitando e levando o animal à morte. Os achados histológicos corroboram a literatura concernente às lesões hepáticas causadas por saponinas em intoxicações por *Brachiaria decumbens* em diferentes animais (3,9), evidenciando que a presença de cristais birrefringentes em ductos biliares e em outras estruturas celulares são achados indicativos desta intoxicação (4).

O fato da fotossensibilização hepatógena em caprinos ser considerada uma doença rara deve-se principalmente ao pequeno rebanho do Mato Grosso do Sul, estimado em 37.927 cabeças (11), uma vez que na literatura mundial já há diferentes relatos desde 1985 (12), diferentemente dos casos relatados em ovinos cujo rebanho é significativamente maior com 498.064 cabeças (11).

CONCLUSÃO

De acordo com o apresentado, conclui-se que, após análise do quadro clínico juntamente com a necropsia e o histopatológico, o disposto se trata de um caso de intoxicação por *Brachiaria decumbens*.

REFERÊNCIAS

1. Santos JA. Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves). Rio de Janeiro: Interamericana; 1979.
2. Souza PE, Oliveira SS, Aguiar-Filho CR, Cunha AL, Albuquerque RF, Evêncio-Neto J, et al. Primary photosensitization in cattle caused by *Froelichia humboldtiana*. Res Vet Sci. 2012;93:1337-40.
3. Lemos RAA, Nakazato L, Herrero JRGO, Silveira AC, Porfírio LC. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em caprinos mantidos sob pastagens de *Brachiaria decumbens* no Mato Grosso do Sul. Cienc Rural. 1998;28:507-10.
4. Riet-Correa B, Castro MB, Lemos RAA, Riet-Correa G, Mustafa V, Riet-Correa F. *Brachiaria* spp. poisoning of ruminants in Brazil. Pesqui Vet Bras. 2011;31:183-92.
5. Jones TC, Hunt RD, King NW. Patologia veterinária. São Paulo: Manole; 2000.
6. Döbereiner J, Tokarnia CH, Monteiro MCC, Cruz LCH, Carvalho EG, Primo AT. Intoxicação de bovinos e ovinos em pastos de *Brachiaria decumbens* contaminados por *Pithomyces chartarum*. Pesqui Agropecu Bras. 1976;1:87-94.
7. Ceh L, Hauge JG. Alveld – producing saponins. I. Chemical studies. Acta Vet Scand. 1981;22:391-402.
8. Glastonbury JRW, Doughty FR, Whitaker SJ, Sergeant E. A syndrome of hepatogenous photosensitization, resembling geldikkop, in sheep grazing *Tribulus terrestris*. Aust Vet J. 1984;61:314-6.
9. Castro MB, Santos Júnior HL, Mustafa VS, Gracindo CV, Moscardini ACR, Louvandini H, et al. *Brachiraria* spp. poisoning in sheep in Brazil: experimental and epidemiological findings. In: Riet-Correa F, Pfister J, Schild AL, Wierenga T. Poisoning by plants, mycotoxins and related Toxins. London: CAB International; 2011. p.110-7.
10. Kaneko JJ. Clinical biochemistry of domestical animals. London: Academic Press; 1989.

11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de recuperação automática SIDRA. Banco de dados agregados. Efetivos/rebanhos, 2012 [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2012 [cited 2014 Oct 09]. Available from: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=38>.
12. Opasina BA. Photosensitization jaundice syndrome in West African dwarf goats and sheep. Trop Grasslands. 1985;19:120-3.

Recebido em: 22/06/2015

Aceito em: 11/07/2016

MEGAESÔFAGO CONGÊNITO EM UM CÃO

Tiago Silva Teófilo¹
Maria Dores Oliveira-Neta²
Mylena Andréa Oliveira Torres¹
Hugo Leonardo Melo Dias¹
Giuliano Lima Alves¹

RESUMO

O megaesôfago é um termo descrito para dilatação do esôfago. As anomalias do anel vascular são as principais causas de disfagia e dilatação do esôfago em animais jovens. O megaesôfago congênito corresponde à hipomotilidade e à dilatação generalizada do esôfago, provoca regurgitação e subdesenvolvimento do filhote após o desmame. Foi atendido um cão de 40 dias de idade, fêmea, sem padrão racial definido, com histórico de disfagia e regurgitação. O animal foi submetido ao exame físico, e foram realizados ainda um hemograma e exame radiográfico simples das cavidades torácica e abdominal, nas posições látero-lateral direito e ventro-dorsal. No exame físico observou-se aumento de volume na região do esôfago cervical. No exame radiográfico foi observado um aumento de volume na porção média do esôfago, próximo à base do coração, onde foi visualizado esôfago dilatado, com conteúdo alimentar. No hemograma foi observado monocitose, linfopenia e aumento no número de plaquetas. Com base nos achados, o animal foi diagnosticado com megaesôfago e procedeu-se tratamento clínico devido ao quadro do paciente.

Palavras-chave: má-formação, dilatação esofagiana, regurgitação.

CONGENITAL MEGAESOPHAGUS IN A DOG

ABSTRACT

Megaesophagus is a term described by the dilation of the esophagus. The abnormalities of the vascular system are the main causes of dysphagia and esophageal dilatation in young animals. Megaesophagus congenital corresponds to hypomotility and generalized esophageal dilation causes regurgitation and underdevelopment of the puppy after weaning. A dog 40 days old, female, without defined breed, with a history of dysphagia and regurgitation was granted. The animal was subjected to physical examination, and were also made a whole blood test and simple radiographs of the thoracic and abdominal cavities, the side-to-side positions right and ventral-dorsal. On physical examination it was observed swelling in the cervical esophagus region. In the radiographic examination it was observed an increase in volume in the middle esophagus, near the base of the heart, where dilated esophagus was visualized with food content. In the hemogram was observed monocytosis, lymphopenia and increase in the number of platelets. Based on the findings, the animal was diagnosed with megaesophagus and proceeded to clinical treatment due to the patient's chart.

Keywords: malformations, esophageal dilation, regurgitation.

¹ Médico (a) da Universidade Federal do Maranhão. Contato principal para correspondência.

² Médica Veterinária, Especialista em Clínica de Pequenos Animais.

MEGAESÓFAGO CONGÊNITA EN UN PERRO

RESUMEN

Megaesófago es un término descrito por la dilatación del esófago. Las anomalías del sistema vascular son las principales causas de la disfagia y la dilatación esofágica en los animales jóvenes. Megaesófago congénito corresponde a hipomotilidad y dilatación esofágica generalizada provoca regurgitación y el subdesarrollo del cachorro después del destete. Se concedió un perro de 40 días de edad, de sexo femenino, sin raza definida, con antecedentes de disfagia y regurgitación. El animal se sometió a un examen físico, y también se hizo un hemograma y radiografías simples de las cavidades torácica y abdominal, las posiciones de lado derecho y ventral-dorsal. En la exploración física se observó inflamación en la región del esófago cervical. En el examen radiográfico se observó un aumento de volumen en el esófago medio, cerca de la base del corazón, donde el esófago dilatado se visualizó con el contenido de los alimentos. En el hemograma se observó monocitosis, linfopenia y aumento en el número de plaquetas. Con base en los hallazgos, el animal fue diagnosticado con megaesófago y se procedió tratamiento clínico debido a la historia clínica del paciente.

Palabras clave: malformaciones, dilatación esofágica, regurgitación.

INTRODUÇÃO

O megaesôfago é um termo descrito para dilatação do esôfago. As anomalias do anel vascular são as principais causas de disfagia e dilatação do esôfago em animais jovens (1), sendo produzidas por uma desordem neuromuscular (2), onde ocorre perda parcial ou total do peristaltismo do órgão, sendo classificado em: adquirido, adquirido secundário, congênito e idiopático. Pode-se definir como uma dilatação patológica do esôfago, porém trata-se de quadro mais complexo que possui origens diversas, razão pela qual é denominado de síndrome do megaesôfago (3). Os animais com anomalias vasculares usualmente têm histórico de regurgitação, principalmente após ingestão de alimentos sólidos (4).

Sinais de megaesôfago incluem regurgitação seguida de perda de peso, desidratação e fraqueza. A regurgitação pode ocorrer logo após a ingestão do alimento ou até duas horas depois (5). O paciente pode parecer clinicamente normal, embora magro, mas em geral se torna progressivamente debilitado. Em alguns pacientes, pode-se palpar o esôfago cervical dilatado contendo alimento ou gás. Sinais respiratórios como tosse, respiração ofegante e cianose, conjuntamente com febre, geralmente indicam uma pneumonia por aspiração secundária (4).

Existem diversas causas de regurgitação em cães. Na ocorrência de vômito, radiografias torácicas deverão ser realizadas para que se possam observar os achados clássicos de megaesôfago (6,7,8). As radiografias torácicas revelam mediastino cranial ampliado, com ou sem evidência de pneumonia por aspiração (4), podendo haver evidência de um esôfago dilatado, cheio de ar, líquido ou material ingerido (6,7,8). O prognóstico para animais com megaesôfago é reservado, sendo que os pacientes com distúrbios adjacentes primários podem melhorar se tal distúrbio for tratado com êxito (6,7).

O megaesôfago congênito corresponde à hipomotilidade e à dilatação generalizada do esôfago, provoca regurgitação e subdesenvolvimento do filhote após o desmame. Sua patogenia ainda não está completamente elucidada, estudos indicam um defeito na inervação aferente vagal para o estômago. A causa ainda é desconhecida e não há evidências de desmielinização ou degeneração neural e a inervação vagal eferente parece estar normal (9).

Essa patologia tem predileção por algumas raças, como o Fox Terriers Pêlo de Arame e Schnauzers miniaturas, além de ser uma afecção hereditária também nas raças Pastor Alemão, Newfoundland Dinamarquês Great Dane, Setter Irlandês, Shar Pei, Pug, Greyhound (8,10).

Objetivou-se relatar um caso de megaesôfago congênito em um cão, de 40 dias de idade, abordando desde seu histórico, sinais clínicos e método diagnóstico até o seu óbito.

RELATO DO CASO

Um canino de 40 dias de idade, fêmea, sem padrão racial definido (SPRD), foi atendido com histórico de disfagia e regurgitação minutos após a ingestão de alimentos. O animal foi submetido ao exame físico, e foram realizados ainda um hemograma e exame radiográfico simples das cavidades torácica e abdominal, nas posições látero-lateral direita e ventro-dorsal, devido a suspeita de megaesôfago.

Na anamnese foi relatado que o paciente apresentava desenvolvimento retardado em comparação com os outros animais da mesma gestação. Após a anamnese, o animal foi submetido ao exame clínico, no qual se observou que o mesmo estava debilitado, apático com sinais de desidratação, tosse e aumento de volume na porção cervical ventral, com dor associada à palpação, nessa região. Na ausculta observaram-se crepitações respiratórias.

No hemograma foi observado monocitose, linfopenia e aumento no número de plaquetas. No exame radiográfico, observou-se aumento de volume na região do esôfago cervical (Figura 1), com presença de conteúdo radiopaco na luz esofágica, dorsal a base cardíaca. Com base no histórico, nos sinais clínicos apresentados e no exame radiográfico obtido, o diagnóstico foi de megaesôfago.

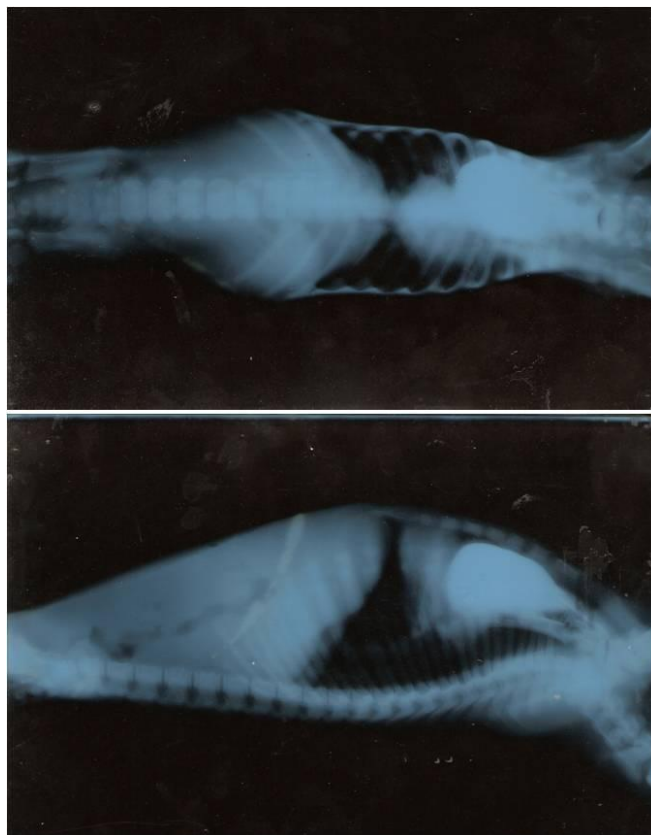


Figura 1. Exame radiográfico simples das cavidades torácica e abdominal de uma cadela com 40 dias de idade, nas posições látero-lateral direita e ventro-dorsal, onde se observa aumento de volume na região do esôfago cervical, compatível com megaesôfago.

O tratamento clínico foi realizado de acordo com Hoenig et al. (7) e Willard (4) com pequenas refeições semi-sólidas e líquidas com o animal em posição elevada num ângulo de 45-90° em relação ao solo, mantendo-o por 15 minutos nesta posição após a alimentação. Foram realizadas fluidoterapia, broncodilatação e antibioticoterapia. Não foi possível a realização de correção cirúrgica devido às condições do paciente que veio a óbito dias depois. Não foi realizada a necropsia por falta de autorização do proprietário.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os sinais clínicos observados, como regurgitação, disfagia, sinais respiratórios como tosse, são semelhantes aos descritos por Gonzales et al. (5) e Silva Júnior et al. (11) e desenvolvimento reduzido comparado aos outros animais da mesma ninhada concordando com Tanaka et al. (9) que relatam o hipodesenvolvimento após o desmame.

O desenvolvimento retardado se deu devido à demora na procura de um diagnóstico profissional o que levou o animal ao estado de subnutrição. Não se encontram referências de megaesôfago congênito em cães sem padrão racial definido e, levando isso em consideração, este seria um relato pioneiro que pode nos auxiliar na ampliação do quantitativo de animais com predisposição para megaesôfago.

A não realização do tratamento cirúrgico, nas condições em que o paciente se encontrava, está de acordo com o preconizado por Torres (12), uma vez que esta não seria uma boa indicação para o caso, devido à situação clínica inviável que o animal se encontrava.

O exame radiográfico é um método de diagnóstico rápido, de baixo custo e fácil acesso, amplamente utilizado na avaliação de megaesôfago em cães. Este, associado aos sinais clínicos, exames físicos e laboratoriais, pode rapidamente nos dar a eventual confirmação da referida patologia.

Os sinais observados no exame radiográfico foram compatíveis com o relatado por diversos autores, os quais visualizaram esôfago dilatado, com conteúdo alimentar (6,7,8), deslocamento ventral de traqueia e constrição esofágica dorsal ao coração (4).

A associação entre o histórico, os sinais clínicos e os achados radiográficos, possibilitaram o diagnóstico de megaesôfago, sendo esta recomendada para quadros de regurgitação recorrente em filhotes.

REFERÊNCIAS

1. Yarim M, Gültiken ME, Öztürk S, Sahal M, Bumin A. Double aortic arch in a cat siamese. *Vet Pathol.* 1999;36:340-1.
2. Johann JM, Caetano CF, Souza JGM, Spader M, Silva FS, Ferreira LN. Megaesôfago e atrofia mastigatória em um canino: relato de Caso. In: *Anais do XVI Congresso de Iniciação Científica; 2007; Pelotas. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2007.*
3. Scherma MR, Fonseca NC, Palucci S. Megaesôfago e atrofia muscular da cabeça secundários a miastenia em uma cadela da raça rottweiler: relato de Caso. *Ens Cienc Cienc Biol Agrar Saude.* 2008;12:197-203.
4. Willard MD. Distúrbios da cavidade oral, faringe e esôfago. In: Couto CG, Nelson RW. *Medicina interna de pequenos animais.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p.398-9.
5. Gonzales JRM, Iwasaki M. Estudo radiográfico de afecções esofágicas em cães. *Clin Vet.* 2001;6:44-50.

6. Twedt DC. Afecções do esôfago. In: Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de medicina interna veterinária. São Paulo: Manole; 1997.
7. Hoenig M, Mahaffey MB, Parnell PG, Styles ME. Megaesophagus in two cats. J Am Vet Med Assoc. 1990;196:763-5.
8. Tilley LP, Smith Jr FWK. Consulta veterinária em cinco minutos. São Paulo: Manole; 2003.
9. Tanaka NM, Hoogevonink N, Tucholski AP, Trapp SM, Frehse MS. Megaesôfago em cães. Rev Acad Cienc Agrar Ambient. 2010;8:271- 9.
10. Andrade SF, Nogueira RMB, Melchert A, Silva MPC, Motta YP, Brinholi RB, et al. Megaesôfago secundário à miastenia grave em uma cadela da raça Pastor Alemão. Semin Cienc Agrar. 2007;28:477-82.
11. Silva Júnior LC, Arruda LCP, Silva DGB, Soares FAP, Borba Neto AV, Leite JEB, et al. Aspectos clínicos e radiográficos de caprino com megaesôfago. Arq Bras Med Vet Zootec. 2011;63:761-4.
12. Torres P. Cardioplastía Esófago-Diafragmática como tratamiento del Megaesófago total congénito idiopático en el perro. Arch Med Vet. 2000;32:46-52.

Recebido em: 20/09/2015
Aceito em: 11/07/2016

ALTERAÇÕES TEGUMENTARES E NO ELETROFEROGRAMA DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1759) MACHO E FÊMEA, PROVOCADAS POR RADIAÇÃO GAMA

Fernando Henrique Rodrigues Borin¹
Paulo Roberto Rodrigues Ramos²
Helton Carlos Delicio³
Marco Antonio Rodrigues Fernandes⁴
Joel Mesa Hormaza²

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a resposta de proteínas plasmáticas de sangue de tilápias macho e fêmea, à dose de 20Gy expostas à radiação gama. Observou-se um padrão diferencial entre os sexos, bem como diminuição e até mesmo supressão de determinadas bandas detectadas por eletroforese em gel de agarose.

Palavras-chave: radiação gama, eletroforese, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759).

CHANGES IN THE ELECTROPHORETIC PATTERN OF PLASMA PROTEINS OF MALE AND FEMALE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1759), CAUSED BY GAMMA RADIATION

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the response of plasma proteins from blood of male and female tilapia at a dose of 20Gy, exposed to gamma radiation. A differential pattern between the sexes was observed. A reduction and even elimination of certain bands were detected by electrophoresis in agarose gel.

Keywords: gamma radiation, electrophoresis, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759).

CAMBIO EN EL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1759) MACHO Y HEMBRA, POR RADIACION GAMMA

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta de las proteínas del plasma de la sangre de tilapia macho y hembra, a dosis de 20Gy, expuestos a la radiación gamma. Se observó un patrón diferencial entre los sexos. La reducción e incluso la eliminación de ciertas bandas fueron detectadas por electroforesis en gel de agarosa.

Palabras claves: radiación gamma, electroforesis, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759).

¹ Mestre em Biologia Geral e Aplicada, IBB - Unesp, Botucatu. Contato principal para correspondência

² Professor Assistente Doutor do Departamento de Física e Biofísica IBB, UNESP, Botucatu

³ Professor Assistente Doutor do Departamento de Fisiologia, IBB, UNESP, Botucatu.

⁴ Professor Assistente Doutor do Departamento de Dermatologia e Radioterapia, FMB, UNESP, Botucatu

INTRODUÇÃO

Sabe-se que a energia nuclear é um poderoso agente mutagênico o qual tem sido estudado desde os eventos radiobiológicos ocorridos em Hiroshima e Nagasaki. Paralelamente, tem-se observado a utilização da energia nuclear em diversos campos da ciência, principalmente, em reatores nucleares. O descarte nuclear tem sido alvo de muitas críticas, pois, por não ser tão fácil e seguro, por vezes pode significar contaminação ambiental (1). Nas últimas décadas tem-se registrado muitos eventos relacionados a explosões e vazamentos nucleares como Fukushima e Chernobyl.

Desta forma cada vez mais se faz necessário o uso de técnicas que possam investigar os efeitos radiobiológicos de eventuais acidentes nucleares. A eletroforese é uma ferramenta que avalia a modificação de um padrão protéico de um tecido quer pela alteração quantitativa das frações, quer pela modificação das mobilidades relativas.

A radiação ionizante pode ser encarada como um estressor ambiental. Existem alguns trabalhos relacionando modificações bioquímicas e estresse ambiental em diferentes espécies de peixes: *Prochilodus lineatus* (2), *Piaractus mesopotamicus* (3,4), *Oreochromis niloticus* (5), *Colossoma macropomum* e *Hoplosternum littorale* (6), *Rhamdia quelen* (7), no híbrido tambacu *P. mesopotamicus* x *C. macropomum* (4,8) e *C. macropomum* (9,10). Poucos trabalhos são encontrados na literatura com o emprego de radiações ionizantes como agente estressor em peixes. O presente trabalho teve por objetivo verificar a resposta no nível de proteínas plasmáticas de sangue de tilápia macho e fêmea, à dose de 20Gy de emissão gama.

RELATO DE CASO

Foram utilizados 2 exemplares de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759), sendo um deles macho e a outra fêmea, selecionados pelo método de identificação macroscópica do sexo por meio da evidenciação da papila urogenital com azul de Metileno (1%), com comprimento padrão entre 11 e 12 centímetros e peso de 50 a 60 gramas.

Inicialmente, os peixes foram aclimatados no biotério de peixes do Departamento de Fisiologia – IBB durante 30 dias em tanques de 2000 litros de água, mantendo-se as condições de temperatura entre 25 e 27°C, pH em torno de 7 e teor de amônia <0,04 ppm.

Após este período, as tilápias foram transferidas para o Laboratório de Fisiologia Digestório e Comportamento de Peixes do IBB e acondicionadas individualmente em aquários de vidro com capacidade de 19L (22cm x 22cm x 40cm) onde permaneceram por 14 dias.

Neste período, a qualidade da água foi monitorada diariamente a fim de se manterem os parâmetros físico-químicos estáveis e ideais para a espécie. A alimentação foi oferecida duas vezes por dia, na proporção de 3 % da biomassa de peixes, permanecendo disponível por uma hora.

Para determinação dos parâmetros basais de proteínas plasmáticas, foram colhidos por punção cardíaca em média 0,3 mL de sangue com auxílio de agulha e seringa heparinizadas. Para tanto, os peixes foram anestesiados em solução anestésica de benzocaína (12%). Sete dias após este procedimento, os peixes foram transferidos, individualmente, dos seus aquários de origem para recipientes de plásticos identificados, com capacidade de 1,5L (17cm x 13cm x 11,5cm).

Após acondicionamento, as tilápias foram expostas à radiação gama de corpo inteiro de dose única, por meio de uma unidade telecobaltoterapia, com campo de radiação envolvendo toda a extensão do espaço onde os peixes foram posicionados. Na determinação do tempo de exposição foram obedecidos os parâmetros radiométricos que garantiram a uniformidade do campo de radiação. Empregou-se a dose absorvida de 20Gy.

A dose foi aferida mediante o emprego de câmara de ionização calibrada para a energia de radiação do cobalto-60, seguindo o Protocolo de Dosimetria TRS-398 da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA). Ao término da irradiação das tilápias, elas retornaram ao laboratório para seus aquários de origem. A cada sete dias uma nova amostra de sangue foi retirada até o 14º dia.

Após estas coletas, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O plasma assim obtido foi transferido para frascos tipo eppendorf e armazenado em -80º C.

Foram aplicados 4µL de plasma, com pipetador automático em gel de agarose geral (CELM) e submetidos à eletroforese em 100V por 20 minutos. Posteriormente, os géis foram corados com Negro de Amido, conforme indicação do fabricante. O gel obtido foi analisado quantitativamente (%) empregando-se a densitometria em VDS (PHARMACIA).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Durante o período de monitoração, logo após a irradiação observou-se uma perda da coloração das listras características da espécie, tanto na tilápia macho como na tilápia fêmea (Figura 1a). Porém, esse fato teve uma maior intensidade na tilápia fêmea que recuperou parcialmente a sua coloração em 7 dias após a irradiação, na colheita de sangue, provavelmente devido ao stress do manuseio (Figura 1b), mas ainda possuía aparentes queimaduras nas extremidades das nadadeiras. O exemplar macho recuperou o padrão de coloração em torno de 24 horas após a irradiação.

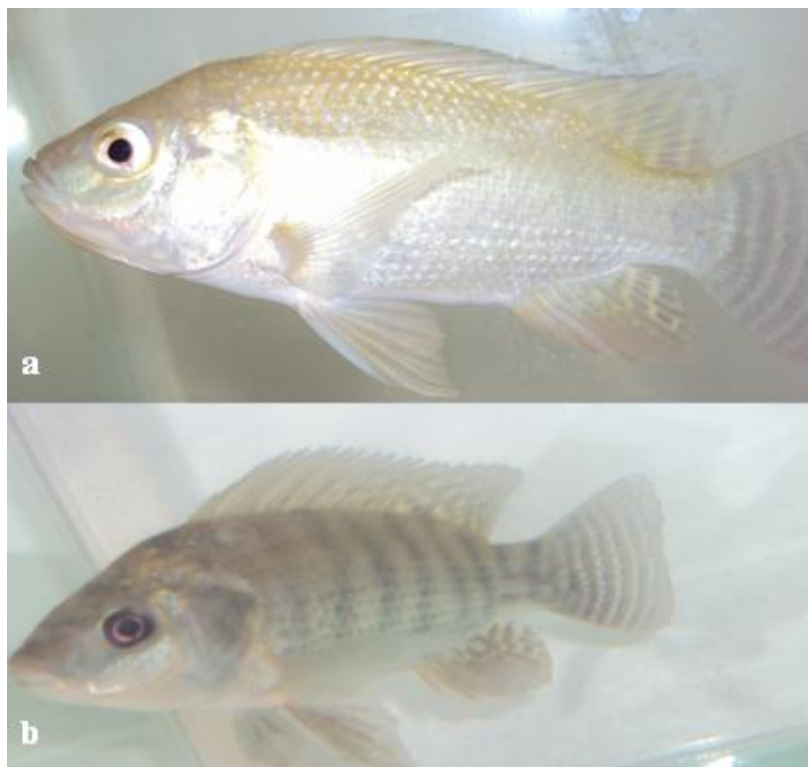


Figura 1. Tilápia fêmea (*Oreochromis niloticus*), com perda da coloração das listras após irradiação (a) e na fase de recuperação da coloração por stress de manuseio (b).

Considerando-se que a dose absorvida, tendo em vista os padrões radiobiológicos, pode ser considerada alta, esperam-se reações fisiológicas imediatas devido à interação da radiação ionizante com moléculas biológicas. Essas reações podem aparecer nos organismos vivos num período que pode variar de horas a semanas. Tais observações ocorrem devido a reações inflamatórias por conta de alterações na permeabilidade celular com liberação de histaminas.

São exemplos o eritema, a mucosite, tanto no nível intestinal quanto oral, provocando até mesmo escamação da epiderme (11). É sabido que as células com alta taxa de proliferação são mais sensíveis à radiação ionizante. Os peixes possuem células mucosas (altamente proliferativas) na epiderme com função de proteção (12) e facilitação de deslocamento em seu ambiente.

Na eletroforese em gel de agarose, foram encontradas 11 bandas protéicas com Rfs variando de 0,12 a 0,81, resultando em diferentes padrões para macho e fêmea. Ambos tiveram 7 bandas protéicas, havendo coincidência nas bandas r3, r5 e r6 (Tabela 1). Quanto ao macho, observou-se a diminuição quantitativa das bandas r1, r3, r4 e r10, no decorrer do tempo. Na fêmea notou-se a diminuição quantitativa da banda r11, sendo que após o décimo quarto dia, ela, assim como a r9, não foram mais detectadas.

Tabela 1. Mobilidades relativas, resultados densitométricos (%) e identificação de bandas das proteínas plasmáticas sanguíneas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) macho e fêmea, separadas por eletroforese em gel de agarose, aos 7 e 14 dias pós-irradiação.

Bandas	Mob. relativas	Macho %			Fêmea %		
		Padrão	7 dias	14 dias	Padrão	7 dias	14 dias
r1	0,12	3,76	3,43	2,37	-	-	-
r2	0,14	-	-	-	3,46	3,05	3,19
r3	0,26	16,1	15,3	12,3	9,21	8,04	8,38
r4	0,41	7,18	5,82	5,16	-	-	-
r5	0,49	14,6	17,1	21,6	13,6	9,89	24
r6	0,58	5,09	3,9	4,94	13,1	13,2	12,4
r7	0,68	14,1	9,11	10,8	-	-	-
r8	0,71	-	-	-	6,16	8,17	4,1
r9	0,72	-	-	-	4,07	5,85	-
r10	0,79	4,67	4,56	4,17	-	-	-
r11	0,81	-	-	-	4,9	3,15	-

Os dados aqui observados demonstram a manifestação da síndrome aguda da radiação, visto que ocorreu o desaparecimento parcial das listras característica das tilápias sugerindo morte de células da epiderme do peixe e a diminuição e até mesmo o desaparecimento de frações proteicas. Numa exposição à radiação X ou gama, observa-se a possível queda de leucócitos, hemácias e plaquetas, sendo que estes valores podem retornar ao normal após algumas semanas (13). Entretanto, lesões que possam ter ocorrido em órgãos nem sempre se recuperam. O conjunto de efeitos biológicos num indivíduo, dependendo da gravidade das lesões, pode determinar sua morte ou a sobrevivência em função do sistema de reparo.

Deverão ser realizados futuros estudos com o objetivo de tentar correlacionar alterações no padrão eletroforético de proteínas plasmáticas de tilápias com doses de radiação absorvida.

REFERÊNCIAS

1. Griffiths AJF, Lewontin RC, Sean BC, Wessler SR. Introdução a genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.
2. Ranzani-Paiva MJT, Godinho HM. Hematological characteristics of the curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae), stocked in experimental conditions. Bol Inst Pesca. 1986;13(2):115-20.

3. Martins ML. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 estressados [tese]. Jaboticabal: Centro de Aquicultura; 2000.
4. Martins ML, Moraes FR, Fujimoto RY, Nomura DT, Fenerick Jr J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. Bol Inst Pesca. 2002;28(2):195-204.
5. Barcellos LG, Souza SMG, Lucero LF. Estudos preliminares sobre o cortisol sérico em resposta ao estresse na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Bol Inst Pesca. 1997;24:239-45.
6. Moura MAF, Farias IP, Val AL. Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). Braz J Med Biol Res. 1994;27(7):1589-98.
7. Barcellos LJG, Woehl VM, Wassermann GF, Quevedo RM, Itzéz I, Krieger MH. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. Aquac Res. 2001;32(3):121-3.
8. Martins ML, Onaka EM, Tavares-Dias M, Bozzo FR, Malheiros EB. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. Rev Ictiol. 2001;9(1-2):25-31.
9. Tavares-Dias M, Sandrim EFS, Moraes FR, Carneiro PCF. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. Bol Inst Pesca. 2001;27(1):43-8.
10. Gomes LC, Araujo-Lima CARM, Roubach R, Chippari-Gomes AR, Lopes NP, Urbinati EC. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. J World Aquac Soc. 2003;34(1):76-84.
11. Okuno E, Yoshimura E. Física das radiações. São Paulo: Oficina de Textos; 2010.
12. Buddington RK, Krogdhal A, Bakke-McKellep AM. The intestine of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. Acta Physiol Scand. 1997;161:67-80.
13. Tauhata L, Salati I, Di Prinzio R, Di Prinzio AR. Radioproteção e dosimetria: fundamentos. Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear; 2003.

Recebido em: 23/04/2016

Aceito em: 11/07/2016

ESTIMATIVA DA IDADE GESTACIONAL EM CADELAS UTILIZANDO AS MEDIDAS FETAIS E A ORGANOGÊNESE OBTIDAS POR ULTRASSONOGRAFIA

Lidiane da Silva Alves¹
Vânia Maria de Vasconcelos Machado²
Janaina Torres Carreira³

RESUMO

Foi realizado um estudo com cinco cadelas de diferentes raças entre si utilizando os métodos ultrassonográficos para estimar a idade gestacional. O exame ultrassonográfico é o de escolha quando se pretende diagnosticar precocemente uma gestação, avaliar a viabilidade fetal e acompanhar o desenvolvimento fetal. No entanto, não é um exame confiável para obter o tamanho da ninhada, deixando essa função para o exame radiográfico no terço final da gestação. A avaliação ultrassonográfica da idade gestacional pode ser obtida pela observação das estruturas extrafetais e fetais de acordo com sua cronologia ou de mensurações fetais com o uso de fórmulas matemáticas. A determinação da idade gestacional tem o objetivo de prever a data do parto e assim auxiliar na manutenção do mesmo ou planejar uma cesariana eletiva.

Palavras-chave: cães, diagnóstico, ultrassom, gestação, idade gestacional.

ESTIMATION OF GESTATIONAL AGE IN BITCHES USING FETAL MEASUREMENTS AND ORGANOGENESIS OBTAINED BY ULTRASONOGRAPHY

ABSTRACT

A study was performed with five bitches of different breeds using ultrasonographic methods for estimating the gestational age. Ultrasound examination is the preferential method to diagnose early pregnancy, to evaluate fetal viability and monitor fetal development. However, is not a reliable test for the size of the litter, leaving that function to the radiographic examination after 45 days of gestation. The ultrasonographic evaluation of gestational age can be gained through observation of the extra-fetal and fetal structures according to their chronology or fetal measurements using mathematical formula. The determination of gestational age helps parturition prediction assistance or even elective cesarean section planning.

Keywords: dogs, diagnosis, ultrasound, pregnancy, gestational age.

¹ Doutoranda em Radiologia Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP, Botucatu – SP. Correspondência. lidianealves@fmvz.unesp.br.

² Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP, Botucatu – SP.

³ Docente em Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária do Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP.

ESTIMACIÓN DE LA EDAD GESTACIONAL EN PERRAS CON EL USO DE LAS MEDIDAS FETALES Y LA ORGANOGÉNESIS OBTIDAS TRAVÉS DE ECOGRAFÍA

RESUMEN

Se realizó un estudio con cinco perras de diferentes razas con métodos ecográficos para estimar la edad gestacional. La ecografía es la elección en el diagnóstico de gestación temprana, viabilidad fetal, evaluar y monitorear el desarrollo fetal. Sin embargo, no es una prueba fiable para el tamaño de todos los cachorros, dejando que la función para el examen radiográfico al final de la gestación. La evaluación ecográfica de edad gestacional se puede conseguir mediante la observación de las estructuras fetales y extrafetales de acuerdo con su cronología o mediciones fetales usando fórmulas matemáticas. La determinación de la edad gestacional tiene como objetivo predecir la fecha de parto y así ayudar en la mantenimiento o planear una cesárea.

Palabras clave: perros, diagnóstico, ecografía, embarazo, edad gestacional.

INTRODUÇÃO

A ultrassonografia permite a obtenção do diagnóstico gestacional precoce (1), da avaliação da viabilidade fetal, do período de gestação, da data do parto (1,2) e para monitorar o desenvolvimento fetal (2). Condições anormais relacionadas à gestação também são avaliadas ao exame ultrassonográfico (3).

A gestação é confirmada com a detecção de um saco gestacional (4,5,6) que pode ser identificado precocemente no 17º dia após o pico do hormônio luteinizante - LH (4,5,7) como uma esfera anecogênica dentro do lúmen uterino (7,8) e medindo aproximadamente 2 mm de diâmetro (4,5,7).

A observação do aparecimento dos órgãos como parâmetro da idade fetal, conforme tabela desenvolvida por alguns autores (9), embora confiável, pode não ser prático, pois para a determinação do dia do surgimento de um órgão é necessário realizar exames sequenciais (10).

Acredita-se que a fórmula da estimativa da idade gestacional é mais precisa no terço inicial e médio da gestação, período em que ocorre um rápido crescimento do feto (5). Alguns parâmetros, como o diâmetro do saco gestacional (DSG), longitude craniocaudal (LCC), diâmetro biparietal (DBP) e o Diâmetro do corpo (DCo), têm sido bem caracterizados e aplicados com sucesso para a estimativa da idade gestacional em cadelas de diversas raças, considerando uma margem de erro de 0 a 2 dias, dependendo do tamanho do animal e outros fatores (11).

O DSG pode ser facilmente mensurado no início da gestação (7,8,12), entre os dias 20 e 37 (5,8). A LCC é obtida por meio da secção longitudinal (7) e confiável no terço inicial ou médio da gestação, mas depois do dia 48 torna-se difícil a mensuração deste plano devido à flexão do feto (5). O DBP é um parâmetro confiável no terço final da gestação, entre os dias 38 e 60 (5,8). O DCo também é mensurado no terço final da gestação e é determinado fazendo-se a média dos dois diâmetros ortogonais a nível do fígado (12).

A estimativa da idade gestacional baseada na aparência anatômica fetal ou pela realização de medidas fetais pelo exame ultrassonográfico tem sido relatada em cadelas da raça Beagle (9), Boxer (13), Yorkshire Terrier (1,14), Golden Retriever (14), Cocker Spaniel Americano, Rottweiler (10), Chow-Chow (15) e Schnauzer miniatura (16).

A determinação precisa da idade gestacional pelo exame ultrassonográfico pode ajudar na assistência ao parto (17) ou planejar uma cesariana eletiva (1,17) em cadelas com gestação

múltipla ou com tempo gestacional desconhecido (17), tendo a segurança de que a formação fetal está realmente concluída (1).

O objetivo deste estudo é estimar a idade gestacional em cadelas de pequeno e de médio porte com 40 dias de gestação após a cobertura ou inseminação artificial (IA) comparando a aparência anatômica fetal com estudos anteriores e associando a mensurações fetais descritas na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas cinco cadelas de diferentes raças, sendo uma Chow-Chow, uma Maltês, uma Shih-Tzu, uma Beagle e uma Yorkshire, com idades variando de um a quatro anos, acasaladas com cães da mesma raça, exceto a fêmea Shih-Tzu, que acasalou com um macho da raça Yorkshire.

Destas fêmeas, apenas a cadela Chow-Chow teve o ciclo estral acompanhado por meio de exames de citologia vaginal, para realizar a inseminação artificial (IA), que foi por três dias, em dias intercalados. As demais fêmeas foram acasaladas entre uma e duas vezes, conforme o criador ou disponibilidade do padreador. O primeiro dia do acasalamento foi considerado o dia 0 da gestação, assim como o primeiro dia da IA.

Os exames ultrassonográficos foram realizados após 40 dias de gestação nos cinco animais, com o aparelho Samsung[®], modelo Medison Sonoace 8000 EX Prime, equipado com transdutor macroconvexo de 3,5 a 5,0 MHz, microconvexo de 6,0 a 9,0 MHz e linear de 5,0 a 10,0 MHz.

Os exames ultrassonográficos foram realizados com o animal em decúbito dorsal e, em alguns casos, lateral, previamente tricotomizados na região abdominal, utilizando um transdutor linear de 5,0-10,0 MHz e gel condutor.

Foram mensuradas, em centímetros, as seguintes variáveis: diâmetro biparietal (DBP) e diâmetro do corpo (DCo). O DCo foi determinado fazendo-se a média dos dois diâmetros ortogonais medidos em corte transversal a nível do fígado e ventrículo gástrico (Figura 1). O DBP também foi feito no corte transversal, respeitando a simetria da cabeça (Figura 2).



Figura 1. Imagem ultrassonográfica demonstrando o diâmetro do corpo da cadela Shih-Tzu, 4 anos, múltipara, acasalada com macho da raça Yorkshire, com aproximadamente 45 dias de gestação (Imagem cedida por José Fernando da Silva Godoy).



Figura 2. Imagem ultrassonográfica demonstrando o diâmetro biparietal da cadela Shih-Tzu, 4 anos, múltipara, acasalada com macho da raça Yorkshire, com aproximadamente 45 dias de gestação (Imagem cedida por José Fernando da Silva Godoy).

Após a obtenção destes valores, pode-se determinar a idade gestacional (IG) e a data do parto (DAP) pelas equações descritas na literatura (9), que podem ser utilizadas para qualquer raça, independente do tamanho do animal (17).

$$\begin{aligned} IG &= (15 \times DBP) + 20 \\ IG &= (7 \times DCo) + 29 \\ IG &= (6 \times DBP) + (3 \times DCo) + 30 \\ DAP &= 65 - IG \end{aligned}$$

Além da utilização das equações, observaram-se as estruturas fetais nesse estudo de acordo com a tabela descrita por Yeager et al. (9) (Tabela 1).

Tabela 1. Média da idade gestacional a partir da primeira observação ultrassonográfica das estruturas extrafetais e fetais (adaptado de Yeager et al. (9)).

Características da gestação	Dias após o pico de LH
Saco gestacional	20
Placenta zonária	27-30
Membrana do saco vitelino	25-28
Membrana alantóica	27-31
Embrião	23-25
Batimento cardíaco	23-25
Orientação fetal	28
Membros	35
Movimento fetal	35
Ventrículo gástrico	35-39
Bexiga urinária	35-39
Esqueleto	33-39
Pulmão hiperecoico em relação ao fígado	38-42
Fígado hipoeicoico em relação ao abdômen	38-42
Rins	39-47
Olhos	39-47
Câmaras cardíacas	40
Intestino	57-63

RESULTADOS

A idade gestacional por meio da organogênese foi avaliada pelas últimas estruturas que se formam no terço final da gestação, comparando com a tabela proposta por Yeager et al. (9) (Tabela 2). A duração da gestação, baseada no dia do primeiro acasalamento, ou IA, até o dia do parto, variou entre 62 e 64 dias, com uma média de $63,2 \pm 0,93$ dias (Tabela 3) Tabela. Os valores do diâmetro biparietal (DBP) obtidos variaram de 1,69 a 2,94 cm e do diâmetro do corpo (DCo) variaram de 2,80 a 5,43 cm (Tabela 4).

Tabela 2. Observação das estruturas fetais e o intervalo provável da idade dos fetos.

Raça	Organogênese	Idade gestacional segundo Yeager et al. (9) (dias)	Idade gestacional sugestiva no momento do exame (dias)
Beagle	Rins e olhos formados Intestino em formação	47-57	48
Chow-Chow	Rins e olhos bem formados Intestino formado com motilidade	57-63	62
Maltês	Rins e olhos bem formados Intestino formado sem motilidade	57-63	60
Shih-Tzu	Rins formados e olhos em formação Intestino não formado	39-47	45
Yorkshire	Rins e olhos bem formados Intestino não formado	47-57	48

Tabela 3. Duração da gestação considerando a data de acasalamento e primeiro dia da IA como dia 0.

Raça	Duração da gestação (dias)
Beagle	64
Chow-Chow	64
Maltês	62
Shih-Tzu	63
Yorkshire	63

Tabela 4. Diâmetros biparietal e do corpo mensurados nas cadelas em estudo.

Raça	DBP (cm)	DCo (cm)
Beagle	1,93	3,52
Chow-Chow	2,94	5,43
Maltês	1,95	3,70
Shih-Tzu	1,69	2,80
Yorkshire	1,98	2,95

A idade gestacional variou de 50,73 dias para a cadela Yorkshire e 63,93 dias para a cadela Chow-Chow (Tabela 5) e os dias antes do parto variaram de um dia, para a cadela Chow-Chow, e 16 dias para a cadela Shih-Tzu (Tabela 6). Utilizando a duração da gestação conhecida e a idade provável pela observação da organogênese, podemos obter os valores em relação aos dias antes do parto de 16 dias para a cadela Beagle, 2 dias para Chow-Chow, 2 dias para Maltês, 18 dias para Shih-Tzu e 15 dias para Yorkshire (Tabela 7).

Tabela 5. Idade gestacional em dias de acordo com as equações propostas por Yeager et al. (9).

Raça	IG = (15 X DBP) + 20	IG = (7 X DCo) + 29	IG = (6 X DBP) + (3 X DCo) + 30
Beagle	48,95	53,64	52,14
Chow-Chow	64,10	67,01	63,93
Maltês	49,25	54,91	52,80
Shih-Tzu	45,35	48,60	48,54
Yorkshire	49,70	49,65	50,73

Tabela 6. Dias antes do parto das cadelas estudadas de acordo com as equações propostas por Yeager et al. (9).

Raça	DAP = 65 – IG (DBP)	DAP = 65 – IG (DCo)	DAP = 65 – IG (DBP+DCo)
Beagle	16 dias	11 dias	13 dias
Chow-Chow	1 dia	-2 dias	1 dia
Maltês	16 dias	10 idas	12 dias
Shih-Tzu	20 dias	16 dias	16 dias
Yorkshire	13 dias	15 dias	14 dias

Tabela 7. Dias antes do parto das cadelas estudadas de acordo com a idade provável pela observação da organogênese no momento da realização do exame ultrassonográfico.

Raça	Duração da gestação (dias)	DAP = DG – Org*
Beagle	64	16 dias
Chow-Chow	64	2 dias
Maltês	62	2 dias
Shih-Tzu	63	18 dias
Yorkshire	63	15 dias

*DAP: dias antes do parto; DG: duração da gestação; Org: organogênese

DISCUSSÃO

A duração da gestação da cadela Chow-Chow neste estudo foi de 63,2 dias, semelhante à média observada por outros autores de 63,57 dias (19). Para a cadela Yorkshire, foi de 63 dias, diferente da média já descrita por outro autor que foi de 60,6 dias (1). Para a cadela Shih-Tzu, foi de 63 dias, tempo de gestação diferente de outro estudo, com a média de 58 dias (20). A média da duração da gestação para a cadela Beagle ficou dentro da variação observada previamente, que foi de 59 a 66 dias (21). Não foi encontrada na literatura a média da duração da gestação para a raça Maltês.

Em cadelas da raça Beagle, o DBP e o DCo para 48 dias de gestação nesta raça apresentou 1,8 cm e 3,0 cm (9), respectivamente, já os valores observados para a cadela da mesma raça do presente estudo neste mesmo período de gestação foi de 1,93 cm e 3,52 cm para o DBP e o DCo, respectivamente, notando-se valores diferentes em ambos os estudos.

A equação que mais apresentou precisão da idade gestacional para a cadela Beagle foi a que utiliza o DBP, sendo as equações DCo e do DBP mais o DCo com precisão de -5 dias e -2 dias, respectivamente. Para a cadela Chow-Chow as equações do DBP e do DBP mais o DCo foram as que mais se aproximaram com precisão de -1 dia, resultado semelhante se mostra em outro estudo, onde o parâmetro do DBP se mostrou eficaz nessa raça (15). Para a cadela Maltês nenhuma das equações se mostrou eficaz. Para a cadela da raça Shih-Tzu a equação do DBP mostrou precisão de +2 dias e as equações do DCo e do DBP mais o DCo mostraram

precisão de -2 dias. Para a cadela Yorkshire, apenas a equação do DCo se mostrou precisa, o mesmo parâmetro (DCo) também se apresentou eficaz nesta raça em outro estudo (22), já a equação do DBP mostrou precisão de -2 dias e a equação do DBP mais o DCo precisão de -1 dia.

Em todas as cadelas, a observação da organogênese mostrou-se precisa. O conhecimento da data do acasalamento, ou IA, foi fundamental para a avaliação da idade gestacional pela observação da organogênese.

CONCLUSÃO

A estimativa da idade gestacional e, conseqüentemente, a data do parto pela observação do período da organogênese mostrou-se precisa nos animais em estudo, diferentemente das equações propostas por outros autores, que apresentaram valores variados, onde a equação que utiliza o parâmetro do DBP foi precisa apenas para a raça Beagle, a equação que utiliza o parâmetro DCo foi precisa apenas para a raça Yorkshire, e as três equações apresentaram valores distintos para a raça Maltês. Com esse estudo, pode-se concluir que a observação da organogênese, juntamente com a anamnese, é um método prático e eficiente para a avaliação da idade gestacional em cadelas.

REFERÊNCIAS

1. Leite LG. Acompanhamento gestacional em cadelas das raças Yorkshire Terrier e Boxer por ultra-sonografia [dissertação]. Fortaleza: Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará; 2003.
2. England G, Concannon PW. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. In: Concannon PW, England G, Verstegen III J, Linde-Forsberg C. Recent advances in small animal reproduction. Ithaca: International Veterinary Information Service; 2002.
3. Feliciano MAR, Vicente WRR, Leite CAL, Muzzi LAL. Novas perspectivas no diagnóstico ultra-sonográfico gestacional em cadelas: revisão de literatura. Clin Vet. 2008;7:56-60.
4. Almeida AH. Estimativa do dia do parto em cadelas da raça Boxer por meio de mensurações ultra-sonográficas no concepto [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2002.
5. Nyland TG, Mattoon JS. Ovarios y útero. In: Nyland TG, Mattoon JS. Diagnóstico ecográfico en pequeños animales. 2a ed. Barcelona: Multimedica; 2004. p.240-56.
6. Hecht S. Female reproductive tract. In: Pennick D, D'anjou MA. Atlas of small animal ultrasonography. Ames: Blackwell Publishing; 2008. p.401-6.
7. Dickie A. Imaging of the reproductive tract. In: Mannion P. Diagnostic ultrasound in small animal practice. 1a ed. Oxford: Blackwell Science; 2006. p.145-54.
8. England G, Yeager A, Concannon PW. Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. In: Concannon PW, England G, Verstegen III J, Linde-Forsberg C. Recent advances in small animal reproduction. Ithaca: International Veterinary Information Service; 2003. p.

9. Yeager AE, Mohammed HO, Meyers-Wallen VN, Vannerson L, Concannon PW. Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in Beagles. *Am J Vet Res.* 1992;53:342-51.
10. Teixeira MJ, Souza DMB, Melo KCM, Wischral A. Estimativa da data do parto em cadelas Rottweiler através da biometria fetal realizada por ultrassonografia. *Cienc Anim Bras.* 2009;10:853-61.
11. Concannon PW. Understanding and monitoring canine pregnancy. In: *Anais do 30o World Small Animal Veterinary Association Congress; 2005; Mexico City. Mexico City: WASAVA; 2005.*
12. Pey P, Lévy X. Papel do diagnóstico por imagens no cálculo do tempo de gestação. *Hora Vet.* 2011;30:54-8.
13. Almeida AH, Sterman FA, Miglino MA. Mensuração ultra-sonográfica das dimensões da placenta em gestações normais em cadelas da raça Boxer e sua relação com a idade gestacional. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2003;40:136-40.
14. Socha P, Janowski T. Predicting the parturition date in Yorkshire Terrier and Golden Retriever bitches using ultrasonographic fetometry. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2011;55:71-5.
15. Melo KCM, Souza DMB, Teixeira MJ, Wischral A. Fetometria ultra-sonográfica na previsão da data do parto em cadelas das raças Cocker Spaniel Americano e Chow-Chow. *Cienc Vet Trop.* 2006;9:23-30.
16. Kim B-S, Son C-H. Time of initial detection of fetal and extra-fetal structures by ultrasonographic examination in Miniature Schnauzer bitches. *J Vet Sci.* 2007;8:289-93.
17. Kim Y-H, Travis AJ, Meyers-Wallen VN. Parturition prediction and timing of canine pregnancy. *Theriogenology.* 2007;68:1177-82.
18. Castro VM, Mamprim MJ, Lopes MD, Sartor R. Acompanhamento da gestação em cadelas pelo exame ultrassonográfico: revisão de literatura. *Vet Zootec.* 2011;18:9-18.
19. Jabin VCP, Finardi JC, Mendes FCC, Weiss RR, Kozicki LE, Moraes R. Uso de exames ultra-sonográficos para determinar a data de parturição em cadelas da raça Yorkshire. *Arch Vet Sci.* 2007;12:63-70.
20. Feliciano MAR, Nepomuceno AC, Cardilli DJ, Coutinho LN, Oliveira MEF, Almeida VT, et al. B-mode ultrasound and Doppler mode for early-stage pregnancy diagnosis in Shi-Tzu bitches. *Acta Sci Vet.* 2013;41:1160.

21. Yeager AE, Concannon PW. Association between the preovulatory luteinizing hormone surge and the early ultrasonographic detection of pregnancy and fetal heartbeats in beagle dogs. *Theriogenology*. 1990;34:655-65.
22. Camargo NI, Berlim AT, Magalhães FJR, Manso Filho HC, Wishral A. Biometria fetal em cadelas da raça Shih-Tzu através de ultrassonografia. *Med Vet*. 2011;5:1-6.

Recebido em: 01/01/2015

Aceito em: 28/09/2016

AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE PLASMOCITOMA CUTÂNEO EM UM CÃO: RELATO DE CASO

Lígia Fernandes Gundim¹
Thaís de Almeida Moreira¹
Nicolle Pereira Soares²
Alessandra Aparecida Medeiros³

RESUMO

Plasmocitomas são neoplasias incomuns no cão, originárias dos plasmócitos. Ocorrem em qualquer tecido mole, mas principalmente na pele, cavidade oral e trato digestivo. Relata-se um caso de plasmocitoma anaplásico cutâneo em um cão, mestiço, de 16 anos. O animal apresentava vários nódulos de coloração rósea, irregulares e de consistência macia, distribuídos na pele. Na análise histopatológica observou-se área circunscrita constituída de células redondas exibindo intensa anisocitose, anisocariose e moderada quantidade de células gigantes, multinucleadas. A avaliação imunohistoquímica revelou expressão para MUM1 e CD79a, permitindo o diagnóstico de plasmocitoma anaplásico.

Palavras-chave: pele, plasmócitos, neoplasia, caninos.

ASSESSMENT IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF THE CUTANEOUS PLASMACYTOMA IN A DOG - CASE REPORT

ABSTRACT

Plasmacytomas are uncommon neoplasms in dogs originating in the plasma cells. Occur in any soft tissue, but mainly in the skin, oral cavity and digestive tract. We reported a case of cutaneous anaplastic plasmocytoma in a dog, mixed breed, 16 years old. The animal showed multiple nodules of pinkish color, rough and smooth consistency, spread on the skin. In the histopathological examination revealed circumscribed area consisting of round cells showing intense anisocytosis, anisokaryosis and moderate number of giant cells, multinucleated. The immunohistochemical demonstrated expression for MUM1 and CD79a, allowing diagnosis of anaplastic plasmacytoma.

Keywords: skin, plasma cells, neoplasm, canine.

EVALUACIÓN IMUNOHISTOQUÍMICA DE PLASMOCITOMA CUTÂNEO EN UN PERRO - REPORTE DE UN CASO

RESUMEN

Los plasmacitomas son neoplasias poco comunes em los perros, procedentes de plasmocitos. Ocurre en cualquier tejido blando, pero principalmente em la piel, cavidad oral y el tracto digestivo. Se describe un caso de plasmocitoma anaplásico cutâneo em un perro,

¹ Residente em Patologia Animal, Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário, Universidade Federal de Uberlândia. Contato principal para correspondência.

² Mestranda em Ciências Animal- Saúde Animal, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia.

³ Professor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário, Universidade Federal de Uberlândia.

mestizo, de 16 años de edad. El animal mostro múltiples nódulos de color rosado, irregulares y de consistência blanda, extendidos em la piel. Em elexamen histopatológico se observo área circunscrita consistente em células redondas que muestran intensa anisocariosis, anisocitosis y número moderado de células gigantes, multinucleadas. La evaluación inmunohistoquímica reveló expresión de CD79a y MUM1, lo que permite el diagnóstico de plasmocitoma anaplásico.

Palabras-clave: piel, plasmocitos, neoplasia, canino.

Os plasmocitomas são neoplasias originárias de plasmócitos derivados de linfócitos B (1). É um tumor de células redondas do sistema hematopoiético (2) que quando na medula óssea é chamado mieloma, sendo esta a sua forma mais frequente (3). Entretanto, pode ocorrer em qualquer tecido mole, formando pápulas ou nódulos em forma de cúpula (1).

O plasmocitoma extra-ósseo é considerado uma neoplasia benigna (4,5), porém sua etiologia ainda não está bem elucidada. Uma hipótese seria que plasmocitomas extramedulares possam ocorrer após estimulação antigênica prolongada (6).

São neoplasias incomuns no cão e raras no gato (1). Em estudo realizado por Souza (7), de 761 tumores cutâneos em cães, apenas 2 (0,6%) correspondiam à plasmocitomas. Já Priebe et al. (8) avaliando a prevalência de tumores em cães e gatos, notaram que de 226 biópsias realizadas 2,1% eram de plasmocitoma anaplásico.

Histologicamente, são visualizados como uma proliferação bem delimitada de células redondas com disposição em lençóis, cordões, trabéculas ou ninhos pouco definidos e separados por pequena quantidade de tecido conjuntivo (9).

O tratamento consiste na remoção cirúrgica das lesões associada à quimioterapia e/ou radioterapia (2).

Um cão, macho, mestiço, 16 anos, castrado, foi encaminhado ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU), apresentando massas lobuladas, de superfície irregular, tamanhos variados, de coloração rósea e consistência macia, distribuídas na pele (Figura 1A).

O animal foi submetido à biópsia cirúrgica e amostras da massa foram coletadas e acondicionadas em formol tamponado a 10%, encaminhadas para o laboratório de histopatologia do HV-UFU, para confecção de lâminas de microscopia conforme Tolosa et al.(10). Histologicamente, notou-se proliferação de glândulas sebáceas, associada à hiperplasia epitelial, bem como área circunscrita, constituída de células redondas exibindo intensa anisocitose e anisocariose e moderada quantidade de células gigantes, multinucleadas (Figura 1 B). Foi possível verificar ainda que havia infiltração de células neoplásicas na derme superficial.

Para confirmação do diagnóstico, foi realizado estudo imuno histoquímico com a finalidade de se estabelecer histogênese de neoplasia pouco diferenciada a morfologia. Os cortes de tecido processados rotineiramente para histologia e incluídos em parafina foram colocados sobre lâminas previamente silanizadas. A recuperação antigênica pelo método de calor úmido foi realizada em panela a vapor, por 20-30 min. A incubação com os anticorpos primários foi feita por toda a noite a 4 graus C. Para revelação foi utilizado o sistema Advance. A coloração foi feita com 3,3-diaminobenzidina e a contra coloração com hematoxilina. Controles externos e/ou internos foram utilizados para validar a reação. Foi observada imunoexpressão para MUM1 e CD79a, tratando-se, portanto, de um caso de plasmocitoma cutâneo anaplásico (Figura 2).

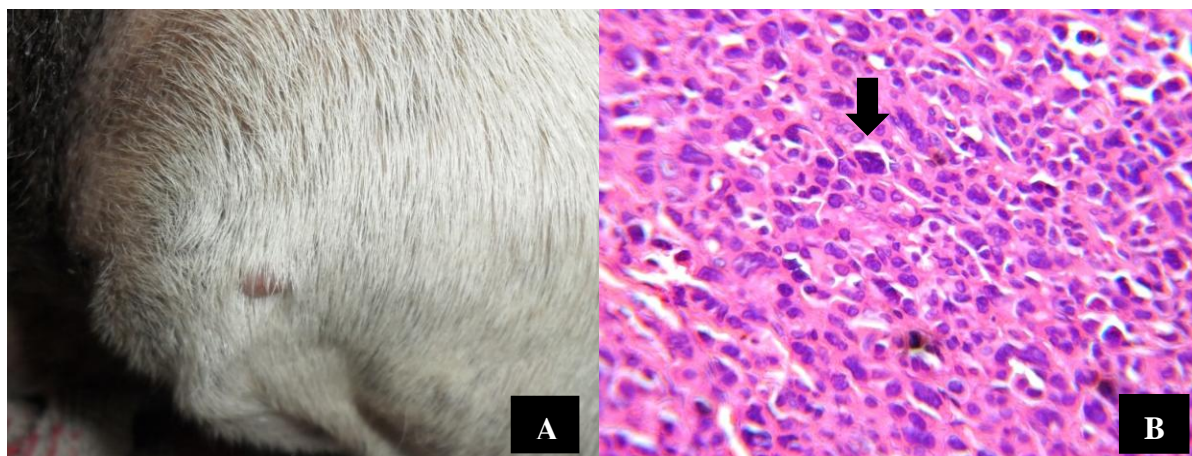


Figura 1. Cão, mestiço, 16 anos. A: Nódulo cutâneo macio à palpação, de coloração rósea. B. Fotomicrografia de plasmocitoma cutâneo. Notar elevado grau de anaplasia e células gigantes (seta). HE. Objetiva de 40X.

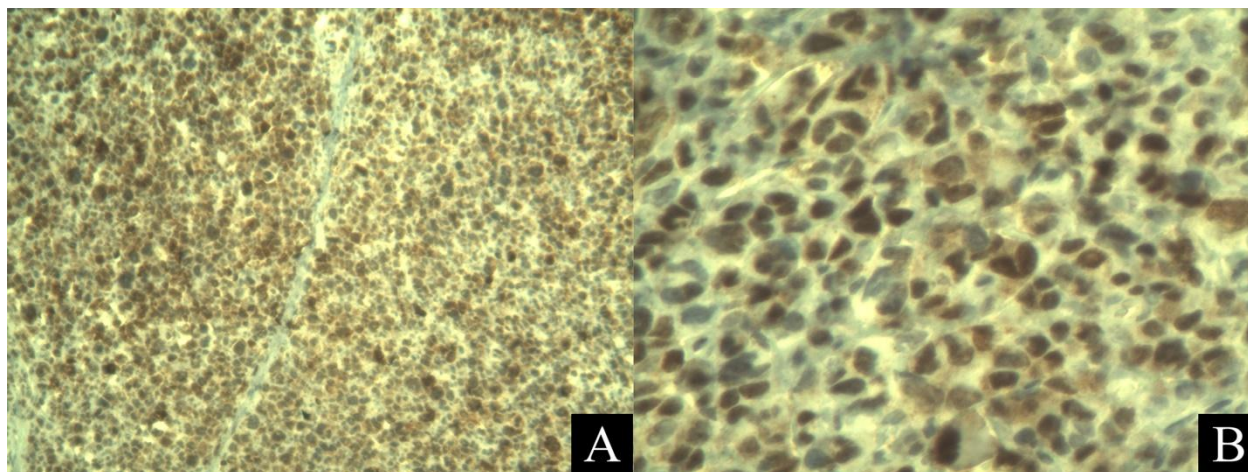


Figura 2. Fotomicrografia de plasmocitoma cutâneo anaplásico, cão, 16 anos. A: notar células marcadas por anticorpo anti CD79 a, 10X, contracoloração com Hematoxilina. B: notar anaplasia celular e imunomarcção para MUM 1, 40X, contracoloração com Hematoxilina.

Os plasmocitomas cutâneos são tumores originários de plasmócitos, mas não estão associados ao mieloma múltiplo sistêmico (11). As raças mais acometidas são Cocker Spaniels, Poodles, Terrier Escocês e Airedaleterrier (1), entretanto as raças predominantes de cada região são variadas e tendem a acometer cães mais idosos (4,5). O cão do presente relato era mestiço e idoso, o que corrobora com os achados dos autores.

Macroscopicamente são tumores alopecicos, pequenos, macios, elevados e geralmente únicos, podendo alguns animais apresentar a forma múltipla (1). As características macroscópicas da massa identificada no cão do presente trabalho, massas lobuladas, de superfície irregular, tamanhos variados, distribuídas na pele de coloração rósea e consistência macia, são condizentes com a literatura.

Histologicamente as células tumorais visualizadas apresentavam-se com formato arredondado, eosinofílicas, com intensa anisocitose e anisocariose, células gigantes e multinucleadas. Frequentemente em tumores de células redondas não é possível instituir o diagnóstico definitivo apenas com histopatologia, pois estes tumores apresentam características histológicas muito semelhantes (6). A neoplasia do presente caso apresentava células gigantes e multinucleadas, que segundo Jacobs (1) são características de proliferações histiocíticas.

Uma vez que a histopatologia não foi suficiente para diagnóstico, submeteu-se as amostras à imunohistoquímica. O propósito da imunohistoquímica é reconhecer antígenos e assim identificar e classificar células específicas dentro de uma população celular (12). Marcadores CD1 e Lisozima são usados para detecção de macrófagos (13) e são testados para diagnóstico diferencial de histiocitose maligna, já os marcadores CD79a e MUM1 tem sido usados para diagnóstico de plasmocitoma (14,15). Isto posto, as células neoplásicas não imunuoexpressaram CD1 e Lisozima, pois não tinham origem histiocítica e expressaram marcadores que detectam linfócitos B ou células que se originam na sua diferenciação, como os plasmócitos.

Ressalta-se assim, a necessidade de considerar os diagnósticos diferenciais para o plasmocitoma cutâneo canino, uma vez que este demonstra aspecto histopatológico semelhante a outras neoplasias cutâneas, como a histiocitose maligna ou o histiocitoma fibroso maligno. Neste estudo, a realização da análise imunohistoquímica com expressão para MUM1 e CD79a e a observação da não expressão para CD1 e Lisozima, foi fundamental para o estabelecimento do diagnóstico definitivo e elucidação do caso.

REFERÊNCIAS

1. Jacobs RM, Messick JB, Valli VE. Tumors of the hemolymphatic system. In: Meuten DJ. Tumors in domestic animals. 4a ed. Ames: Iowa State; 2002. p.119-98.
2. Abreu TGM, Sampaio GR, Wouters F, Rios PBS, Oliveira AK. Plasmocitoma extramedular mucocutâneo em cão: relato de caso. In: Anais do 35o Congresso Brasileiro da Anclivepa; 2014; Belo Horizonte. Belo Horizonte: Anclivepa; 2014. p.166-9.
3. Aster J, Kumar V. Leucócitos, linfonodos, baço e timo. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL. Patologia estrutural e funcional. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.580-625.
4. Vail DM, Withrow SJ. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: Withrow SJ, MacEwen EG. Small animal clinical oncology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2001. p.233-60.
5. Thrall MA. Diagnostic cytology in clinical oncology. In: Withrow SJ, MacEwen EG. Small animal clinical oncology. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p.118-20.
6. Morris J, Dobson J. Oncologia em pequenos animais. São Paulo: Roca; 2007.
7. Souza TM. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães [dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2005.
8. Priebe APS, Riet-Correa G, Paredes LJA, Costa MSF, Silva CDC, Almeida MB. Ocorrência de neoplasias em cães e gatos da mesorregião metropolitana de Belém, PA entre 2005 e 2010. Arq Bras Med Vet Zootec. 2011;63:1583-6.
9. Silva TPD, Silva VL, Silva FL. Plasmocitoma extramedular cutâneo em cão, obstrução unilateral do conduto auditivo. Med Vet. 2012;6:1-5.
10. Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2a ed. Barueri: Manole; 2003.

11. De Nicola DB. Células redondas. In: Cowel RL, Tyler RD, Meinkoth JH, De Nicola DB. Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos. 3a ed. São Paulo: Medvet; 2008. p.74.
12. Capelozzi VL. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. J Bras Pneumol. 2009;35:375-82.
13. Santos IFC, Cardoso JMM, Shian C, Marujo RB, Silva FF. Sarcoma histiocítico em cão: relato de caso. Vet Zootec. 2013;20:576-81.
14. Saback TL, Botelho LFF, Enokihara MMSS, Michalany NS, Floriano MC. Multiple primary cutaneous plasmacytoma: first reported case in Brazil. An Bras Dermatol. 2012;87:629-31.
15. Tsuboi K, Iida S, Inagaki H, Kato M, Hayami Y, Hanamura I, et al. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. Leukemia [Internet]. 2000 [cited 2014 Jun 30];14:449-56. Available from:<http://www.nature.com/leu/journal/v14/n3/full/2401696a.html>.

Recebido em: 05/08/2014

Aceito em: 06/10/2016

SÍNDROME HIPEREOSINOFÍLICA IDIOPÁTICA EM CÃO: UMA INSÓLITA DESCRIÇÃO NO NORDESTE DO BRASIL

Luã Barbalho de Macêdo¹
Muriel Magda Lustosa Pimentel¹
Ilanna Vanessa Pristo de Medeiros Oliveira¹
Lidiane Mickaelle Soares de Oliveira¹
Kilder Dantas Filgueira¹

RESUMO

A síndrome hipereosinofílica idiopática (SHI) é uma mieloproliferação rara em cães, com intensa presença de eosinófilos circulantes e em órgãos. Há poucos relatos da SHI canina, e sem registro da doença no Nordeste do Brasil. Objetivou-se relatar a SHI em um cão do semiárido nordestino brasileiro, ressaltando a importância no diagnóstico da síndrome para outras causas de eosinofilia. Um canino, macho, quatro anos, sem raça definida, foi encaminhado ao Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil). Possuía histórico de eosinofilia crônica (por exames hematológicos progressivos). A vermifugação estava atualizada. Solicitaram-se hemograma completo, citologia da medula óssea, sorologia para leishmaniose visceral e ensaio imunocromatográfico para detecção de *Dirofilaria immitis*. Ocorria eosinofilia sistêmica e acentuada quantidade de eosinófilos na medula óssea. Não houve positividade para doenças infecciosas. Instituiu-se terapia com prednisolona. Transcorridos 15 dias, a hematologia exibiu eosinófilos nos valores de referência, assim como a contagem de eosinófilos intramedular. Após 112 dias do tratamento, o paciente retornou a manifestar eosinofilia sérica e no compartimento intraósseo, substituindo a prednisolona pelo deflazacort. Após 63 dias do início desse último, o cão possuía normalidade nos índices de eosinófilos circulantes e no padrão celular medular. Devido aos achados laboratoriais, resposta ao tratamento e exclusão de outras causas de eosinofilia, definiu-se o diagnóstico de SHI. Deve-se incluir a síndrome na distinção da eosinofilia crônica canina, principalmente no semiárido nordestino, onde geralmente associa-se a alteração hematológica com doenças infecciosas e/ou parasitárias.

Palavras-chave: Eosinofilia idiopática, *Canis familiaris*, Nordeste brasileiro.

IDIOPATHIC HYPEREOSINOPHILIC SYNDROME IN DOG: AN UNSUAL DESCRIPTION IN NORTHEASTERN BRAZIL

ABSTRACT

Idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES) is a rare canine mioproliferation, with high quantity of eosinophils in peripheral blood and organs. There are few case reports of this disease in dogs, and no record of the disease in the Northeast of Brazil. This paper aimed to report the HES in a semi-arid Northeast dog, emphasizing the importance in the differential diagnosis of the other causes of eosinophilia. A 4 years old mixed breed male dog was referred to the Rural Federal University of Semi-Árid Hospital (Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil) present cronic eosinophilia (previously hematologic test). The deworming has been done. Complete blood count, marrow bone cytology, Leishmania serological test and immunochromatographic assay for the detection of *Dirofilaria immitis* were requested. The laboratorial results showed systemic eosinophilia and marked amount of eosinophils in bone

¹ Hospital Veterinário, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. UFERSA. Contato principal para correspondência.

marrow. There was negative to infectious disease. Treatment with prednisolone was established. After 15 days, eosinophils count had returns to reference values as well as the bone marrow count. Lather than 112 days of treatment, the animal manifested serum and intraosseous compartment eosinophilia again, so prednisolona was replaced by deflazacort. After 63 days of the start this new treatment, the dog presented normal eosinophils count in blood and bone marrow. Considering complementary exams, response of treatment and absence of other eosinophils causes the diagnosis of HES was established. Veterinarians must include the syndrome in canine with chronic eosinophilia in differential diagnosis, especially in the northeastern region where there are usually hematological abnormalities associated with infectious disease or parasitic.

Keywords: Idiopathic eosinophilia, *Canis Familiaris*, Brazilian northeast.

SÍNDROME HIPEREOSINOFÍLICO IDIOPÁTICO EN EL PERRO: UNA DESCRIPCIÓN POCO COMÚN EN EL NORESTE DE BRASIL

RESUMEN

Síndrome hipereosinofílica idiopática (SHI) es un mieloproliferación rara en perros con presencia intensiva de los eosinófilos y los órganos de circulación. Hay pocos informes de canino SHI, y sin antecedentes de la enfermedad en el noreste de Brasil. El objetivo fue informar el SHI en un perro semiárido del noreste, haciendo hincapié en la importancia en el diagnóstico del síndrome de otras causas de eosinofilia. Un canino, macho, cuatro años mestizo, fue remitido al Hospital Veterinario de la Universidad Federal Rural de la Zona Semiárida (Mossoro, Rio Grande do Norte, Brasil). Tenía una historia de eosinofilia crónica (por anterior hematología historia). Desparasitación actualiza. Solicitada para completar el recuento sanguíneo, la citología de la médula ósea, la serología para la leishmaniasis visceral y prueba de inmunoensayo para la detección de *Dirofilaria immitis*. Ocurrió eosinofilia sistémica y la cantidad marcada de eosinófilos en la médula ósea. No fue positivo para las enfermedades infecciosas. La terapia se instituyó-prednisolona. Después de 15 días, hematología mostró eosinófilos en los valores de referencia, así como el recuento de eosinófilos intramedular. Después de 112 días en el tratamiento, el paciente volvió a expresar eosinofilia suero y el compartimiento intraóseo mediante la sustitución de deflazacort prednisolona. Después de 63 días del inicio de la última, el perro tenía la normalidad en los niveles de eosinófilos circulantes y patrón de células de la médula espinal. Debido a los hallazgos de laboratorio, la respuesta al tratamiento y la exclusión de otras causas de eosinofilia, el diagnóstico se definió SHI. Debe incluir el síndrome en canina distinción eosinofilia crónica, especialmente en la región semiárida del noreste, donde por lo general se asocia con anomalías hematológicas con enfermedades infecciosas y/o parasitarias.

Palabras clave: Eosinofilia idiopática, *Canis familiaris*, el noreste de Brasil.

INTRODUÇÃO

A denominação síndrome hipereosinofílica idiopática (SHI) designa uma situação hematológica inespecífica caracterizada pela elevada concentração absoluta de eosinófilos na circulação periférica, persistente por pelo menos seis meses, e infiltração dessas células em diversos órgãos, resultando na formação de nódulos inflamatórios, principalmente no coração, fígado, linfonodos e medula ósea, sem qualquer evidência de parasitas, processos alérgicos ou neoplasias. Essa situação difere do complexo síndrome hipereosinofílica ou doença

eosinofílica disseminada por não ter uma causa definida e ser provavelmente de origem primária (1-4).

É uma doença idiopática rara. Porém, quando descrita é mais comumente verificada nos gatos do que em cães. Dependendo do órgão predominantemente afetado, a condição recebe denominações próprias como enterite eosinofílica, infiltração pulmonar com eosinofilia e endocardite de Loffer. Nos felinos, o trato gastrointestinal é o órgão mais acometido, entretanto, em canídeos, essa doença afeta, principalmente, os sistemas respiratório e gastrointestinal, mas também a medula óssea (2-5).

A base fisiopatológica da SHI é o desequilíbrio na produção dos eosinófilos, mecanismo esse ainda sem causa conhecida. Entretanto, acredita-se que seja devido ao aumento da síntese de fatores que estimulam a produção de eosinófilos, secundário às anormalidades clonais dos linfócitos T; atividade aumentada ou prolongada das próprias citocinas eosinofiloipoiéticas; defeitos na transmissão dos sinais dos receptores ou na regulação supressiva fisiológica da eosinofiloipoiese (6). Até o presente momento há poucos relatos de cães acometidos pela SHI, sendo as descrições concentradas principalmente na literatura estrangeira (1,4,7) e no Brasil os registros são verificados isoladamente no eixo Sul e Sudeste (3,8), não sendo verificada a notificação da doença em outras regiões do País, como no Nordeste. Conforme o exposto, o trabalho objetivou relatar a SHI em um canino do semiárido nordestino brasileiro, contribuindo para os médicos veterinários locais na identificação da doença e tratamento adequado dessa afecção e ressaltando a importância da mesma para a distinção das causas de eosinofilia na espécie canina.

RELATO DE CASO

Um canino, quatro anos de idade, sem raça definida, macho, castrado, foi encaminhado ao Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil). Possuía como histórico, intolerância ao exercício, apatia, tosse, perda de peso, prurido, poliúria, êmese, salivação e eosinofilia crônica (verificada por exames hematológicos consecutivos progressos). O tempo de evolução correspondia há quatro meses. O animal encontrava-se com a vermifigação atualizada, com o uso de uma associação de praziquantel, pamoato de pirantel, febantel e ivermectina.

O paciente foi submetido ao exame físico. Foi verificada presença de ectoparasitas, estado nutricional caquético (Figura 1), atrofia dos músculos frontais e temporais, linfadenomegalia generalizada, mucosas hipocoradas, onicogrifose e onicomadese. Na auscultação cardiopulmonar, detectaram-se bulhas arrítmicas. Também, foi observada secreção ocular mucopurulenta (Figura 1) bilateral, congestão episcleral e enoftalmia. Realizou-se o teste lacrimal de Schirmer e o uso do corante oftálmico de fluoresceína (em tiras), com resultados não dignos de nota.

Como exames complementares, solicitaram-se hemograma completo, perfil bioquímico sérico (alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase, proteínas totais/frações, ureia, creatinina, cálcio, fósforo e glicose), além de citologia aspirativa dos linfonodos e da medula óssea, sorologia para leishmaniose visceral (por imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático) e ensaio imunocromatográfico para detecção de antígeno da *Dirofilaria immitis*.

Na hematologia e bioquímica sérica, observaram-se anemia normocítica normocrômica, eosinofilia relativa e absoluta (Tabela 1), hipoglicemia e aumento da alanina aminotransferase. O exame citológico dos gânglios linfáticos e medula óssea exibiram hiperplasia linfoide e acentuada quantidade de eosinófilos (Figura 1), respectivamente. Não foram observadas células atípicas e/ou neoplásicas no compartimento medular. O teste sorológico e imunocromatográfico não detectaram a presença de doenças infecciosas.

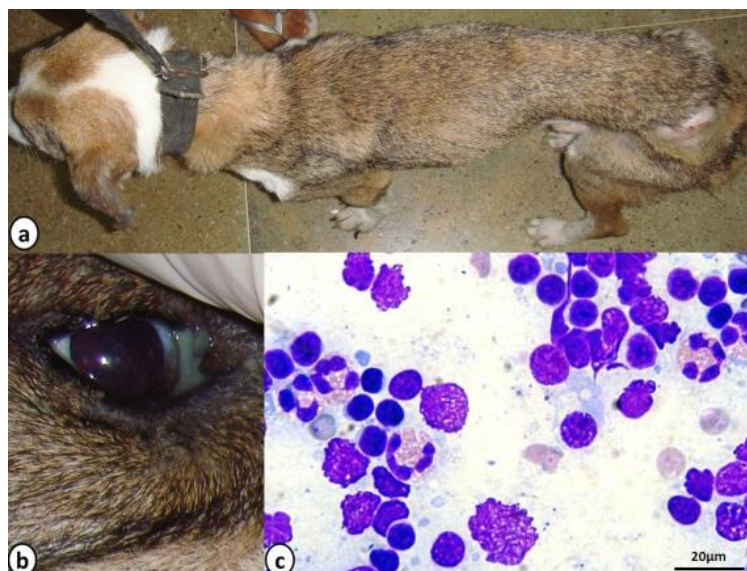


Figura 1. Aspecto clínico e citológico (medula óssea) anterior ao início da terapia. a: estado nutricional caquético (visão dorsal). b: presença de secreção ocular mucopurulenta. c: Fotomicrografia da medula óssea demonstrando infiltração eosinofílica. Coloração: Romanowsky (panótico).

Tabela 1. Contagem relativa e absoluta de eosinófilos durante todo o tratamento do animal.

Dias de tratamento	Eosinófilos	
	Relativo (VR: 2 – 10%)	Absoluto (VR: 120-1800/mm ³)
Dia 0	46	8464
Dia 15	1	192
Dia 57	2	284
Dia 112	60	5280
Dia 175	4	432

VR: valor de referência.

Em virtude dos achados clínico-laboratoriais, instituiu-se terapia com prednisolona (2mg/kg, a cada 24 horas), omeprazol (1mg/kg, a cada 24 horas), ambos por via oral, além de solução oftálmica a base de prednisona a 0,12% (uma gota em cada olho, a cada quatro horas) e ectoparasiticida composto por fipronil, metopreno e amitraz (uma aplicação, a cada 30 dias).

Transcorridos 15 dias de tratamento o animal foi reavaliado. O mesmo apresentava melhora na intolerância ao exercício e no prurido, além de ausência da sintomatologia gastroentérica e com regressão linfonodal. Na auscultação cardíaca as bulhas estavam normoritmicas. Ainda persistia o estado de caquexia, atrofia da musculatura frontal e temporal e oftalmopatia. Nesse momento, a hematologia revelou redução considerável na contagem de eosinófilos, enquadrando-se nos valores de referência (Tabela 1), assim como a contagem de eosinófilos intramedular. Houve remissão da alteração na bioquímica sérica. Como ocorreu retrocesso significativo da sintomatologia clínica-laboratorial, a dose da prednisolona sistêmica foi reduzida gradativamente com o objetivo de encontrar a menor dose sem que houvesse a recorrência dos sintomas e/ou efeitos colaterais da glicocorticoideterapia. Continuou-se a administração dos demais medicamentos prescritos. O animal foi acompanhado periodicamente, onde o mesmo era submetido à avaliação física e coletadas amostras para monitoramento da quantidade de eosinófilos circulantes e na medula óssea. Entretanto, transcorridos 112 dias da terapia, o paciente retornou a manifestar eosinofilia, tanto sistêmica (Tabela 1), quanto no interior do compartimento ósseo, substituindo a prednisolona pelo deflazacort (0,3mg/kg, a cada 24 horas). Esse último anti-inflamatório esteroideal teve sua posologia posteriormente reduzida, de modo paulatino. Após 63 dias do

início da administração do deflazacort (o que correspondeu ao 175º dia, desde o princípio de todo o tratamento esteroidal), o cão possuía normalidade dos parâmetros vitais, ausência de alterações na semiologia dos diversos sistemas orgânicos, estado nutricional normal (Figura 2), com os índices de eosinófilos circulantes nos limites de referência (Tabela 1) e regularidade no padrão dos constituintes celulares da medula óssea (Figura 2). Assim, estabeleceu-se uma dose de manutenção para o deflazacort (0,1mg/kg, a cada 48 horas, até novas recomendações), sem a utilização de qualquer outro medicamento.

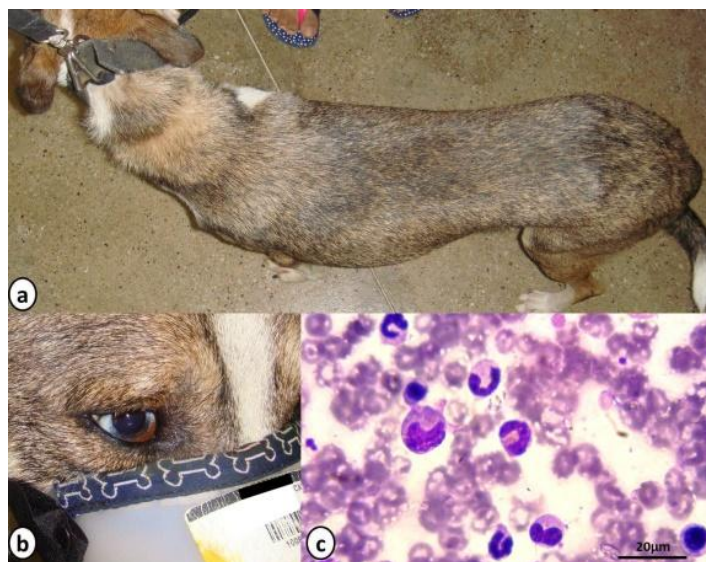


Figura 2. Aspecto clínico e citológico (medula óssea) posterior ao início da terapia. a: estado nutricional normal (visão dorsal). b: ausência de secreção ocular mucopurulenta. c: Fotomicrografia da medula óssea demonstrando normalidade. Coloração: Romanowsky (panótico).

Devido à resposta clínica e laboratorial do animal ao tratamento instituído e descartada a ocorrência de outras causas de eosinofilia, definiu-se o diagnóstico definitivo de SHI.

DISCUSSÃO

Os cães da raça rottweiler são, de acordo com a literatura, os de maior predisposição a desenvolver a SHI, juntamente com os pastores alemães, uma vez que ambos apresentam respostas eosinofílicas exageradas após estimulação normal (4). Tal citação difere do animal relato, uma vez que o mesmo não possuía padrão racial definido embora com propensão para o distúrbio. As descrições para a SHI canina são verificadas no exterior (1,4,7) e em regiões mais desenvolvidas do Brasil (3,8), o que não ocorre nas unidades federativas nordestinas do País, como foi constatado no caso em questão.

Os sinais clínicos variam de acordo com a localização da concentração dos eosinófilos, porém existem achados que são comumente citados na literatura como eosinofilia periférica persistente, caquexia, dispneia, arritmia, uveíte e linfonomegalia generalizada (1,3,6). Toda essa sintomatologia foi condizente com o paciente descrito. Tais sinais clínicos observados foram justificados devido à possível maciça infiltração tecidual de eosinófilos e consequente liberação de seus produtos.

Os mecanismos exatos para a síntese eosinofílica excessiva ainda são desconhecidos, mas sabe-se que a interleucina-3, interleucina-5 e o fator estimulante de colônia de granulócitos possuem receptores específicos nos eosinófilos e podem inibir a apoptose destes (4). Logo, ocorre lesão orgânica com liberação local do conteúdo tóxico dos grânulos das células eosinofílicas, incluindo proteínas catiônicas, radicais livres de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias e mediadores derivados do ácido araquidônico. A gravidade não parece ter

relação direta com a eosinofilia no sangue periférico, mas com o número de eosinófilos em degranulação nos tecidos (6). Essa afirmação poderia explicar a permanência da caquexia e da afecção ocular mesmo após o início do tratamento, em detrimento da remissão considerável dos outros achados clínico-laboratoriais.

O diagnóstico diferencial da SHI envolve diversas patologias relacionadas com eosinofilia periférica e persistente e que devem ser descartadas antes de confirmar o diagnóstico da síndrome (6). A dirofilariose foi uma enfermidade a ser considerada, pois além de ocasionar eosinofilia, esta doença parasitária já foi descrita na região de origem do cão em discussão (9). A leucemia eosinofílica é outra afecção que deve ser apontada no diagnóstico diferencial para SHI, pois apresenta grande número de eosinófilos imaturos no sangue periférico ou medula óssea, além de atipia nas células, com aspecto neoplásico. Já na SHI, há uma acentuada hiperplasia do componente eosinofílico, mas com ausência de anormalidades morfológicas nas células da medula óssea, inexistência de eosinófilos imaturos circulantes e resposta ao corticoide, auxiliando assim no diagnóstico diferencial de quadros leucêmicos (6). Logo, os achados obtidos na aspiração medular do canino em evidência, em associação ao satisfatório êxito terapêutico, foram essenciais para a detecção da SHI e exclusão da leucemia eosinofílica. Outra doença que deve se especular quando se depara com cães exibindo eosinofilia e anemia normocítica normocrômica, em associação a manifestação clínica de caquexia, onicogribose, secreção ocular e linfadenomegalia generalizada, é a leishmaniose visceral, a qual é endêmica na área geográfica em que o cão discutido estava situado (10). As endoparasitoses crônicas com baixos números de agentes intestinais não estão geralmente associadas com o número de eosinófilos circulantes elevados, exceto se o hospedeiro apresentar representantes dos gêneros *Ascaris* ou *Taenia* migrantes. Porém quando ocorre, a eosinofilia normalmente tem um curto período de tempo (4). Essa descrição foi incompatível para o animal em questão, uma vez que havia sido vermifugado recentemente. A eosinofilia pode também ser reconhecida em alguns cães com ectoparasitas, causando uma reação alérgica (2). Apesar da presença de carrapatos no animal em evidência, os mesmos foram eliminados por produto específico, descartando a relação da ectoparasitofauna com a eosinofilia constatada.

Cães com a SHI têm demonstrado envolvimento de algumas estruturas, como medula óssea, linfonodos, trato gastrointestinal, baço, pulmão, pele, fígado e coração (7,11,12). Os eosinófilos possuem uma grande capacidade de destruição tecidual, ocasionando injúrias em múltiplas vísceras. Proteínas dos grânulos de eosinófilos são citotóxicas e desencadeiam a degranulação dos mastócitos, incitam trombose e produzem grandes quantidades de leucotrienos (1,4). Assim, uma intensa infiltração de eosinófilos no parênquima hepático e cardiopulmonar do animal relatado poderia justificar o aumento sérico da alanina aminotransferase, sinais de intolerância ao exercício e arritmia a auscultação. A posterior normalidade provavelmente deveu-se a redução gradativa de eosinófilos no fígado, coração e pulmão, mediante a instituição da corticoideterapia.

O objetivo principal da terapêutica da SHI é o controle do número de eosinófilos para prevenir a progressão das lesões orgânicas (6). Logo, fármacos que possuam efeito sobre a produção de eosinófilos ou bloqueio da sua atividade, devem ser prescritos. Os medicamentos mais utilizados são os glicocorticoides. Esses são recomendados em humanos que apresentam a SHI, podendo ser utilizados de forma intermitente e em curto período de tempo (4). Contudo, a principal modalidade terapêutica é a contínua, com boa resposta na maioria dos pacientes humanos e também em animais (1). Tal citação justificou a remissão de alguns sinais clínicos no animal do presente relato já na primeira quinzena do tratamento. Este resultado foi semelhante ao observado por outros autores, ao tratar um cão da raça rottweiler acometido por SHI, utilizando-se a prednisona, com remissão dos sintomas após 21 dias (1).

Uma das hipóteses para a posterior ausência de efeito terapêutico da prednisolona no paciente em discussão possivelmente decorreu-se ao desenvolvimento do mecanismo de

taquifilaxia (ou seja, diminuição do efeito do fármaco). Essa situação conduziu a permuta do tipo de glicocorticoide, tendo-se optado pelo deflazacort. Este é um análogo da prednisolona, que é convertido em um metabólito com êxito esteroideal semelhante, porém com menor ação no metabolismo dos carboidratos e os ossos (13). Assim, é considerado como um novo corticosteroide, com a mesma eficácia terapêutica de velhas formulações hormonais, tendo a vantagem de apresentar menos efeitos indesejáveis, mas com potente ação anti-inflamatória (14). A utilização deste último fármaco foi extremamente benéfica, pois, além de reestabelecer o controle da eosinofilia, permitiu ao cão atingir o seu peso corpóreo ideal. Provavelmente o deflazacort suprimiu uma presumível inflamação crônica intestinal, o que favoreceu uma melhor absorção de nutrientes e posterior ganho de massa corporal. Quando os pacientes não têm resultados adequados com os glicocorticoides, utilizam-se como outras opções terapêuticas, a hidroxiureia, sulfato de vincristina, interferon alfa ou ciclosporina (8), o que não foi necessário no caso referido.

CONCLUSÃO

É importante a inclusão da SHI no diagnóstico diferencial das causas de eosinofilias crônicas na espécie canina, principalmente no semiárido nordestino, onde, geralmente, associa-se de imediato a alteração hematológica com doenças infecciosas e/ou parasitárias. Embora a SHI seja uma afecção rara, deve-se atentar para a sua ocorrência, independente do padrão racial do cão acometido ou de sua região de origem. O uso coerente do deflazacort pode despontar como um fármaco promissor para o controle da síndrome.

REFERÊNCIAS

1. Sykes JE, Weiss DJ, Buoen LC, Blauvelt MM, Hayden DW. Idiopathic hypereosinophilic syndrome in 3 Rottweilers. *J Vet Intern Med.* 2001;15:162-6.
2. Lilliehöök I, Tvedten H. Investigation of hypereosinophilia and potential treatments. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003;33:1359-78.
3. Figuera RA, de Souza TM, Kommers G, de Barros CSL. Síndrome hipereosinofílica idiopática associada à doença eosinofílica disseminada em um cão. *Cienc Rural.* 2004;34:939-42.
4. James FE, Mansfield CS. Clinical remission of idiopathic hypereosinophilic syndrome in a Rottweiler. *Aust Vet J.* 2009;87:330-3.
5. Takeuchi Y, Matsuura S, Fujino Y, Nakajima M, Takahashi M, Nakashima K, et al. Hyperosinophilic syndrome in two cats. *J Vet Med Sci.* 2008;70:1085-9.
6. Ronchi-Júnior I, Krebs CNV, Pietrovicz J, Nocera VB, Pedri LE, Fouani MM, et al. Síndrome hipereosinofílica idiopática. Relato de caso e revisão de literatura. *Rev Bras Clin Med.* 2010;8:177-82.
7. Perkins MC, Watson ADJ. Successful treatment of hypereosinophilic syndrome in a dog. *Aust Vet J.* 2001;79:686-9.
8. Godoy AV, Capua MLB, Calazans SG, Coleta FED, Miotto MR, Nakage APM, et al. Síndrome hipereosinofílica em rottweiler com linfoma multicêntrico: relato de caso. In: *Anais do Congresso Brasileiro da Anclivepa; 2008; Maceió. Maceió: Anclivepa; 2008.*

9. Suassuana ACD, De Paula VV, Feijó FMC. Ocorrência de cães parasitados por *Dirofilaria immitis* em Mossoró-RN. *Rev Bras Med Vet.* 2003;25:210-3.
10. Leite AI, Araújo LB. Leishmaniose visceral: aspecto epidemiológico relacionados aos óbitos em Mossoró-RN. *Rev Patol Trop.* 2013;42:301-8.
11. Ogbogu PU, Rosing DR, Horne MK. Cardiovascular manifestations of hypereosinophilic syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007;27:457-75.
12. Harris BJ, Constantino-Casas F, Archer J, Herrtage ME. Loeffler's endocarditis and bicavity eosinophilic effusions in a dog with visceral mast cell tumour and hypereosinophilia. *J Comp Pathol.* 2013;149:429-33.
13. Romanholi DJPC, Salgado LR. Síndrome de cushing exógena e retirada de glicocorticoides. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51:1280-92.
14. Sirimarco MT, Zucoloto S, Aprille F. Estudo comparativo dos efeitos de dois corticosteróides sintéticos, deflazacort e prednisona, na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos. *Rev Bras Coloproctol.* 2001;21:167-95.

Recebido em: 20/07/2015

Aceito em: 06/10/2016

ECONOMICAL EVALUATION OF RACTOPAMINE INCLUSION IN DIETS OF FINISHING GILTS

Pedro Henrique Watanabe¹
Maria Cristina Thomaz²
Leonardo Augusto Fonseca Pascoal³
Everton Daniel⁴
Alessandro Borges Amorim⁵
Emanuela Lima Oliveira⁶

ABSTRACT

The use of adrenergic agonists such as ractopamine leads to lean carcasses due to an increase in muscle deposition. The effects of ractopamine on performance and carcass traits in pigs may be varied depending on the level of agonist and amino acids, especially lysine, on diet, sex and age of the animals at the beginning of the additive supply. These factors, as well as the feed cost and the adoption or not the carcass classification influence the economic viability of the use of ractopamine. The economic analysis, therefore, is necessary to evaluate the feasibility of ractopamine inclusion in diets of finishing gilts. This study aimed to evaluate the addition of ractopamine at 0, 5, 10 and 15 mg/kg of diets for gilts slaughtered with 110 kg, on feed cost, gross and net incomes, considering or not the carcass rewarding. A total of 468 gilts were used and fed for 28 days. There was an increase in feed cost and linear decrease in net income without carcass rewarding with raising level of additive. For net income with carcass rewarding, there was a linear effect with higher income for the level of 15 mg/kg. Considering the carcass classification, the inclusion of ractopamine at the level of 15 mg/kg promotes higher income.

Keywords: β -adrenergic agonist, cost, economic evaluation.

AVALIAÇÃO ECONÔMICA DA INCLUSÃO DE RACTOPAMINA EM DIETAS PARA FÊMEAS SUÍNAS EM FASE DE TERMINAÇÃO

RESUMO

A utilização de agonistas β adrenérgicos, tais como a ractopamina, leva a melhorias na carcaça devido ao aumento na deposição muscular. Os efeitos da ractopamina no desempenho e nas características de carcaça em suínos podem ser variáveis, dependendo do nível do agonista e de aminoácidos, especialmente de lisina, na dieta, sexo e idade dos animais no início do fornecimento do aditivo. Esses fatores, bem como o custo da alimentação e a adoção ou não da tipificação das carcaças influenciam a viabilidade econômica do uso da ractopamina. A análise econômica, portanto, é necessária para avaliar a viabilidade de inclusão de ractopamina em dietas para leitoas em terminação. Objetivou-se avaliar a adição de ractopamina em 0, 5, 10 e 15 mg/kg de ração para suínos fêmeas abatidas com 110 kg, quanto aos custos com alimentação, receitas bruta e líquidas, considerando ou não a bonificação de carcaças. Foram utilizadas 468 fêmeas suínas, alimentadas durante 28 dias.

¹ Professor do Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará. Correspondência.

² Professora do Departamento de Zootecnia, FCAVJ - Unesp – Jaboticabal.

³ Professor do Departamento de Agropecuária – DAP, Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias - CCHSA-UFPB.

⁴ Doutorando em Zootecnia, FCAVJ - Unesp – Jaboticabal.

⁵ Professor adjunto do Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas - ICAT/CUR da Universidade Federal de Mato Grosso.

⁶ Professora do Curso de Medicina Veterinária. Universidade Estácio de Sá - Campus Vargem Pequena – RJ.

Observou-se aumento nos custos com alimentação e redução linear na receita líquida sem bonificação, com a elevação do nível do aditivo. Para a receita líquida com bonificação, verificou-se efeito linear com maior receita para o nível de 15 mg/kg. Considerando a bonificação de carcaças, a inclusão de ractopamina ao nível de 15 mg/kg promove maior receita.

Palavras-chave: β -agonista adrenérgico, custo, avaliação econômica.

EVALUACIÓN ECONÓMICA DE INCLUSIÓN DE RACTOPAMINA EN DIETAS PARA HEMBRAS PORCINAS EN FASE DE ENGORDA

RESUMEN

El uso de agonistas beta-adrenérgicos como la ractopamina, conduce a mejoras en la res muerta debido al aumento en la deposición muscular. Los efectos de la ractopamina en el rendimiento y características de la res muerta en cerdos se pueden variar dependiendo del nivel de agonista y los aminoácidos, especialmente lisina, en la dieta, en el sexo y la edad de los animales al comienzo del suministro del aditivo. Estos factores, así como el costo de la alimentación y la adopción o no de la clasificación de las res muertas influyen en la viabilidad económica del uso de la ractopamina. La análisis económica, por lo tanto es necesario para evaluar la viabilidad de inclusión de ractopamina en dietas para cerdas en engorda. El objetivo fue evaluar la adición de ractopamina en 0, 5, 10 y 15 mg/kg de dieta para las cerdas sacrificadas con 110 kg, considerando los costos de la alimentación, ingresos brutos y netos, teniendo en cuenta o no la bonificación de las canales. Se utilizó un total de 468 cerdas alimentadas durante 28 días. Hubo un aumento en los costos de la alimentación y disminución lineal en el ingreso neto sin bonificación, con el aumento del nivel de aditivo. Para el ingreso neto con bonificación, hubo un efecto lineal con mayores ingresos en el nivel de 15 mg/kg. Teniendo en cuenta la bonificación de las res muerta, la inclusión de la ractopamina en 15 mg/kg promueve mayores ingresos.

Palabras clave: β - agonista adrenérgico, costo, evaluación económica.

In the past, the main strategy of pig producers to improve income per animal was obtained by promoting higher feed intake, aiming at higher slaughter weight in the shortest time. However, with the implementation of carcass classification by pork industry, the best rewarding nowadays is based on payment per carcasses that presents higher lean meat yield.

Therefore, the use of β -adrenergic agonists such as ractopamine leads to lean carcasses due to an increase in muscle deposition. Several studies prove the effectiveness of ractopamine in enhancing carcass characteristics of pigs (1), as well as performance parameters (2), although less evident.

The effects of ractopamine on performance and carcass traits in pigs can be variable, depending on the levels of the agonist in diet, besides the lysine and other amino acids in the diet, sex and age of the animals at the additive inclusion. Thus, the feasibility of ractopamine inclusion can also be varied by the above mentioned, but also by feed cost and carcass rewarding in a classification system. In that context, economic evaluation is necessary to estimate the feasibility of ractopamine inclusion in finishing pig diets.

According to the above, the objective was to evaluate the feed cost and gross and net incomes of finishing gilts fed increasing levels of ractopamine, considering or not the rewarding in a carcass classification system.

To evaluate the economical feasibility of ractopamine inclusion in diets for finishing gilts, data of performance and carcass characteristics of 468 animals from 84.77 ± 7.20 kg to 110.59 ± 7.70 kg of weight were used. The pigs were distributed in a randomized block design with 4 treatments, 9 replicates and 13 animals per experimental unit. The blocks were formed by using the initial weight of the animals in each pen. The treatments consisted of increasing levels of ractopamine in diets (0, 5, 10 and 15 mg/kg) in replacement to kaolin. The diets were formulated to meet minimal nutritional and energy requirements, as indicated by Rostagno et al. (3), considering an energy concentration of 3,230 kcal EM/kg of diet, 16.20% of crude protein and 1.10% of digestible lysine for gilts with a high potential for lean deposition. A digestible lysine content of 1.10% was established due to the higher demand of this amino acid when ractopamine is added to diets (4), and the proportions of other amino acids were maintained based on ideal protein concept (3).

The cost of each experimental diet was determined based on the following ingredients prices on August of 2015, as follow: R\$0.63/kg of corn, R\$1.63R\$/kg of soybean meal, R\$2.88/kg of dicalcium phosphate, R\$0.22/kg of limestone, R\$0.20/kg of salt, R\$8.53/kg of L-lysine.HCl, R\$14.21/kg of DL-methionine, R\$14.07/kg of L-threonine, R\$17.02/kg of L-tryptophan, R\$9.66/kg of vitamin and mineral supplement, R\$0.10/kg of kaolin and R\$17.00/kg of ractopamine.

Feeding cost was calculated by the feed intake of the animals at each pen, during the experimental period and the cost of each experimental diet. The values of lean meat percentage (%LM) and carcass weight (CW) were used to obtain the carcass rewarding index (CRI), considering it as a correction factor of carcass value, as mentioned by Fávero et al. (5).

The value received per pig, in Brazilian Real (R\$), was determined on two situations, considering or not the carcass rewarding, as follows:

Final pig value without rewarding = price per kg of pig x pig weight

Final pig value with rewarding = [CRI x (price per kg of pig/ 0.7236)] x CW

The initial value of pig (R\$ per pig at 85kg) was determined considering the pig weight in the beginning of experimental period and the price per kg of pig. The initial and final values of animals and feeding cost had been used to calculate the gross and net incomes, considering or not the carcass rewarding, in Brazilian Real (R\$), as following:

Gross income = Final pig value – Initial pig value at 85kg

Net income = Gross income – feeding cost

The data obtained after error distribution checking (Cramer Von-Mises test at 5%, according to Everitt (6), were submitted to statistical analysis, using the PROC GLM from the SAS software (1998), performing multiple linear regressions up to the third degree.

No differences were found among treatments on gross income with or without bonification (Table 1).

However, the ractopamine levels in diets promoted linear increase on feeding cost ($Y = 61.2053 + 0,5117X$, $R^2 = 0.8053$), carcass rewarding index ($Y = 1.1099 + 0.0005 X$, $R^2 = 0.8912$), and consequently a reduction on net income without carcass rewarding ($Y = 101.0236 - 0.9152X$, $R^2 = 0.7895$). For the net income taking into account the carcass rewarding, a linear trend was found ($Y = 101.5505 + 4.0326X$, $R^2 = 0.9033$), and the highest value was found with the ractopamine level of 15 mg/kg in diet. In a technical-economical simulation of ractopamine inclusion in finishing pig diet, Brumatti and Kiefer (7) reported maximum profit at the levels 10 and 12 mg of ractopamine/kg, considering a revenue system per body weight and per carcass reward, respectively. Cantarelli et al. (8) also observed a greater net income with carcass rewarding, although ractopamine inclusion in finishing barrow diets promoted an enhancing on feeding cost.

Table 1. Feed cost, feeding cost, carcass rewarding index, gross and net incomes with or without carcass rewarding of gilts fed increasing levels of ractopamine from 85 to 110 kg.

Parameters	Ractopamine levels, mg/kg				CV ⁵ %	Effect	P- value
	0	5	10	15			
Feed cost (R\$/kg of diet)	0.967	0.975	0.983	0.991	-	-	-
Feeding cost (R\$/animal)	61.76	62.07	62.91	63.18	9.18	Linear	<0.0011
Carcass rewarding index	1.114	1.115	1.120	1.121	7.24	Linear	0.0030
GI ¹ , R\$	161.52	160.92	162.87	159.52	20.33	-	0.7358
GICR ² , R\$	166.39	171.98	178.82	179.25	14.56	-	0.9787
NI ³ , R\$	99.76	98.85	99.96	96,34	15.43	Linear	<0.0001
NICR ⁴ , R\$	104.63	109.91	115.91	114.07	13.11	Linear	<0.0001

¹Gross income without carcass rewarding; ²Gross income considering carcass rewarding; ³Net income without carcass rewarding; ⁴Net income considering carcass rewarding; ⁵Coefficient of variation.

Regarding the high price of ractopamine, the reduction in feed intake and the improvement in feed conversion when the additive was included (data not shown) were not enough to justify the inclusion of this agonist. In the same way, a study to assess the economic efficiency of ractopamine in diet up to the level of 10 mg/kg, Bridi et al. (9) reported an increase in the average cost of diet per kilogram of weight gain, resulting also in reduction on economic efficiency, indicating that the use of this adrenergic agonist cannot be justified only by the performance of animals. Reese and Bitney (10) stated previously that the viability of ractopamine usage in pig diets should not be based only on the best feed efficiency or higher daily gain, requiring a consistent carcass classification system, which reward economically the production of leaner carcasses.

Schinckel et al. (11) also reported that the economic viability of ractopamine addition in pig diets is related to several factors, the most important one is lean meat content in relation to carcass fat. Although the criteria adopted in carcass classification may vary, measurements of fat and loin depths, ranging on the location and number of measures taken, including or not the carcass weight as a predictor (12) are generally used. Thus, the variation in carcass classification could outline the ractopamine concentration in the diets of finishing pigs.

Reese and Bitney (10) evaluated the addition of increasing levels of ractopamine in finishing pig diets on the income obtained per pig slaughtered, reported that the addition of 9 mg/kg has promoted greater reduction in backfat thickness, although the addition of 4.5 mg/kg was more economically feasible when the carcass classification was based on measurements over the loin. In the present work, concerning the parameters used for carcass classification, the highest net income was achieved by the level of 15 mg/kg of ractopamine, demonstrating the importance of combination among lower feed intake, lower feed cost, and mainly the best carcass classification index.

We concluded that the addition of ractopamine in gilt diets slaughtered at 110 kg, may be feasible when a carcass classification system is adopted and in this situation, the highest ractopamine level of 15 mg/kg promoted higher net income.

REFERENCES

1. See MT, Armstrong TA, Weldon WC. Effect of a ractopamine feeding program on growth performance and carcass composition in finishing pigs. *J Anim Sci.* 2004;82:2474-80.

2. Marinho PC, Fontes DO, Silva FCO, Silva MA, Pereira FA, Arouca CLC. Efeito dos níveis de lisina digestível e da ractopamina sobre o desempenho e as características de carcaça de suínos machos castrados em terminação. *Rev Bras Zootec*. 2007;36:1791-8.
3. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: Imprensa Universitária/UFV; 2005.
4. Xiao RJ, Xu ZR, Chen HL. Effects of ractopamine at different dietary protein levels on growth performance and carcass characteristics in finishing pigs. *Anim Feed Sci Technol*. 1999;79:119-27.
5. Fávero JA, Guidoni AL, Bellaver C. Predição do índice de valorização de carcaças suínas em função do peso e do percentual de carne. In: Anais do 8o Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos; 1997; Concórdia. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA; 1997. p.405-6.
6. Everitt BS. *The Cambridge dictionary of statistics*. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
7. Brumatti RC, Kiefer C. Simulação técnico-econômica da inclusão de ractopamina em dietas de suínos em terminação. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010;62:163-71.
8. Cantarelli VS, Fialho ET, Almeida EC, Zangeronimo MG, Amaral NO, Lima JAF. Características da carcaça e viabilidade econômica do uso de cloridrato de ractopamina para suínos em terminação com alimentação à vontade ou restrita. *Cienc Rural*. 2009;39:844-51.
9. Bridi AM, Oliveira AR, Fonseca NA, Coutinho LL, Hoshi EH, Borosky JC, et al. Efeito da ractopamina e do gênero no desempenho e na carcaça de suínos de diferentes genótipos halotano. *Semina Cienc Agrar*. 2008;29:713-22.
10. Reese D, Bitney LL. Economic value of ractopamine for finishing pigs. *Nebraska Swine Rep* [Internet]. 2001 [cited 2008 Dec 05]. Available from: http://digitalcommons.unl.edu/coopext_swine/101.
11. Schinckel AP, Richert BT, Herr CT, Einstein ME, Kendall DC. Efeitos da ractopamina sobre o crescimento, a composição da carcaça e a qualidade dos suínos. In: Anais da 2a Conferência Internacional Virtual Sobre Qualidade de Carne Suína; 2001; Concórdia. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA; 2001. p.339-50.
12. Fávero JA, Guidoni AL. Normatização e padronização da tipificação de carcaças de suínos no Brasil: aspectos positivos e restrições. In: Anais da 2a Conferência Internacional Virtual Sobre Qualidade de Carne Suína; 2001; Concórdia. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 2001. p.73-9.

Recebido em: 20/05/2015

Aceito em: 15/08/2016

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS PARA O *Vírus da diarreia viral bovina*,
Herpesvírus bovino Tipo 1 E *Vírus da leucose enzoótica bovina* EM BÚFALOS DE
ÁGUA DA ILHA DE MARAJÓ**

Daniel Stangarlin de Camargo³
Jane Cecília Silveira de Matos³
Alexandra Ariadine Bittencourt Gonçalves³
Érika Dayane Leal Rodrigues³
Sandro Patroca da Silva¹
Livia Medeiros Neves Casseb¹
Helio Langoni²
Andréa Maria Góes Negrão³
Alexandre do Rosário Casseb³

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência de anticorpos em um rebanho de búfalos de rio da Ilha de Marajó para os vírus: *Vírus da diarreia viral bovina*, *Herpesvírus bovino tipo 1* e *Vírus da leucose enzoótica bovina*. A técnica de soroneutralização foi utilizada para detecção de anticorpos referentes aos *Vírus da diarreia viral bovina* e *Herpesvírus bovino tipo 1* e o teste de imunodifusão em gel de ágar para detecção de anticorpos para o *Vírus da leucose enzoótica bovina*. A prevalência de anticorpos para o *Herpesvírus bovino tipo 1* em bubalinos está muito próxima da prevalência observada em bovinos. O *Vírus da diarreia viral bovina* apresentou prevalência de anticorpos muito abaixo da média quando comparada com prevalência de anticorpos em bovinos e bubalinos, inclusive criados no Brasil. O *Vírus da leucose enzoótica bovina* mostrou prevalência de anticorpos muito baixa, porém, próxima dos parâmetros observados em búfalos no Brasil e no mundo, que divergem da prevalência observada em bovinos, mostrando provavelmente uma resistência natural dessa espécie ao vírus, fator esse que precisa ser mais bem elucidado.

Palavras-chave: *vírus da diarreia viral bovina*, *Herpesvírus bovino tipo 1*, *vírus da leucose enzoótica bovina*, *Bubalus bubalis*.

PREVALENCE OF *Bovine Viral Diarrhoea Virus*, *Bovine Herpesvirus 1* and *Bovine Leucosis Virus* ANTIBODIES IN RIVER BUFFALOES FROM MARAJÓ ISLAND

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antibodies prevalence of *Bovine viral diarrhoea virus*, *Bovine herpesvirus 1* and *Bovine leukemia virus* in a herd of river buffaloes from the Marajó Island. The serum neutralization technique was used for the detection of *Bovine viral diarrhoea virus* and *Bovine herpesvirus 1* antibodies. The agar gel immunodiffusion (AGID) was used for the detection of *Bovine leukemia virus* antibodies. The prevalence of antibody to the *Bovine herpesvirus 1* in buffaloes is very similar to the observed in cattle. The *Bovine viral diarrhoea virus* showed a below average prevalence whether compared to the antibodies prevalence in cattle and buffaloes created in other parts of Brazil. The *Bovine leukemia virus*

¹ Instituto Evandro Chagas.

² Universidade Estadual Paulista.

³ Universidade Federal Rural da Amazônia. Correspondência.

showed a very low prevalence of antibodies, however, these parameters were similar to others observed in buffaloes in Brazil and worldwide. These parameters differ from the prevalence observed in cattle, which probably suggests a natural resistance from this specie to the virus. This fact, however, needs to be further elucidated.

Keywords: *bovine viral diarrhoea virus, Bovine herpesvirus 1, bovine leukemia virus, Bubalus bubalis.*

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS PARA EL Vírus de la diarrea viral bovina, Herpesvírus bovino Tipo 1 Y Vírus de la leucosis enzoótica bovina EN BÚFALOS DE RIO DE LA ISLA DE MARAJÓ

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de anticuerpos en una manada de búfalos de río en la Isla de Marajó en busca de virus: Virus de la Diarrea Viral Bovina, Bovino Herpesvirus tipo 1 del Virus y la leucosis bovina enzoótica. La técnica de neutralización se utilizó para detectar anticuerpos relacionados con el virus de la diarrea viral bovina y virus del herpes bovino tipo 1 y la prueba de inmunodifusión en gel de agar para la detección de anticuerpos contra el virus de la leucosis bovina enzoótica. La prevalencia de anticuerpos contra el virus del herpes bovino tipo 1 en los búfalos está muy cerca de la prevalencia observada en el ganado bovino. La prevalencia de anticuerpos viral bovina virus de la diarrea mostró muy por debajo de la media en comparación con la prevalencia de anticuerpos en el ganado bovino y búfalos, también creado en el Brasil. La prevalencia del virus de la leucosis bovina enzoótica mostró, sin embargo, cerca del rango observado en búfalos en Brasil y en todo el mundo, que divergen de la prevalencia observada en los anticuerpos de ganado muy bajo, probablemente mostrando una resistencia natural al virus de este tipo, este factor debe ser mejor dilucidado.

Palabras clave: *bovina virus de la diarrea viral, virus del herpes bovino tipo 1, virus de la leucosis bovina enzoótica, Bubalus bubalis.*

INTRODUÇÃO

O Vírus da diarrea viral bovina (BVDV) há tempos é descrito como um dos principais patógenos de bovinos pelas perdas significativas à bovinocultura de corte e leite, justificando sua importância de âmbito mundial; o vírus pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* com existência dos biotipos citopático e não citopático, de acordo com o efeito da replicação do mesmo em cultivo celular sendo o diagnóstico laboratorial realizado principalmente, por meio de testes sorológicos (1).

O *Herpesvírus bovino tipo 1* (BHV-1) tem distribuição ampla, estando presente em quase todos os países de bovinocultura expressiva. O vírus foi isolado pela primeira vez no ano de 1956 e, desde então, tem sido descrito em vários países. É um importante patógeno que provoca alterações nos sistemas respiratório e reprodutivo de bovinos. A infecção está associada a um grande número de manifestações clínicas, genericamente conhecidas por Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina. Como os demais membros da família *Herpesviridae*, tem a característica de ficar latente no organismo hospedeiro (2).

O Vírus da leucose enzoótica bovina (BLV) está classificado na família *Retroviridae*, gênero *Deltaretrovirus* e causa em bovinos, principal fonte de infecção, linfocitose persistente

e linfossarcoma. O controle é difícil devido sua grande disseminação e grande número de animais assintomáticos, mas pode ser feito pela detecção e eliminação de animais sorologicamente positivos (3).

Como foi descrito os vírus BVDV, BHV-1 e BLV são importantes causadores de doença em bovinos, porém, pouco se sabe sobre essas enfermidades em búfalos, por isso o objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência de anticorpos para esses vírus em um rebanho de búfalos de água (*Bubalus bubalis*) da Ilha de Marajó.

Foram coletadas 211 amostras de soro de fêmeas adultas da espécie *Bubalus bubalis*, de diferentes raças de rebanhos, não vacinadas, destinadas à produção de leite, criados em sistema extensivo, provenientes de uma propriedade localizada no município de Salvaterra, na Ilha de Marajó, Estado do Pará, Brasil (00°45'10"S 48°31'01"). O sangue foi coletado por punção da veia jugular, com agulhas descartáveis e sistema de vácuo. O soro foi separado do sangue total por centrifugação a 250 x g, durante 10min e acondicionado em microtubos e posteriormente estocados à temperatura de -20°C até a realização dos testes.

A técnica de soroneutralização foi utilizada para detecção de anticorpos referentes ao BVDV (4) e a técnica de soroneutralização para detecção de anticorpos para o BHV-1 (5). A técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para detecção de anticorpos para BLV foi descrita por Roberts et al. (6).

As prevalências de anticorpos para os vírus estudados estão demonstradas na tabela 1. Foi realizado, por soroneutralização, um estudo em búfalos de água no estado de Minas Gerais, Brasil e com prevalência de anticorpos de 14,7% para o BHV-1 (7), que diverge do resultado encontrado no presente estudo que apresentou alta prevalência de anticorpos para o BHV-1 (57,81%) achado esse semelhante ao encontrado em criações de bovinos no Brasil (8,9,10,11).

Tabela 1. Prevalência de anticorpos para BHV-1, BVDV e BLV em búfalos da Ilha de Marajó, Pará, Brasil.

	BHV-1	BVDV	BLV
Positivos	122 (57,81%)	6 (2,84%)	3 (1,42%)
Negativos	87 (41,23%)	203 (96,20%)	197 (93,36%)
Inespecíficos	2	2	11
Total	211	211	211

Foi encontrada a prevalência de anticorpos para o BVDV em búfalos relativamente alta (23% a 53%) em várias partes do mundo, inclusive no Brasil, porém, no presente estudo a prevalência foi bastante baixa (2.84%) mostrando que no local estudado há uma baixa prevalência de anticorpos para o vírus em búfalos (7,12,13). As diferenças entre as taxas de prevalência encontradas nas diversas regiões do Brasil e do mundo podem ser explicadas considerando-se os diferentes tipos raciais, manejo e a tecnologia empregada na criação (14).

Muitos autores em várias partes do mundo ao pesquisarem a presença de anticorpos em búfalos para o BLV não encontraram positividade (15,16,17,18) ou positividade baixa que não passaram de 2,0% (19,20). Esses autores ressaltam que a ausência de animais positivos para o BLV em amostras de búfalos testadas pode sugerir que a espécie possua uma resistência natural ou que há contatos mais fracos entre bovinos e búfalos, que permitam a transmissão por via biológica ou mecânica. No presente estudo, também, foi encontrada uma baixa prevalência de anticorpos para o BLV (1,42%), sugerindo que os búfalos criados na Ilha de Marajó, também, apresentam pouco contato com o BLV ou resistência natural, entretanto, é interessante realizar um estudo mais profundo na tentativa de isolamento do BLV em

búfalos para determinar a importância desses animais na manutenção do vírus, que parece diferir bastante da doença observada em bovinos.

Os resultados deste trabalho permitem fazer as seguintes conclusões: a prevalência de anticorpos para o BHV-1 em bubalinos está muito próxima da prevalência observada em bovinos, sugerindo uma semelhança quanto a mesma susceptibilidade e exposição das duas populações ao vírus, fator esse preocupante, e que demonstra a grande circulação do BHV-1 na Ilha de Marajó. O BVDV apresentou prevalência de anticorpos muito abaixo da média quando comparada com prevalência de anticorpos em bovinos e bubalinos, inclusive criados no Brasil, porém, não deve ser interpretada como resistência dos bubalinos ao vírus, pois em outras regiões há alta prevalência de anticorpos para o vírus, e, também, não se pode esquecer a possível existência de animais persistentemente infectados, que não são detectados por sorologia e cuja importância não se sabe na criação de búfalos. O BLV mostrou prevalência de anticorpos muito baixa e próximo dos parâmetros observados em búfalos no mundo e no Brasil, que divergem da prevalência observada em bovinos, mostrando provavelmente uma resistência natural dessa espécie ao vírus, fator esse que precisa ser mais bem elucidado.

AGRADECIMENTOS

Ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria, local onde os testes foram realizados e, em especial, ao professor e Editor-Chefe da revista Ciência Rural, o PhD. Rudi Weiblen e às veterinárias: PhD. Letícia Frizzo da Silva e a Dra. Mariana Sá e Silva.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O referido trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Evandro Chagas (IEC), sob o número 054/2009 CEPAN/IEC.

REFERÊNCIAS

1. Ridpath JF. Preventive strategy for BVDV infection in North America. *Jpn J Vet Res.* 2012;60 Suppl:41-9.
2. Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO. Herpesviridae. In: Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO. *Veterinary virology.* 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1993. p.337-68.
3. Coffin JM, Essex M, Gallo R, Graf TM, Hinuma Y, Hunter E, et al. Family retroviridae. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, et al, editors. *Virus taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses;* 1995; Vienna, Austria. Vienna: Springer-Verlag; 1995. p.193-204.
4. Edwards S. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev Sci Tech.* 1990;9(1):115-30.
5. Deregts D, Cho HJ, Kozub GC. A comparative evaluation of two sensitive serum neutralization tests for bovine herpesvirus-1 antibodies. *Can J Vet Res.* 1993;57(1):56-9.

6. Roberts DH, Lucas MH, Swallow C. Comparison of the agar-gel immunodiffusion test and ELISA in the detection of bovine leukosis virus antibody in cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 1989;22(3):275-81.
7. Lage AP, Castro RS, Melo MIV, Aguiar PHP, Barreto Filho JB, Leite RC. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 1996;49(3):195-7.
8. Mueller SBK, Ikuno AA, Machado JS, Lima RMA, Richtzenhain LJ, Taki EM. Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. *Arq Inst Biol São Paulo.* 1981;47(2):55-9.
9. Ravazzolo AP, Dal Pizzol M, Moojen V. Evidência da presença de anticorpos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em bovinos de alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, 1986. *Arq Fac Vet UFRGS.* 1989;17:89-95.
10. Vidor T, Halven DC, Leite TE, Coswig LT. Herpes bovino tipo 1 (BHV-1): I. sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Cienc Rural.* 1995;25(3):421-4.
11. Mineo TWP, Alenius S, Naslund K, Montassier HJ, Bjorkman C. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in brazilian dairy herds with reproductive disorders. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2006;15(4):188-92.
12. Zaghawa A. Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. *Zentralbl Veterinärmed B.* 1998;45(6):345-51.
13. Sudharshana KJ, Suresh KB, Rajasekhar M. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in India. *Rev Sci Tech.* 1999;18(3):667-71.
14. Birgel Jr EH, D'Angelino JL, Benesi FJ, Birgel EH. Prevalência da infecção pelo Vírus da Leucose dos Bovinos em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. *Pesqui Vet Bras.* 1995;15(4):93-9.
15. Hamblin C, Anderson EC, Jago M, Mlengeya T, Hipji K. Antibodies to some pathogenic agents in free-living wild species in Tanzania. *Epidemiol Infect.* 1990;105(3):585-94.
16. Wang CT. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: epidemiological study. *J Vet Med Sci.* 1991;53(3):395-8.
17. Meas S, Ohashi K, Tum S, Chhin M, Te K, Miura K, et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J Vet Med Sci.* 2000;62(7):779-81.
18. Akça Y, Burgu I, Gür S, Bilge Dagalp S. Investigation of occurrence of some virus infection in Buffaloes in Turkey. *Rev Med Vet.* 2004;156(5):268-71.

19. Meas S, Seto J, Sugimoto C, Bakhsh M, Riaz M, Sato T, et al. Infection of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *J Vet Med Sci.* 2000;62(3):329-31.
20. Molnár E, Molnár L, Guedes VT, de Lima ES. Naturally occurring bovine leukosis virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. *Vet Rec.* 2000;46(24):705-6.

Recebido em: 05/12/2014

Aceito em: 28/09/2016

CARACTERÍSTICAS DA CARÇAÇA E QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS TERMINADOS EM SISTEMA DE INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA

Renata Tieko Nassu¹
Rymer Ramiz Tullio²
Sérgio Novita Esteves³
Alberto C.C. Bernardi⁴

RESUMO

Trinta e seis bovinos machos castrados, jovens, da raça Canchim foram criados em sistema de integração lavoura-pecuária (SILP) e terminados em confinamento com alimentos produzidos no sistema. Após o abate dos animais foram avaliadas e discutidas as características da carcaça e da qualidade da carne: peso e comprimento dos cortes dianteiro e traseiro, área de olho-de-lombo, espessura de gordura subcutânea, pH, cor, capacidade de retenção de água, perda por cocção e força de cisalhamento. Os resultados indicaram que o SILP é uma alternativa para a produção de gado de corte e obtenção de carcaça e carne de qualidade.

Palavras-chave: Canchim, características físico-químicas, produção, SILP.

CARCASS AND MEAT QUALITY FROM CATTLE FINISHED IN INTEGRATED CROP-LIVESTOCK SYSTEM

ABSTRACT

Thirty six Canchim steers were raised in an integrated crop-livestock system (ICLS) and finished in a feedlot with feed harvested from the system. After the animals' slaughter the carcasses characteristics and meat quality were evaluated and discussed: weight of primal cuts from the forequarter and hindquarter, rib eye area, subcutaneous fat thickness, meat pH, color, water holding capacity, cooking losses and shear force. The results indicated that the ICLS is an alternative for the production of beef cattle with appropriate quality of carcass and meat.

Keywords: Canchim, physicochemical characteristics, production, ICLS

CARACTERÍSTICAS DE LA CARCASA Y CALIDAD DE LA CARNE DE VACUNOS TERMINADOS EN SISTEMA DE INTEGRACION AGRICULTURA COM GANADERIA

RESUMEN

Treinta y seis bovinos machos castrados, jovens, Canchim fueron creados en el sistema de integración agricultura-ganadería (SIAG) y acabados em régimen de confinamiento con los alimentos producidos en el sistema. Después del sacrificio de los animales fueron evaluados y discutidos las características de la carcasa y calidad de la carne: peso y largo de las secciones traseras y dianteras, área de ojo de lomo, espesor del tocino, pH, color, capacidad de retención de agua, pérdida por cocción y la fuerza de cizallamiento. Los resultados indicaron que lo

¹ Ciência e Tecnologia de Alimentos - Tecnologia de Produtos de Origem Animal. Embrapa Pecuária Sudeste.

² Produção Animal, Bovinocultura de Corte, qualidade da carne. Embrapa Pecuária Sudeste.

³ Nutrição e Alimentação Animal, Bovinocultura de corte. Embrapa Pecuária Sudeste.

⁴ Fertilidade do solo, Agricultura de Precisão. Embrapa Pecuária Sudeste.

SIAG es una alternativa para la producción de ganado de carne con características de la canal y de calidad adecuada.

Palabras clave: Canchim, características físicas y químicas, producción, SIAG.

INTRODUÇÃO

Devido ao custo elevado para a formação e a reforma das pastagens, têm-se buscado diversas técnicas para otimizar o retorno desse investimento. Além da preocupação com os altos custos da atividade, tem merecido atenção a degradação do solo e a forma como ela afeta a sustentabilidade da agropecuária nacional. A rotação de culturas anuais com pastagens, também conhecida como sistema de integração lavoura-pecuária (SILP), tem sido utilizada como uma das alternativas para promover a sustentabilidade, econômica e ecológica, dos sistemas de produção agropecuária (1). De modo geral, com o SILP, há aumento da lotação animal, otimização de maquinário e diversificação da produção, pela obtenção de grãos, além de carne ou leite (1). Deste modo, o SILP é uma alternativa para produção mais sustentável de carne bovina, permitindo a recuperação de pastagens, bem como a utilização do solo para produção de alimentos para animais confinados (2).

Num sistema de produção de bovinos de corte, se faz necessário avaliar, além do ganho de peso dos animais, também as características da carcaça e a qualidade da carne. A presente comunicação traz resultados preliminares de estudo sobre as características da carcaça e a qualidade da carne de animais terminados em confinamento, com alimentos obtidos no próprio sistema.

O estudo foi conduzido no sistema de integração lavoura-pecuária da Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos, SP, utilizando uma área de 21 ha. Foi realizada a renovação anual de 1/3 de uma área de pasto degradado de capim-braquiária (*Urochloa decumbens* cv. Basilisk) utilizando-se o preparo do solo convencional e o cultivo de milho (*Zea mays* L.) var. BRS 2020 e nas entrelinhas foi semeado o capim-marandu (*Urochloa brizantha* - Hochst ex A. Rich.- Stapf cv Marandu), conforme descrito por Bernardi et al. (1). No terceiro ano de renovação 36 bovinos, machos castrados da raça Canchim (5/8 Charolês + 3/8 Zebu) foram introduzidos no sistema e avaliados quanto ao desempenho. Os animais utilizaram as pastagens de maneira rotacionada, conforme a disponibilidade de forragem. Os animais foram terminados em confinamento, utilizando dieta com relação volumoso:concentrado de 50:50 (base da matéria seca) fornecida *ad libitum*. A dieta do confinamento apresentou a seguinte composição: proteína bruta: 10,4%, extrato etéreo: 3,7% e Ca: 0,73%, com 72,8% de digestibilidade total. O manejo da cultura anual e dos animais, bem como as características das dietas estão em Bernardi et al. (1).

As operações de abate foram realizadas em abatedouro industrial com inspeção oficial. Após as etapas de insensibilização, sangria, esfolagem e evisceração, as carcaças foram mantidas à temperatura ambiente durante uma hora, antes do armazenamento em câmara frigorífica a 2°C até que as carcaças atingissem a temperatura de, no máximo, 7°C no interior da massa muscular, conforme preconizado pela legislação brasileira vigente (3). Os pesos de carcaça quente, das subdivisões da carcaça resfriada (traseiro especial, dianteiro com cinco costelas e ponta de agulha), o comprimento e profundidade da carcaça foram obtidos no frigorífico. Do músculo *longissimus dorsi* da meia-carcaça esquerda, cortado entre a 12^a e a 13^a costelas, foram medidas a área de olho de lombo (AOL) e a espessura de gordura externa (EGAOL), e retirados cortes de 2,5 cm de espessura para a análise da qualidade da carne. As amostras foram transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Análise de Carnes da Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos – SP). O pH foi medido na porção muscular do corte com um medidor digital marca Testo R 230, em triplicata. As determinações da cor da carne foram realizadas em triplicata em diferentes pontos do corte e da cor da gordura uma única vez.

Foram avaliadas a luminosidade (L^*), a intensidade da cor vermelha (a^*) e a intensidade da cor amarela (b^*) com colorímetro Hunterlab Miniscan XE Plus, iluminante D65, abertura 10° . Trinta minutos antes das determinações, foi realizado um corte transversal ao músculo, para exposição da mioglobina ao oxigênio. A capacidade de retenção de água (CRA) foi obtida por diferença entre os pesos de uma amostra de carne, de aproximadamente 2 g, antes e depois de ser submetida à pressão de 10 kg, durante 5 minutos. Para perda por cocção (PCC), os cortes de 2,5 cm foram pesados em balança semi-analítica e em seguida, assados em forno pré-aquecido a 180°C , até que a temperatura de 70°C no centro da peça fosse atingida, sendo a temperatura monitorada por termopares. Após o resfriamento das amostras à temperatura ambiente, foram novamente pesadas. As perdas durante o cozimento foram calculadas pela diferença de peso antes e depois da cocção e expressas em porcentagem. Para força de cisalhamento (FC), os mesmos cortes utilizados para obtenção da perda por cocção foram resfriados a 5°C , em refrigerador comercial, por uma noite. Foram retirados oito cilindros, paralelamente ao sentido das fibras musculares, utilizando-se um vazador com 1,27 cm de diâmetro, para determinar a força necessária para cortar transversalmente cada cilindro em texturômetro Texture Analyser TA.XT.plus (Stable Micro Systems Ltd., Vienna Court, UK), acoplado a lâmina Warner-Bratzler com 1,016 mm de espessura com capacidade para 50 kg, utilizando o programa Texture Expert. O texturômetro foi calibrado para: velocidade do teste de 200 mm/min; velocidade pós-teste de 2400 mm/min; distância de 40 mm; peso de calibração de 10 kg. A força máxima foi registrada, para cada cilindro, na curva do programa Texture Expert e as médias dos valores dos cilindros, por carcaça, foram utilizadas. Os dados obtidos foram analisados pelo software XLSTAT (Addinsoft, New York, EUA).

Os animais deste estudo foram abatidos com média de idade de 27 meses, com peso vivo médio de 492,9 kg, resultando, em média, 18,9 % de carcaça com espessura de gordura média de 3,4 cm. Tendo em vista que é preconizado o abate de animais entre 16 a 22 arrobas (240 a 330 kg), os animais produzidos no sistema atenderam esse requisito.

Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros das características da carcaça e da qualidade da carne dos animais produzidos no sistema integração lavoura-pecuária. Valores de pH da carne entre 5,4 e 5,8 são considerados normais para a carne bovina (4,5). Em relação à maciez, a carne destes animais apresentou média de $9,06 \text{ kgf/cm}^2$, superando o limite que separa a carne macia da dura, que é entre 4,5 e $6,0 \text{ kgf/cm}^2$ (6,7). Os fatores como a idade do animal e a cobertura de gordura da carcaça são determinantes sobre a característica de maciez da carne. Os animais deste estudo foram abatidos com média de idade de 27 meses; animais menos jovens apresentam estruturas de colágeno e elastina mais insolúveis proporcionando carnes menos macias. A variação de gordura de cobertura subcutânea variou de 1 a 7 mm, sendo que os frigoríficos exigem que a carcaça tenha no mínimo 3 mm de espessura de gordura na altura da décima segunda costela. A espessura de gordura subcutânea é fundamental no processo de resfriamento da carcaça, pois funciona como isolamento térmico, evitando a perda excessiva de água, e o escurecimento da carne. As carcaças com cobertura de gordura inadequada são mais susceptíveis ao encurtamento das fibras musculares durante o resfriamento (*cold-shortening*). Dessa forma, algumas das carcaças obtidas podem ter apresentado problemas no processo de resfriamento devido à pouca cobertura de gordura. A área de olho-de-lombo (AOL) é outra importante característica de carcaça relacionada à musculabilidade, e é utilizada como indicadora de rendimento dos cortes de alto valor comercial, pois se correlaciona positivamente com a porção comestível da carcaça (5). A perda de peso por cocção indica a capacidade de retenção de água da carne, e os valores foram em média 27,2% ($\pm 2,9$). Os valores de AOL e espessura da gordura foram menores que os apresentados por Rubiano et al. (7), enquanto que os valores de perda por cocção foram maiores para animais do mesmo genético.

A luminosidade e a coloração da carne são relacionadas diretamente com o valor de pH após o resfriamento. No caso deste estudo, em que os valores de pH permaneceram dentro dos

limites ideais, as características de L*, a* e b* foram coerentes. Os valores de a* (variando de 12,5 a 16,8) apresentaram-se mais baixos do que aqueles considerados ideais por Pereira (8), segundo os quais a intensidade de a* deveria situar-se entre 18 e 22. Neste estudo, o valor médio para este parâmetro foi de 14,71. O valor de b* da gordura apresentou-se maior do que valores relatados em animais Canchim terminados em confinamento (9,10). A coloração amarelada da gordura normalmente está associada ao animal produzido no pasto, portanto com maior idade de abate, enquanto a gordura menos pigmentada (branca) está relacionada a animais terminados em confinamento, em que normalmente a fração volumosa da dieta é pobre em pigmentos carotenóides (10).

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da carcaça de animais Canchim (n=36) produzidos no sistema de integração lavoura-pecuária.

Variável	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Peso da carcaça resfriada direita (kg)	141,6	16,4	100,2	169,4
Peso da carcaça resfriada esquerda (kg)	142,2	15,9	100,8	169,6
Peso do traseiro direito (kg)	86,6	10,0	62,7	102,7
Peso do traseiro esquerdo (kg)	87,4	10,0	63,4	103,4
Peso do dianteiro direito (kg)	54,9	6,5	37,5	66,7
Peso do dianteiro esquerdo (kg)	54,8	6,3	37,4	66,2
Peso da ponta de agulha esquerda (kg)	18,4	2,9	13,1	28,0
Comprimento da carcaça (cm)	132,2	4,5	122,4	141,3
Profundidade da carcaça (cm)	41,6	1,8	38,7	47,5
Área de olho de lombo (cm ²)	73,1	9,0	56,2	90,5
Espessura de gordura (mm)	3,4	1,3	1,0	7,0
pH	5,68	0,06	5,56	5,79
Força de cisalhamento (kgf/cm ²)	9,06	1,32	5,87	11,41
Capacidade de retenção de água (%)	83,05	3,43	74,96	91,00
Perda por cocção (%)	27,19	2,92	22,67	34,39
Cor				
L* (carne)	37,40	1,95	32,99	41,79
a* (carne)	14,71	1,14	12,53	16,82
b* (carne)	12,15	1,05	10,02	14,55
L* (gordura)	75,44	2,78	70,72	81,01
a* (gordura)	8,18	2,07	3,66	11,89
b* (gordura)	20,39	2,26	16,32	25,16

L*: luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco); a*: variando de verde (valores negativos) a vermelho (valores positivos); b*: variando de azul (valores negativos) a amarelo (valores positivos)

Os resultados indicaram que o SILP pode ser uma alternativa para produção de bovinos de corte, com características de carcaça e de qualidade adequadas.

REFERÊNCIAS

- Bernardi ACC, Vinholis MMB, Barbosa PF, Esteves SN. Renovação de pastagem e terminação de bovinos jovens em sistema de integração lavoura-pecuária em São Carlos, SP: resultados de 3 anos de avaliações. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste; 2009.
- Bernardi ACC, Esteves SN. Integração lavoura-pecuária aumenta produção de carne. Visão Agric. 2009;9:25-9.

3. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Portaria n.º 304, de 22 de Abril de 1996. Estabelecimentos de abate de bovinos, bubalinos e suínos somente poderão entregar carnes e miúdos para comercialização com temperatura de até 7 (sete) graus centígrados. Diário Oficial da União. 23 Abr 1996. Seção 1, p.6856 [cited 2016 Mar 11]. Available from: www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/.../port%20304.doc.
4. Abularach ML, Rocha CE, Felício PE. Características de qualidade do contra-filé (m. *L. dorsi*) de touros jovens da raça Nelore. Cienc Tecnol Aliment. 1998;18:205-10.
5. Luchiari Filho AA. Pecuária da carne bovina. São Paulo: Embrapa; 2000.
6. Lawrie RA. Ciência da carne. 6a ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.
7. Rubiano GAG, Arrigoni MB, Martins CL, Rodrigues E, Gonçalves HC, Angerami CN. Desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de bovinos superprecoces das raças Canchim, Nelore e seus mestiços. Rev Bras Zootec. 2009;38:2490-8.
8. Pereira ASC. Qualidade da carne de bovinos Nelore (*Bos taurus indicus*) suplementados com vitamina E [dissertação]. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo; 2002.
9. Tullio RR. Estratégias de manejo para produção intensiva de bovinos visando à qualidade da carne [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2004.
10. Fernandes ARM. Eficiência produtiva e características qualitativas da carne de bovinos Canchim terminados em confinamento [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista; 2007.

Recebido em: 08/03/2015
Aceito em: 05/10/2016

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Brucella abortus* EM OVINOS DA REGIÃO MÉDIO-NORTE MATOGROSSENSE

Rafael dos Santos¹
Anderson Augusto Dionisio de Souza²
Silvane Cardoso Gomes¹
Suyane Nayara Garcia Socoloski¹
Bruno Gomes de Castro³

RESUMO

A brucelose é uma importante enfermidade na pecuária nacional. Dentre os agentes causadores desta enfermidade, destaca-se a espécie *Brucella abortus*. Sendo assim, objetivou-se com este estudo a realização de inquérito sorológico para diagnosticar a sorprevalência de anticorpos anti- *Brucella abortus* em ovinos da região médio-norte do estado de Mato Grosso, pela detecção de anticorpos anti-*Brucella abortus* em 255 ovinos, pela técnica do Antígeno Acidificado Tamponado. De acordo com os resultados obtidos, foi verificada frequência de 3,53% ovinos sororreagentes, sendo 3,72% nas fêmeas e 2,5% nos machos. Esta pesquisa revelou elevada ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* em ovinos no Estado do Mato Grosso. Diante disso, o sucesso do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose (PNCEBT) no estado pode ser prejudicado, uma vez que é comum a criação consorciada de pequenos ruminantes e bovinos nessa região, além do considerável risco à Saúde Pública.

Palavras-chave: Brucelose, ovinocultura, Antígeno Acidificado Tamponado, Mato Grosso.

RESEARCH ON *BRUCELLA ABORTUS* ANTIBODIES IN SHEEP FROM MID-NORTH MATO GROSSO STATE, BRAZIL

ABSTRACT

Brucellosis is an important disease in Brazilian livestock. Among the agents of this disease, the most relevant in Brazil is *Brucella abortus*. This study aimed to investigate antibodies against *Brucella abortus* in sheep of the mid-north of Mato Grosso State, Brazil, through the detection of antibodies anti-*Brucella abortus* in 255 sheep by Buffered Acidified Antigen. According to the results, there was a frequency of 3.53% of seropositive sheep in region, with 3.72% positive females and 2.5% males. The municipality with the highest prevalence in this survey was Sinop (5.55%). The results presented high occurrence of antibodies anti-*Brucella abortus* in sheep from mid-north region of Mato Grosso State, Brazil. By the way, the success of the Brucellosis Animal Sanity Program (PNCEBT) can be affected, due to the commonly associated breeding of sheep and cattle and the risk in public health.

Keywords: Brucellosis, Sheep, Buffered Acidified Antigen, Mato Grosso State

¹ Mestrando em Zootecnia - UFMT Sinop.

² Acadêmico de Medicina Veterinária - UFMT Sinop.

³ Prof. Adjunto da Universidade Federal de Mato Grosso Campus Universitário de Sinop. Av. Alexandre Ferronato, 1200 - Sinop, MT. 78557-267 Contato para correspondência.

PESQUISA DE ANTICUERPOS ANTI-*BRUCELLA ABORTUS* EN OVINOS DE LA REGION MEDIO-NORTE DE LA PROVINCIA DE MATO GROSSO, BRASIL

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad importante en la cadena nacional de ganado. Entre los principales agentes causantes de esta enfermedad, hay relevancia la especie *Brucella abortus*. Así, este estudio tuvo como objetivo llevar a cabo el primer estudio serológico para diagnosticar la prevalencia de *Brucella abortus* en 255 ovinos de la región media de la provincia de Mato Grosso, Brasil, través de la detección de anticuerpos anti-*Brucella abortus* en ovinos por la técnica de soroagluinación. Según los resultados, se verificó frecuencia de 3,53% de ovinos seropositivos, con el 3,72% en las hembras y el 2,5% en los machos. El municipio con mayor ocurrencia fue Sinop (5,55%). Los resultados presentaron una alta frecuencia de anticuerpos anti-*Brucella abortus* en el ganado ovino de la región. Diante do apresentado, el suceso del Programa Nacional del Control y Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis Animal (PNCEBT) se puede ser afectado, debido a creación conjunta del ganado bovino y ovino, así como el riesgo en la Salud Pública.

Palabras clave: Brucelosis, ganado ovinos, Antígeno Acidificado Tamponado, Mato Grosso

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa causada por bactérias do gênero *Brucella* spp., considerada como um problema econômico e sanitário em virtude das desordens reprodutivas nos animais (1). Dentre as espécies de maior relevância, destaca-se a infecção causada por *Brucella abortus*, principal agente causador da brucelose em bovinos, podendo também acometer outras espécies domésticas como pequenos ruminantes, caninos e equinos (2).

As alterações decorrentes da infecção por *B. abortus* em ovinos variam desde uma epididimite, orquite e vesiculite, enquanto nas fêmeas podem ser observados quadros de vaginocervicite e endometrite associadas a abortamentos esporádicos (3), além de ocasionar nascimento de animais fracos e morte perinatal, resultando em baixos índices reprodutivos (4).

Apesar de a espécie *B. abortus* receber maior importância em bovinos, a criação semi-extensiva e consorciada destes com outras espécies favorece a disseminação do agente. A ocorrência do agente etiológico em ovinos decorre principalmente pelo fato de os bovinos contaminarem o ambiente (5).

Diante da importância sanitária e econômica desta infecção em ovinos, objetivou-se com este estudo realizar um inquérito sorológico para diagnosticar a soroprevalência de anticorpos anti-*Brucella abortus* em ovinos da região médio-norte do estado de Mato Grosso.

Coletou-se o sangue de 255 ovinos, machos inteiros e fêmeas em idade reprodutiva, entre os meses de julho a agosto de 2014 em 15 propriedades rurais localizadas nos municípios de Sinop, Sorriso, Santa Carmem e Itaúba, pertencentes a microrregião de Sinop. O sangue foi colhido por venopunção jugular utilizando-se tubos de coleta a vácuo, estéreis e com ativador de coágulo. Após a coleta, os tubos foram devidamente identificados, e, após a retração do coágulo, enviados, sob refrigeração, para o Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Mato Grosso – *Campus* de Sinop. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, e o soro foi armazenado em microtubo estéril de 1,5 mL, identificado e conservado a -20°C até o momento do processamento.

Aplicou-se um questionário epidemiológico em cada propriedade, no qual foram anotados dados referentes ao sexo, idade e raça, bem como outras questões relativas aos aspectos produtivos e sanitários da propriedade.

A pesquisa de anticorpos anti-*B. abortus* foi realizada no laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Mato Grosso, utilizando-se o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), conforme recomendado pelo Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. O antígeno usado consistiu de uma suspensão celular inativada de *B. abortus*, amostra 1119-3, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná. A técnica seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante.

A caracterização da significância entre as diferenças observadas nas frequências de animais reativos segundo o sexo foi determinada pelo Teste Exato de Fischer, pelo programa Biostat 5.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os dados referentes a este estudo podem ser observados na Tabela 1. Após análise do resultado, foi verificado que 3,53% dos animais (n=9) apresentaram anticorpos anti-*Brucella abortus*. Foi observado, também, que apenas cinco propriedades apresentaram ao menos um animal positivo, representando uma prevalência de 33,33% de focos da infecção.

Tabela 1. Distribuição da prevalência de ovinos soropositivos para *Brucella abortus* pela técnica do Antígeno Acidificado Tamponado na região médio-norte matogrossense, Brasil.

Município	Total de Animais	Positivos	Negativos	Prevalência
Itaúba	97	3	94	3,09% ^a
Santa Carmem	50	1	49	2% ^a
Sinop	54	3	51	5,55% ^a
Sorriso	54	2	52	3,70% ^a
Total	255	9	246	3,53% ^a

(P>0,05)

Prevalências seguidas de letras iguais na mesma coluna, não apresentam diferença (P>0,05) pelo teste exato de Fischer.

Este estudo apresentou uma prevalência acima do observado em todos os estudos realizados até o momento em outros estados do território nacional. O primeiro estudo foi de Dias e Silva et al. (6) em ovinos e caprinos em oito municípios do estado do Ceará e não foram detectados animais sororreagentes nas 2.391 amostras analisadas.

Em outro estudo, realizado na região nordeste, Pinheiro Junior et al. (5) observaram em Pernambuco a prevalência de 0,6% de caprinos soropositivos (N= 340) e de 2,5% de ovinos reagentes.

Desta forma, esse primeiro estudo detectou a ocorrência de ovinos sororreagentes à *Brucella abortus* no estado de Mato Grosso. Ademais, foi possível verificar que a região estudada neste levantamento epidemiológico apresentou a maior soroprevalência, comparado aos estudos já realizados no país. Esta prevalência possivelmente decorre de infecção por contato constante entre ovinos e bovinos, visto que o estado de Mato Grosso apresenta a maior prevalência de bovinos com *Brucella abortus* do Brasil (7). Assim, a criação consorciada entre ovinos e bovinos pode ser considerada um fator de risco para a disseminação do agente entre os rebanhos de diferentes espécies domésticas.

No que se refere à ocorrência da infecção entre os gêneros, verificou-se que dos nove animais soropositivos, oito eram fêmeas (n=215) e apenas um macho (n=40). Sendo assim, a prevalência em fêmeas e machos foi de 3,72% e 2,5%, respectivamente. Estudos realizados por Carter e Chengappa (8), em bovinos, ressaltaram que um dos fatores que pode contribuir para uma maior frequência da infecção brucélica em fêmeas é o fato de o agente etiológico possuir tropismo por órgãos com maior disponibilidade de elementos necessários para seu metabolismo, como o eritritol (álcool polihídrico de quatro carbonos), uma substância produzida pelo feto que está presente no útero gravídico, tecidos mamários e ósteo-articulares.

A partir do quinto mês de gestação, a concentração do eritritol eleva-se atingindo níveis máximos próximos ao parto, estimulando a multiplicação da bactéria de forma crescente.

Outro fato que pode explicar a diferença observada entre os gêneros decorre do tipo de criação observada na região estudada, onde os machos inteiros permanecem estabulados, enquanto que as fêmeas são criadas extensivamente; aumentando o contato com outras espécies, principalmente os bovinos que são a principal fonte de infecção e importante espécie na cadeia epidemiológica da doença.

De acordo com a literatura, nos estudos em que foram observados animais soropositivos, Pinheiro Junior et al. (5) verificaram prevalência semelhante entre machos e fêmeas (2,94% e 2,23%, respectivamente). Por outro lado, Ocholi et al. (9) não encontraram machos positivos, enquanto que as fêmeas apresentaram soroprevalência de 21,05% em ovinos da região de Bauchi, Nigéria.

Sendo assim, este estudo demonstrou a ocorrência de uma infecção de grande importância em Defesa Sanitária Animal, que é de maior relevância em bovinos. Porém, outras espécies também devem ser monitoradas para que o processo de distribuição e propagação da brucelose seja mais bem compreendido, já que o agente foi verificado em outras espécies domésticas como cães e caprinos, além de espécies silvestres como canídeos e cervídeos (10).

O presente estudo revelou a presença de anticorpos anti-*Brucella abortus* em ovinos no Estado do Mato Grosso, em um nível de ocorrência relativamente alto. Esse fato pode dificultar o sucesso do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose (PNCEBT), tendo em vista que, nessa região, é comum a criação consorciada de pequenos ruminantes com bovinos, além de representar riscos à Saúde Pública.

REFERÊNCIAS

1. Gul ST, Khan A. Epidemiology and epizootology of brucellosis: a review. Pak Vet J. 2007;27:145-51.
2. Antunes JMAP, Allendorf SD, Appolinário CM, Peres MG, Perotta JH, Neves TB, et al. Serology for *Brucella abortus* in cart horses from an urban area in Brazil. Arq Bras Med Vet Zootec. 2013;65:619-21.
3. Arias Y, Cárdenas B. Diagnóstico de brucelose em ovinos com antígeno de Rosa Bengala al 3 e 8%. Rev Unelles Cienc Tecnol. 2007;25:40-3.
4. Estein SM. Immunological aspects in the diagnosis and control of contagious epidymitis of rams by *Brucella ovis*. Arch Med Vet. 1999;31:1-18.
5. Pinheiro Junior JW, Souza MMA, Guerra NR, Santana VLA, Mota RA. Frequência de aglutininas anti-*Brucella abortus* em caprinos e ovinos do sertão do estado de Pernambuco, Brasil. Cienc An Bras. 2008;9:1096-101.
6. Dias e Silva AE, Dias e Silva UM, Hansen D. Brucelose (*Brucella abortus*) como possível causa de aborto e epidimorquite em caprinos e ovinos no Ceará. Rev Bras Reprod Anim. 1982;6:25-9.
7. Negreiros RL, Dias RA, Ferreira F, Ferreira Neto JS, Gonçalves VSP, Silva MCP, et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. Arq Bras Med Vet Zootec. 2009;61:56-65.

8. Carter GR, Chengappa MM. Brucella. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. Philadelphia: London; 1991.
9. Ocholi RA, Kwaga JKP, Ajogi I, Bale JOO. Abortion due to Brucella abortus in sheep in Nigeria. Rev Sci Tech Off Int Épiz. 2005;24:973-9.
10. Dorneles SEM, Santos H, Minharro S, Nascimento Rocha JM, Mathias LA, Dasso MG, et al. Anticorpos anti-Brucella canis e anti-Brucella abortus em cães de Araguaína, Tocantins. Braz J Vet Res Anim Sci. 2011;48:167-71.

Recebido em: 11/08/2015

Aceito em: 31/10/2016

ASPECTOS FÍSICOS E MORFOLÓGICOS DO SÊMEN DE BUBALINOS DA RAÇA MURRAH EM MATURIDADE SEXUAL

Mariana Furtado Zorzetto¹
Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva¹
Saulo Zocca²
Gabriel Augusto Monteiro¹
Stephane Cássia Vexenat¹
Ian Martin¹
Eunice Oba³

RESUMO

A importância da espécie bubalina está ligada a sua dupla habilidade de produção (carne e leite) e sua força de tração, levando notoriedade à espécie no cenário econômico mundial e a investimentos em programas tecnológicos semelhantes aos aplicados em bovinos. Esses programas visam aumentar a incorporação de biotecnologias reprodutivas a fim de se obter um incremento genético dos rebanhos bubalinos existentes no país e aumento da produtividade dos mesmos. Portanto, o principal objetivo de todas as análises de sêmen é obter precisão, de forma objetiva, rápida e barata podendo prever a fertilidade da amostra. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características morfológicas, a concentração, aspecto, cor, densidade e a integridade da membrana plasmática dos ejaculados de touros de diferentes idades no momento a fresco. Foram utilizados 4 touros bubalinos para colheitas seminais utilizando vagina artificial. O sêmen fresco foi analisado quanto ao seu volume, aspecto, cor, concentração (câmara de Neubauer), morfologia realizada por microscopia de interferência diferencial (DIC) e a cinética espermática pelo sistema CASA. A idade dos animais entre 48 a 84 meses diferem em relação aos defeitos maiores e concentração espermática em búfalos. Em búfalos, o aspecto seminal está relacionado à concentração espermática, sendo que altas concentrações espermáticas estão relacionadas ao aspecto leitoso e baixas concentrações espermáticas ao aspecto aquoso.

Palavras-chave: sêmen, búfalos, morfologia espermática.

PHYSICAL AND MORPHOLOGICAL ASPECTS OF THE SEMEN OF MURRAH BUFFALOES IN SEXUAL MATURITY

ABSTRACT

The importance of the bubaline species is tied to its dual ability of production of meat and milk and its traction capacity, taking notoriety in the global economy and investments in technology programs similar to those used in cattle. These programs aim to increase the incorporation of reproductive biotechnologies in order to obtain a genetic increment of buffalo herds to increase their productivity. Therefore, the main aim of all semen analysis is get accuracy, objectively, fast and affordable to predict the fertility of the sample. Thus, the objective of this study was to evaluate the morphological characteristics, concentration,

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu. Contato principal para correspondência: mary-zorze@hotmail.com

² Graduando em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu.

³ Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu.

appearance, color, density and plasma membrane integrity of fresh ejaculates of bulls from different ages. They were used four buffalo bulls for semen collection using artificial vagina. The fresh semen was analyzed for volume, appearance, color, concentration (Neubauer chamber), morphology performed by differential interference microscopy (DIC) and sperm kinetics by CASA system. The age of the animals between 48 and 84 months differ in relation to major defects and sperm concentration in buffaloes. In the buffalo, seminal aspect is related to sperm concentration, and in higher sperm concentrations are related to milky aspect and lower sperm concentration to the watery aspect.

Keywords: semen, buffalos, sperm morphology.

ASPECTOS FÍSICOS Y MORFOLÓGICOS DEL SEMEN DE LOS BÚFALOS MURRAH EN LA MADUREZ SEXUAL

RESUMEN

La importancia del búfalo está ligado a su capacidad para duplicar la producción (carne y leche) y su resistencia a la tracción, con lo que la notoriedad de la especie en la economía mundial y las inversiones en programas de tecnología similares a los utilizados en el ganado. Estos programas destinados a aumentar la incorporación de la biotecnología reproductiva con el fin de obtener una mayor rebaño búfalo genética en el país y el aumento de la productividad de los mismos. Por lo tanto, el objetivo principal de todos los análisis de semen consiste en precisión, objetiva, rápida y de bajo costo y puede predecir la fertilidad de la muestra. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue evaluar las características morfológicas, la concentración, la apariencia, el color, la densidad y la integridad de la membrana plasmática de toro eyacula de diferentes edades en el momento que se enfría. En el presente estudio, hemos utilizado 4 toros búfalo seminales de los cultivos utilizando vagina artificial. El semen fresco se analizó para determinar el volumen, aspecto, color, concentración (cámara de Neubauer), morfología realizado por microscopía de interferencia diferencial (DIC) y la cinética de espermatozoides por el sistema CASA. La edad de los animales entre 48 y 84 meses difiere en relación con los defectos y la concentración de espermatozoides en los búfalos. En el aspecto seminal búfalo está relacionado con la concentración de espermatozoides, y el aumento de las concentraciones de espermatozoides está relacionado con las concentraciones de espermatozoides lechosas y bajar el aspecto acuoso.

Palabras clave: semen, búfalos, morfología de los espermatozoides.

INTRODUÇÃO

A importância da espécie bubalina está ligada a sua dupla habilidade de produção (carne e leite) e sua força de tração, levando notoriedade à espécie no cenário econômico mundial e a investimentos em programas tecnológicos semelhantes aos aplicados em bovinos. Estes programas visam aumentar a incorporação de biotecnologias reprodutivas a fim de se obter um incremento genético dos rebanhos bubalinos existentes no país e aumento da produtividade dos mesmos.

Portanto, o principal objetivo de todas as análises de sêmen é obter precisão, de forma objetiva, rápida e barata podendo prever a fertilidade da amostra (1).

O volume de sêmen deve ser medido imediatamente após a coleta. Varia dependendo da raça, idade, tamanho, números de saltos, métodos de colheita, nutrição do animal, saúde e

ambiente (2). Vale (3) e Almaguer et al. (4) sugerem que em touros na puberdade o volume é de cerca 1 mL e de 3 mL após atingirem a maturidade.

Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5) encontraram o volume de 3-4 ml em ejaculados da raça Nili-Ravi, que é semelhante ao descrito por Sajjad et al. (6). O volume de ejaculado varia dependendo da idade do touro, encontrando-se um aumento de volume entre 4 a 12 anos (7). Corroborando para esses achados, Nordin et al. (8) encontraram um maior volume de ejaculado em touros adultos do que nos jovens. De forma oposta, Javed et al. (9) não encontraram diferenças significativas no volume de sêmen de touros em diferentes idades.

A cor do ejaculado pode variar caso haja urina, sangue ou pus presente, ou ainda, devido à dieta do animal. A coloração pode variar desde acinzentado até o amarelo citrino (10).

A densidade do sêmen depende das variações na concentração de espermatozoides. Sêmen geralmente varia do branco leitoso ao creme, com um tom claro de azul, com a densidade do sêmen variando de aquoso, leitoso, leitoso-cremoso, até cremoso (11).

Vale (3) encontrou diferenças significativas na densidade entre espermatozoides vivos ou mortos. Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5) encontraram diferenças significativas na cor e densidade no sêmen do reprodutor bubalino e estas foram afetadas pela idade dos touros.

O número de espermatozoides é expresso em milímetros cúbicos. Para se determinar tal número, são usados métodos tais como: contagem em câmara de Neubauer e espectrofotometria (7). A concentração espermática tem grande variação (600 - 1500 milhões de células por mL) e este parâmetro é afetado por condições sazonais, nutricionais e a idade dos búfalos reprodutores (12, 13).

Medições mais rotineiras da concentração são feitas em espectrofotômetro. Em búfalos criados na Bahia (Brasil), foram observadas concentrações de $1166,3 \pm 17,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL (14). Em búfalos da raça Murrah criados na Índia, Kumar et al. (15) encontraram concentrações de $524,1 \pm 20,7$ - $1031,4 \pm 28,7 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Resultados semelhantes foram observados por Rattan (16) na raça Nili-Ravi, Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5).

Javed et al. (9) observaram menores concentrações de espermatozoides em búfalos mais velhos comparados com animais mais jovens. No entanto, Younis (17) não encontrou nenhuma diferença significativa na concentração de espermatozoides entre búfalos jovens e velhos.

O teste de viabilidade avalia a percentagem de espermatozoides vivos ou mortos em um ejaculado, bem como a integridade da membrana plasmática do espermatozoide. O corante preferivelmente usado é eosina-nigrosina. Em um eppendorf previamente aquecido a 37-38 °C, mistura-se 5 µL de sêmen com 15 µL de corante (eosina-nigrosina) e deixa-se em repouso durante 30 segundos. Faz-se um esfregão e deixa-se secar ao calor, observando em microscopia óptica de luz com ampliação de 40x. Os espermatozoides vivos e com membrana plasmática intacta não permitem a passagem de eosina para dentro da célula e ficarão de cor transparente à microscopia, enquanto que os espermatozoides mortos, com a perda funcional da região da membrana, permitem a passagem do corante, sendo observados de cor roxa (5).

A morfologia espermática avalia a percentagem de espermatozoides normais e anormais em uma dada amostra. Palacios (18) observou que a morfologia dos espermatozoides é um fator determinante na capacidade de fertilização do espermatozoide, uma vez que existe uma correlação entre os defeitos do esperma e a infertilidade.

Os espermatozoides podem apresentar alguns defeitos de conformação. Estas alterações são devidas à espermiogênese defeituosa, sendo por herança, enfermidade, estresse por calor ou frio, exposição a condições ambientais adversas, repouso sexual prolongado (mais de 60 dias), e técnicas inadequadas de manipulação do sêmen (19).

A maioria dos estudos que avaliaram anormalidades acrossomais foi realizada utilizando a coloração de Giemsa (20). Mais de 90% dos espermatozoides foram observados

com acrossoma intacto em touros da raça Murrah, em que o sêmen foi avaliado com o corante Giemsa (14,15). Talevi et al. (21) reportaram resultados semelhantes utilizando a fluorescência lectina.

Em estudos de Saeed et al. (19) em touros da raça Murrah, a maior parte das alterações foi encontrada na cabeça do espermatozoide ($5,78 \pm 2,1\%$), enquanto que as anormalidades de peça intermediária foram menor que 1% e outras anormalidades variaram de $3,92 \pm 1,0\%$ a $5,7 \pm 0,4\%$. O aparecimento de gota citoplasmática foi inferior a 1%. Proporções semelhantes de anormalidades foram observadas no sêmen de búfalos da raça Murrah do Brasil (14,15).

Sajjad et al. (6) em touros da raça Nili-Ravi com idade entre 12 a 15 anos mostrou alterações de $11,67 \pm 0,90\%$ e semelhantes resultados foram encontrados por Saeed et al. (19).

Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5) encontraram menos de 15% de anormalidades em espermatozoides de búfalos, onde a anormalidade mais comum foi a cabeça piriforme, seguida de acrossomas Knobbed, que é a presença de um grânulo no acrossomo, sendo de origem hereditária e está ligado diretamente com a infertilidade do animal quando encontrado em grande quantidade. A terceira anormalidade mais encontrada foi a gota citoplasmática proximal e em seguida caudas dobradas. Esses resultados foram detectados por contraste de fase em microscopia de luz. Além disso, determinaram que a idade do búfalo reprodutor teve efeito significativo sobre a incidência geral de anormalidades de cabeça, defeitos do acrossoma, gota citoplasmática proximal e defeitos de cauda totais.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características morfológicas, a concentração, aspecto, cor, densidade e a integridade da membrana plasmática dos ejaculados de touros de diferentes idades no momento a fresco.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Fazenda Experimental Lageado, FMVZ – UNESP/Botucatu. Os animais permaneceram confinados em piquete coberto com sombrite, cercado com cerca elétrica, contendo bebedouro com fornecimento de água *ad libitum* e comedouro.

Animais

Dois meses antes do início do experimento, sete animais mestiços da raça Murrah foram condicionados à condução por cabresto, estimulação do salto e colheita de sêmen com vagina artificial modelo Botucatu. Foi utilizada uma fêmea da mesma espécie e raça como manequim para o momento da colheita; e a estimulação do estro foi induzida com a administração de 2,0 ml via intramuscular de Cipionato de Estradiol - ECP[®]. O cio foi observado 48h após a aplicação do hormônio.

Para o experimento, apenas quatro animais dos setes condicionados inicialmente foram coletados, pois três animais não apresentaram libido e se recusavam a montar. Os animais utilizados no experimento apresentavam idades de 48 (1 animal), 72 (2 animais) e 84 (1 animal) meses.

Alimentação

Os sete machos ficaram confinados em baia coletiva e receberam a mesma dieta composta por concentrado comercial (18% PB), sal mineral *ad libitum* e feno (Tifton tipo A). A dieta foi fornecida duas vezes ao dia, pela manhã (8h) e tarde (16h), mantendo sobra diária referente a 5% do fornecido.

Colheita de sêmen

Previamente ao início do experimento, os animais foram submetidos a um período de adaptação de 30 dias onde foram condicionados à colheita de sêmen (duas vezes por semana) e ao cabresto, sendo que, após esse período, deu-se início ao experimento. Nesse período, também foram realizadas duas colheitas semanais durante um mês com a finalidade de melhorar a qualidade do sêmen. A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial modelo Botucatu com temperatura entre 42 a 46 °C, preconizada por Vale (3). Durante o período experimental, as colheitas foram realizadas entre os meses de agosto e setembro, sendo 9 colheitas para o animal de 48 meses, 6 e 9 colheitas para os animais de 72 meses e 8 colheitas para o animal de 84 meses.

Análises do Ejaculado

Na avaliação dos ejaculados foram consideradas as características macro e microscópicas, sendo, portanto, realizadas as seguintes análises:

- Mensuração do volume em tubo de ensaio graduado;
- Avaliação visual do aspecto e cor;
- Contagem da concentração espermática utilizando a câmara hematocitométrica de Neubauer, em diluição de 1:200.
- Amostras de sêmen (10µl de sêmen) foram conservadas em eppendorfs contendo 1,0 mL de formol salina em geladeira (4°C) para realização da porcentagem de patologias espermáticas (cauda, cabeça, acrossoma e peça intermediária) em microscopia de interferência diferencial (DIC), observado com lâmina e lamínula na objetiva de 100X.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM descrito no SAS 9.2, 2011. E as diferenças entre médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), sendo consideradas as seguintes causas de variações: idade (48, 72 e 84 meses), aspecto (aquoso e leitoso) e cor (amarela e marfim).

RESULTADOS

O volume médio variou entre 3,14 e 4,46 mL, em que o animal de idade de 48 meses apresentou maior volume seminal em relação aos animais de 72 meses (Tabela 1).

Quanto aos defeitos maiores, os mais encontrados no presente estudo foram cauda fortemente dobrada ou enrolada, seguido dos defeitos de acrossoma; já para os defeitos menores, os mais frequentes foram cauda dobrada ou enrolada e gota citoplasmática distal.

O animal com 48 meses apresentou diferença estatística em relação aos animais com idade de 72 meses, porém, não foi diferente para o animal de 84 meses com relação a defeitos maiores (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância, das características: Volume (VOL), concentração (CONC), defeitos maiores (DMAI) e defeitos menores (DMEN) entre as idades dos touros.

IDADE (meses)	Variáveis			
	VOL (mL)	CONC ($\times 10^9$)	DMAI (%)	DMEN (%)
48	4,46 ^a	0,68	14,58 ^a	4,94
72	3,14 ^b	0,52	26,56 ^b	6,50
84	3,55 ^{ab}	0,43	21,53 ^{ab}	5,08
Média \pm DP	3,16 \pm 1,06	35,41 \pm 76,11	20,28 \pm 9,03	5,09 \pm 3,83
CV%	33,74	214,96	44,54	75,12

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

A Tabela 2 apresenta os valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância do volume, concentração espermática e defeitos maiores e menores dos espermatozoides em relação ao aspecto.

O aspecto foi significativo apenas para concentração, sendo que a maior concentração de espermatozoides apresentou aspecto leitoso e a menor, aspecto aquoso, para volume, defeitos maiores e menores não houve significância (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância, das características: Volume (VOL), concentração (CONC), defeitos maiores (DMAI), defeitos menores (DMEN) em relação ao aspecto seminal.

ASPECTO	Variáveis			
	VOL (mL)	CONC ($\times 10^9$)	DMAI (%)	DMEN (%)
Aquoso	2,25	0,35 ^b	18,75	5,07
Leitoso	3,29	0,85 ^a	20,50	5,25
Média \pm DP	3,16 \pm 1,06	35,41 \pm 76,11	20,28 \pm 9,03	5,09 \pm 3,83
CV%	33,74	214,96	44,54	75,12

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

A Tabela 3 apresenta os valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância do volume, concentração espermática e defeitos maiores e menores dos espermatozoides em relação à cor do ejaculado.

A cor foi significativa para volume e concentração espermática, sugerindo que o ejaculado de cor amarela tem relação com maior volume e concentração espermática, e a cor marfim com menores volume e concentração espermática (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância, das características: Volume (VOL), concentração (CONC), defeitos maiores (DMAI), defeitos menores (DMEN) em relação a cor do ejaculado.

COR	Variáveis			
	VOL (mL)	CONC ($\times 10^9$)	DMAI (%)	DMEN (%)
Marfim	2,96 ^b	0,70 ^b	20,59	5,00
Amarela	5,00 ^a	1,57 ^a	17,33	6,00
Média \pm DP	3,16 \pm 1,06	35,41 \pm 76,11	20,28 \pm 9,03	5,09 \pm 3,83
CV%	33,74	214,96	44,54	75,12

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

O volume variou entre 3,55 a 4,46 mL, apresentando maior volume o animal mais jovem (48 meses). Vale (3) e Almaguer et al. (4) sugerem que touros na puberdade apresentam volume de cerca de 1 ml e após atingirem a maturidade de 3 mL. No presente estudo, todos os animais utilizados estavam maduros sexualmente, portanto, o volume está de acordo com o preconizado pelos autores acima citados.

Para corroborar com os resultados do presente estudo, Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5) e Sajjad et al. (6) relataram volumes entre 3 a 4 ml em ejaculados da raça Nili-Ravi. O volume do ejaculado varia dependendo da idade do touro, encontrando um maior volume em animais de 4 a 12 anos (7). Esses resultados condizem com os resultados obtidos nesse estudo, em que touros de 4, 6 e 7 anos apresentaram volumes entre 3,55 a 4,46 mL, como citado acima. Também corroborando com os achados, Nordin et al. (8) encontraram um maior volume de ejaculado em touros adultos do que nos jovens. Entretanto, Javed et al. (9) não encontraram diferenças no volume de sêmen de touros em diferentes idades.

Quanto aos defeitos maiores, observou-se, nesse estudo, um predomínio de cauda fortemente dobrada ou enrolada, seguido dos defeitos de acrossoma. Os defeitos menores mais encontrados foram de cauda dobrada ou enrolada e de gota citoplasmática distal. Esses resultados contradizem Saeed et al. (19), que relataram em touros da raça Murrah, maior incidência de patologias na cabeça do espermatozoide ($5,78 \pm 2,1\%$), enquanto que as anormalidades de peça intermediária foram menor que 1%. Esses mesmos autores relataram que o aparecimento de gota citoplasmática foi inferior a 1%, o que difere do presente estudo onde a gota citoplasmática distal foi o segundo maior defeito encontrado entre os defeitos menores.

Isso pode ter ocorrido caso a idade, tratamento, protocolos, número de colheitas de sêmen e manejo usados pelos autores, sejam diferentes do utilizado no presente estudo, influenciando as alterações diferentes nos espermatozoides dos búfalos. Porém, ambos os trabalhos apresentam percentagens de defeitos morfológicos espermáticos dentro da faixa da normalidade (30%).

Corroborando para os dados obtidos nesse estudo, Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5) determinaram que a idade do búfalo reprodutor tem efeito significativo sobre a incidência geral de anormalidades de cabeça, defeitos do acrossoma, gota citoplasmática proximal e defeitos de cauda totais. Em nosso estudo, os animais de 72 e 84 meses apresentaram maior incidência de patologia espermática. Contudo, os animais mais velhos empregados nesse estudo tinham apenas 7 anos, o que é compatível com touros em reprodução normal (22), e o quadro espermático observado está dentro dos valores normais de patologia espermática.

O aspecto foi significativo apenas para concentração, sendo observado que a maior concentração de espermatozoides apresentou aspecto leitoso (10). A cor foi significativa para volume e concentração espermática, inferindo que o ejaculado de cor amarela tem relação

com volume e concentrações maiores, e a cor marfim com volume e concentrações menores. De forma similar ao presente estudo, Canizales (11) relatou que a densidade do sêmen depende das variações na concentração de espermatozoides. Esse mesmo autor relatou que o sêmen geralmente varia do branco leitoso ao creme, com um tom claro de azul, com a densidade do sêmen variando de um aquoso, leitoso, leitoso-cremoso, até cremoso. É sabido que a coloração do sêmen varia de acordo com a idade, alimentação e presença de outros elementos (10) e não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que relacionasse a cor com o volume e a concentração seminal.

CONCLUSÃO

A idade dos animais entre 48 a 84 meses diferem em relação aos defeitos maiores e concentração espermática em búfalos.

Em búfalos, o aspecto seminal está relacionado à concentração espermática, sendo que altas concentrações espermáticas estão relacionadas ao aspecto leitoso e baixas concentrações espermáticas ao aspecto aquoso.

REFERÊNCIAS

1. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 2005;63:445-7.
2. Nazir M. Semen evaluation and sperm morphology. Monograph on reproductive pattern of riverine Buffaloes and recommendations to improve their reproductive performance at small farmer level. Islamabad: Pakistan Agriculture Research Council; 1988.
3. Vale WG. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen. *Buffalo J*. 1994;2:65-81.
4. Almaguer P. El búfalo una opción de la ganadería. *Rev Electron Vet*. 2007;8:1-8.
5. Koonjaenak S, Rodriguez-Martinez M. Assessment of semen quality in Swamp Buffalo AI Bulls in Thailand. *Ital J Anim Sci*. 2007;6 Suppl 2:S701-4.
6. Sajjad S, Ali S, Ullah N, Anwar M, Akhter S, Andrabi SMH. Blood serum testosterone level and its relationship with scrotal circumference and semen characteristics in Nili-Ravi buffalo bulls. *Pakistan Vet J*. 2007;27:63-6.
7. Pant HC, Sharma RK, Patel SH, Shukla HR, Mittal AK, Kasiraj R, et al. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. *Theriogenology*. 2003;60:27-34.
8. Nordin W, Hilmi M, Bongso TA. Semen characteristics related to age in growing swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Buffalo J*. 1990;2:6-161.
9. Javed MT, Khan JR, Kausar P. Effect of age and season on some semen parameters of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Vet Arh*. 2000;70:83-94.
10. Hafez B, Hafez ESE. Reprodução animal. 7a ed. Barueri: Manole; 2004.
11. Canizales SA. Características seminales del Búfalo de água (*Bubalus bubalis*). *Rev Colomb Cienc Anim*. 2011;4:95-102.

12. Vale WG, Ribeiro HFL, Sousa JS, Ohashi OM. Inseminação artificial em búfalos (*Bubalus bubalis*) na região amazônica. In: Anais do 19º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 1984; Belém. Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária; 1984. p.91.
13. Lohachit C. Anatomy and clinical examination on female reproductive org of swamp buffalo reproduction. In: Chantarapruteep P, Virakul P, Lohachit C, Kunavongkrit A. Swamp buffalo reproduction. Bangkok: Chulalongkorn University Press; 1987. p.93-115.
14. Aguiar P, Andrade V, Abreu J, Gomez A. Physical and morphological semen characteristics of buffaloes aged from four to eight years old. In: Proceedings of the 4th International Buffalo Congress; 1994; São Paulo. São Paulo: International Buffalo Federation; 1994. p.486-8.
15. Kumar S, Sahni KL, Benjamin BN, Mohan G. Effect o various levels of yolk on deep freezing and storage of buffalo semen in different diluters without adding glycerol. Buffalo J. 1993;1:79-85.
16. Rattan PJS. Physico–chemical constituents of buffalo bull semen. In: Acharya RM, Lokeshwar RR, Kumar S. Recent advances in buffalo research. New Delhi: Indian Society of Buffalo Development; 1990. p.26-30.
17. Younis M. Studies on semen quality, freezability and fertility of buffalo bulls during low and peak breeding seasons [thesis]. Faisalabad: University of Agriculture Faisalabad; 1996.
18. Palacios C. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. Memorias posgrado de reproducción bovina. CGR Colombia; 2005.
19. Saeed A, Chaudhry R, Khan IH, Khan NU. Morphology of semen buffalo bulls of different age groups. In: Acharya RM. Recent advances in buffalo research. New Delhi: Indian Society of Buffalo Development; 1990. p.17-9.
20. Ramakrishnan P, Ariff M. Effect of glycerol level and cooling rate on post-thaw semen quality of Malaysian swamp buffalo. In: Proceedings of the 4th International Buffalo Congress; 1994; São Paulo. São Paulo: International Buffalo Federation; 1994. p.540-2.
21. Talevi R, Pelosi S, Sansone G, Grasso F, Matassino D. Effects of different pre-freezing rates on buffalo sperm. Motility and ultrastructure preservation. In: Proceedings of the 4th International Buffalo Congress; 1994; São Paulo. São Paulo: International Buffalo Federation; 1994. p.537-9.
22. Oba E, Fuck EJ, Bicudo SD, Papa FO, Ohashi OM. Estudo preliminar de diferentes meios para congelação de sêmen de búfalos. In: Anais do 10º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 1993; Belo Horizonte. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; 1993. p.337.

Recebido em: 04/03/2013

Aceito em: 12/09/2016

ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO DE OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA

Êlika Suzianny de Sousa¹
Gleidson Benevides de Oliveira²
Márcio Nogueira Rodrigues³
Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior⁴
Moacir Franco de Oliveira¹
José Fernando Gomes de Albuquerque¹

RESUMO

O nervo isquiático é o maior nervo do corpo pertencendo tanto ao plexo sacral quanto ao lombossacro, sendo raras as citações na literatura referentes à anatomia deste nervo em pequenos ruminantes. Sabendo que este nervo é vulnerável a diversas lesões ao longo de seu trajeto e que a carne do membro pélvico é de alto valor comercial, este trabalho teve como objetivo conhecer a formação do nervo isquiático, bem como seus territórios de inervação em ovinos Morada Nova. O experimento foi conduzido no Laboratório de Anatomia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, sendo utilizadas 20 meias carcaças direitas de ovinos, machos da raça morada nova, com faixa etária entre 6 e 7 meses de idade procedentes da Fazenda Experimental da EMPARN-RN. As carcaças foram dissecadas de modo a visualizar o nervo isquiático e as peças conservadas em câmara fria. Após dissecadas e analisadas a olho nu, verificou-se variações na quantidade de vértebras lombares e sacrais do ovino, que variaram entre 7 vértebras lombares e 3 sacrais (90%) e 6 lombares e 4 sacrais (10%), alterando a origem do nervo. O nervo isquiático foi formado por raízes ventrais de L7S1S2 (75%), de L6S1S2 (10%), de L7S1S2S3 (10%) e por ramos ventrais de S1S2S3 (5%), distribuindo-se pelos músculos glúteo-bíceps, semitendinoso e músculo semimembranoso, podendo também inervar o músculo quadríceps da coxa. O conhecimento destas características anatômicas pode contribuir efetivamente para execução da clínica médica, evitando-se lesões neurológicas de ordem iatrogênica.

Palavras-chave: neuroanatomia, isquiático, ovino, inervação.

ORIGIN AND DISTRIBUTION OF THE SCIATIC NERVE IN MORADA NOVA SHEEP.

ABSTRACT

The sciatic nerve is the largest nerve in the body, belonging both to the sacral plexus as the lumbosacral, and there are few studies in the literature relating to anatomy of this nerve in small ruminants. Knowing that this nerve is vulnerable to several injuries along its path and that the flesh of the pelvic limb is of high commercial value, this study aimed to understand the formation of the sciatic nerve and its innervation territories in Morada Nova sheep. The experiment was conducted at the Anatomy Laboratory of the Federal Rural University of the Semi-Arid, being rights socks used 20 carcasses heep, of the new address race, aged between 6 and 7 months of age coming from Experimental Farm EMPARN-RN. The carcasses were dissected in order to view the sciatic nerve, and the pieces kept in cold storage. After

¹ Departamento de Ciências Animais. Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

² Departamento de Ciências Animais. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Correspondência.

³ Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP).

⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pela Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

dissected and examined with the naked eye, it was observed variations in the quantity of the lumbar and sacral vertebrae of sheep, which ranged between 7 and 3 sacral lumbar vertebrae (90%) and 6 lumbar and sacral 4 (10%), changing the origin of the nerve. The sciatic nerve was formed by ventral roots L7S1S2 (75%) of L6S1S2 (10%) of L7S1S2S3 (10%) and ventral branches S1S2S3 (5%), distributing the gluteobiceps muscles, semimembranosus muscle and the semitendinosus and may also innervate the quadriceps muscle of the thigh. The knowledge of these anatomical features can effectively contribute to medical clinic, avoiding iatrogenic neurological damage order.

Keywords: neuroanatomy, sciatic, sheep, innervation.

ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL NERVO CIÁTICO EN OVEJAS MORADA NOVA

RESUMEN

El nervio ciático es el nervio más grande del cuerpo que pertenece a ambos el plexo sacro como el lumbosacra, y hay pocos estudios en la literatura con respecto a la anatomía de este nervio en los pequeños rumiantes. Sabiendo que este nervio es vulnerable a varias lesiones a lo largo de su trayectoria y la carne de la extremidad pélvica es de alto valor comercial, este estudio tuvo como objetivo comprender la formación del nervio ciático y sus territorios de inervación en ovejas Morada Nova. El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Anatomía de la Universidad Federal Rural de la Zona Semiárida, siendo utilizados 20 medias carcaças derechas de ovino, machos de la raza nueva dirección, con edades comprendidas entre los 6 y 7 meses de edad procedentes de la granja experimental EMPARN-RN. Las carcasas fueron disecadas para ver el nervio ciático, y las piezas almacenadas en cámara fría. Después de diseccionado se examinaron con el ojo desnudo, la variación fue encontrado en la cantidad de las vértebras lumbares y sacras de ovejas, que osciló entre 7 vértebras lumbares y 3 sacrales (90%) y 6 lumbares y cuarto sacrales (10%), cambiando así el origen del nervio. El nervio ciático se formó por las raíces ventral L7S1S2 (75%) de L6S1S2 (10%) de L7S1S2S3 (10%) y las ramas ventrales S1S2S3 (5%), la distribución de los músculos gluteobiceps, y semimembranoso músculo semitendinoso y también pueden inervar el músculo cuádriceps del muslo. El conocimiento de estas características anatómicas puede contribuir eficazmente en la clínica médica, evitando el daño neurológico de orden iatrogénica.

Palabras clave: neuroanatomía, ciático, ovejas, inervación.

INTRODUÇÃO

A produção de carne ovina é uma atividade com grandes perspectivas para o Brasil, considerando o potencial do mercado consumidor e a possibilidade de produção dessa carne com qualidade, todavia existe uma grande necessidade de organização dos setores produtivos, além da implantação de programas de qualidade tecnológica, objetivando o fornecimento ao consumidor final de carnes em quantidade e, sobretudo, com qualidade superior, a preços competitivos de mercado (1).

Mantendo essa linha de pensamento, muitos proprietários investiram na introdução de raças puras no rebanho e em técnicas de manejos nutricionais, reprodutivos e higiênico-sanitários. Esta última, por sua vez, ameaçada por vários fatores, em destaque patologias que envolvem o sistema nervoso, onde se inclui as lesões de nervos periféricos, cada vez mais frequentes na rotina dos atendimentos de urgência (2).

No que diz respeito ao nervo isquiático, este é o maior nervo do corpo, continuando até a extremidade distal do membro pélvico, pertencendo tanto ao plexo sacral (3,4) quanto ao lombossacro (5). Nos ruminantes, este nervo origina-se, essencialmente, dos ramos ventrais do último nervo lombar e do primeiro e do segundo componentes sacrais do tronco lombossacral (6).

O nervo isquiático torna-se vulnerável a lesões diversas principalmente no seu trajeto entre os músculos bíceps e semimembranoso, poucos centímetros caudal ao fêmur, tendo como possíveis causas de injúrias as fraturas pélvicas, fraturas de 7ª vértebra lombar, luxação sacro-ilíaca, fratura de sacro, fratura do corpo do ílio na altura da incisura isquiática maior, injeções glúteas, pinos intramedulares proximais no fêmur mal direcionados, fratura do fêmur, injeções mal direcionadas na face caudal na coxa e parto distócico, seja pelo tamanho do feto ou seu inadequado posicionamento (5,7,8).

O nervo isquiático inerva a maior parte da musculatura do membro pélvico, sendo profundas as deficiências motoras associadas à desnervação. Em repouso, o membro fica pendendo atrás do animal, ou seja, o joelho permanece caído e estendido e o pé, dobrado. O perfeito posicionamento do membro acarretará a sustentabilidade do peso do corpo do animal por um determinado período de tempo, por causa do funcionamento normal do músculo quadríceps e do mecanismo recíproco. A desnervação crônica do nervo isquiático resulta numa atrofia neurogênica dos músculos da parte caudal da coxa e de todos os músculos distais ao joelho (9).

Considerando a importância clínica e cirúrgica e os poucos estudos referentes a anatomia do nervo isquiático de pequenos ruminantes, este trabalho teve como objetivos fornecer subsídios à clínica médica destes animais, quanto a disposição das fibras nervosas oriundas do nervo isquiático, de modo a evitar ou diminuir lesões no membro pélvico de ordem iatrogênica, bem como evitar patologias que provocam perdas comerciais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 ovinos clinicamente sadios, da raça morada nova, com idade variando entre os seis e sete meses, pesando entre 13,7 e 28,2 Kg, todos procedentes da Fazenda Experimental da EMPARN-RN. Os animais foram abatidos no frigorífico da associação dos criadores de ovinos e caprinos da região do Cabugí - ASCOP, localizado no município de Lages-RN. Após abate, fez-se a secção da carcaça no sentido longitudinal do animal em duas partes, sendo as meias carcaças direitas conduzidas ao Laboratório de Anatomia da Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA. As carcaças foram conservadas em câmaras frias ao longo do experimento e descongeladas para dissecação.

Assim, para identificação das raízes do nervo isquiático, os músculos psoas maior e psoas menor foram rebatidos, permitindo a exposição das raízes ventrais, junto aos forames intervertebrais ou vertebrais laterais. Imediatamente, o músculo glúteo-bíceps foi rebatido dorsalmente até a visualização do nervo isquiático na passagem pelo forame obturador, sendo posteriormente separado de sua inserção na fáscia lata e seccionado transversalmente no nível da articulação femorotibiopatelar possibilitando a identificação do nervo isquiático e suas ramificações ao longo de seu trajeto pela musculatura da coxa. À medida que o nervo isquiático ia sendo exposto era colocado sobre o mesmo algodão embebido em peróxido de hidrogênio a 20 volumes, permanecendo por 12 horas seguidas, favorecendo o clareamento e melhor visualização do nervo e seus ramos.

As observações feitas sobre o número de vértebras lombares e sacrais, origem e distribuição do nervo isquiático foram expressas por meio de fotos e os dados agrupados em tabelas. A nomenclatura adotada para este estudo esteve de acordo com o International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (10).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram verificadas variações na quantidade de vértebras lombares e sacrais do ovino, sendo que dezoito animais (90%) apresentaram sete vértebras lombares e três sacrais e dois (10%) mostraram seis vértebras lombares e quatro sacrais. Esses dados são concordantes com os relatos de Pirlot (11) que afirma haver variações no número de vértebras entre espécies, assim como variações intraespecíficas. Do mesmo modo König e Liebich (12) descrevem em pequenos ruminantes a existência de seis vértebras lombares e de três a cinco vértebras sacrais, resultado observado no presente trabalho em apenas 10% dos casos.

De uma forma geral, segundo Schwarze e Schröder (13) a fórmula vertebral na espécie ovina é formada a partir de seis a sete vértebras lombares e de quatro a cinco vértebras sacrais, diferindo então deste trabalho já que no ovino da raça Morada Nova, os exemplares apresentaram até quatro vértebras sacrais, não sendo encontrado a quinta vértebra sacral.

A ocorrência da variação no número de vértebras lombares e sacrais na espécie em questão culminou com uma variação, inclusive, na origem do nervo isquiático, o qual foi formado em 75% dos animais a partir de ramos ventrais do sétimo nervo lombar e do primeiro e segundo nervos sacrais ($L_7S_1S_2$ - Figura 1A), em 10% dos casos oriundo de raízes do sétimo nervo lombar e dos três primeiros sacrais ($L_7S_1S_2S_3$ - Figura 1B), em 10% formado de raízes do sexto nervo lombar e dos dois primeiros sacrais ($L_6S_1S_2$ - Figura 1C), e em 5% dos exemplares formado de raízes dos três primeiros nervos sacrais ($S_1S_2S_3$ - Figura 1D).

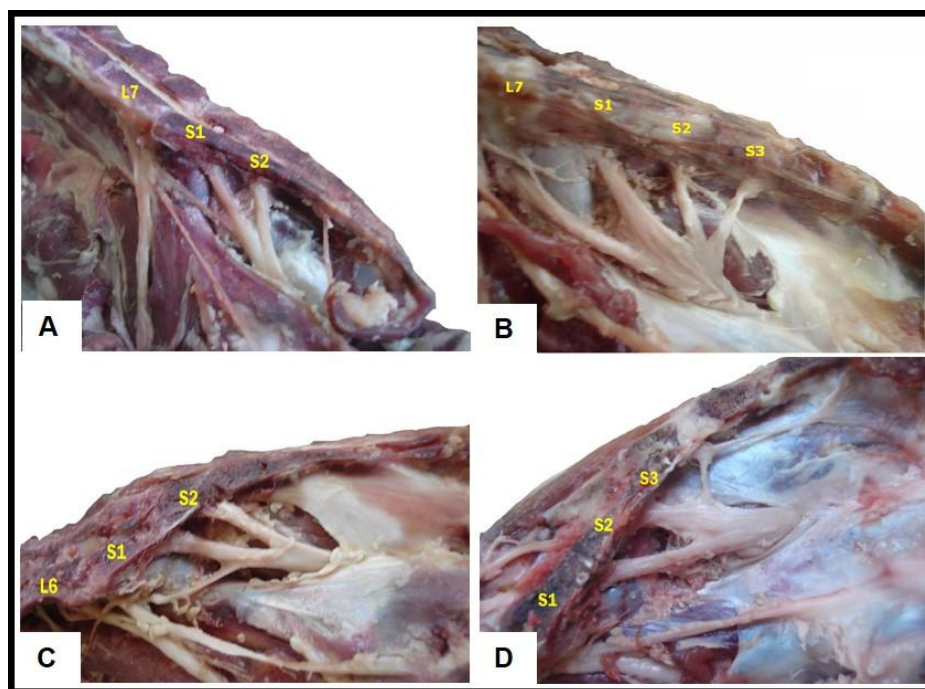


Figura 1. Origem do nervo isquiático do ovino da raça Morada Nova. Em A, observar a origem em $L_7S_1S_2$. Em B, origem em $L_7S_1S_2S_3$. Em C, origem em $L_6S_1S_2$ e, em D, origem a partir de $S_1S_2S_3$.

Em concordância, observamos em Getty (6), que no ovino, grande parte das fibras do nervo isquiático é derivada dos ramos ventrais do primeiro e do segundo nervos sacrais, com uma contribuição relativamente pequena do sexto nervo lombar. Este autor relata ainda que no caprino, a maioria das fibras do nervo isquiático origina-se do sexto nervo lombar e do primeiro nervo sacral, com uma pequena contribuição do segundo nervo sacral. Vale salientar que conforme Linzell apud Getty (6), o ramo ventral do sétimo nervo lombar, quando presente, ao invés do sexto nervo lombar, auxilia na formação do nervo isquiático, fato observado neste trabalho.

Por sua vez Vasconcelos et al. (14), ao estudarem o nervo isquiático de ovinos sem raça definida, descrevem que o mesmo origina-se do ramo ventral do último nervo lombar, ora do sexto nervo lombar (L₆), ora do sétimo (L₇), quando presente, e dos ramos ventrais dos primeiro e segundo nervos espinhais sacrais (S₁ e S₂), podendo apresentar a contribuição do ramo ventral do terceiro nervo espinhal sacral (S₃), diferindo do encontrado em ovinos da raça Morada Nova, onde a participação de L₇S₁S₂ foi mais frequente.

Lima et al. (15) ao estudar o nervo isquiático em caprinos da raça Saanen verificaram que este era formado mais frequentemente de raízes ventrais de L₆S₁S₂, podendo receber contribuição de S₃, situação verificada no Morada Nova em menor frequência. Já Ferraz et al. (16) e Campos et al. (17) em estudos com fetos de bovinos azebuados, observaram que este nervo tem origem a partir do ramo ventral do sexto nervo lombar e do primeiro e segundo nervos sacrais, podendo receber contribuições de L₅ e de S₃. O presente trabalho difere quanto a participação do quinto nervo lombar, já que este ramo não contribuiu para formação do nervo isquiático do ovino.

Martins et al. (18) ao estudarem o nervo isquiático do veado catingueiro observaram que este nervo tem origem a partir de L₆ e S₁, podendo receber contribuição de S₂, resultado encontrado com menor frequência no Morada Nova. Schwarze e Schröder (13), Ellenberger e Baum (19) e Nickel et al. (20), descrevem que a principal contribuição à formação do nervo isquiático é representada pelo último nervo lombar e primeiro nervo sacral corroborando com o observado na espécie estudada. Neste aspecto, é certo que o nervo isquiático sempre se mostrou constituído por dois ou mais nervos espinhais, o que confirma sua característica de nervo plurissegmentar, contendo fibras em mais de um segmento medular, corroborando com o descrito em outras espécies mamíferas (21-28).

Quanto à distribuição do nervo isquiático pela musculatura pélvica, constatou-se que este nervo, ao longo do seu trajeto, fornecia ramos para os músculos gluteobíceps, semitendinoso, quadríceps da coxa e para o músculo semimembranoso (Tabela 1 e Figura 2).

Em concordância, Getty (6), relata em ruminantes que ao nível do trocanter maior do fêmur e distalmente ao mesmo, o nervo isquiático libera diversos ramos, de vários tamanhos e espessuras, que se irradiam de modo semelhante a um leque, innervando o músculo glúteobíceps, o músculo semitendinoso e o músculo semimembranoso. Já Vasconcelos et al. (14), em estudos com ovinos Sem Raça Definida, citam que o nervo isquiático cede ramos aos músculos glúteo superficial, glúteo médio, glúteo acessório, glúteo profundo, gêmeo, quadrado femoral, adutor, bíceps femoral, semitendinoso e semimembranoso. Por sua vez, Martins et al. (18) mencionam que no veado catingueiro, este nervo, após emergir do forame isquiático maior, inerva além da musculatura glútea, os músculos bíceps da coxa, semimembranoso, semitendinoso e gastrocnêmio. Os resultados observados em ovinos Morada Nova, diferem do descrito por Vasconcelos et al. (14), em virtude de que no Morada Nova, o nervo isquiático não emitiu ramos aos músculos adutor, gêmeo e quadrado femoral e também do citado por Martins et al. (18), por não ocorrer a emissão de ramos ao músculo gastrocnêmio.

Tabela 1. Frequência percentual da distribuição do nervo isquiático pela musculatura no antímero direito (AD) correspondente.

Distribuição (Musculatura)	Número de ramos	Frequência/animal	%
M. Glúteobíceps	2	3	15
	3	12	60
	4	4	20
	5	1	5
M. Semitendinoso	1	10	50
	2	9	45
	3	1	5
M. Quadríceps da coxa	0	15	75
	1	4	20
	2	1	5
M. Semimembranoso	2	2	10
	3	16	80
	4	2	10

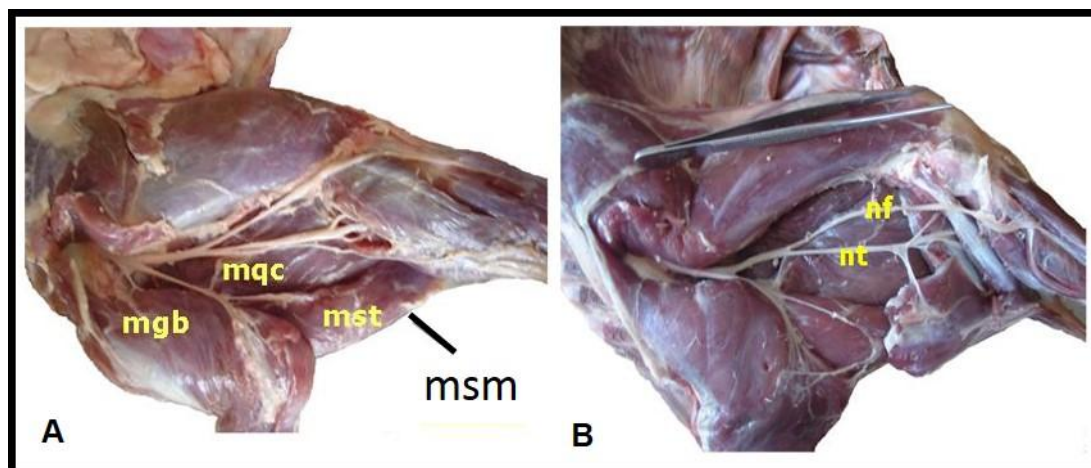


Figura 2. Distribuição do nervo isquiático do ovino pelo membro pélvico. Em A, observa-se o músculo glúteobíceps (mgb), semitendinoso (mst), quadríceps da coxa (mqc) e o músculo semimembranoso (msm). Em B, o nervo isquiático continuando-se como nervo fibular (nf) e nervo tibial (nt).

CONCLUSÃO

Foi possível observar diversificação no número de vértebras lombares e sacrais, variando entre seis e sete vértebras lombares e entre três e quatro sacrais. O nervo isquiático se originou mais frequentemente a partir de ramos ventrais do sétimo nervo lombar e dos dois primeiros nervos sacrais, sendo que ao longo de seu trajeto, forneceu ramos para os músculos gluteobíceps, semitendinoso, quadríceps da coxa e semimembranoso. O conhecimento dessas características anatômicas pode contribuir efetivamente para execução da clínica médica, evitando-se lesões neurológicas de ordem iatrogênica.

REFERÊNCIAS

1. Silva NV. O perfil do mercado consumidor na cadeia produtiva da carne ovina e caprina [Internet]. São Paulo: Farmpoint; 2008 [cited 2012 Aug 5]. Available from: <http://www.farmpoint.com.br/?noticiaID=45854eactA=7eareaID=1esecaoID=7>.
2. De Sá JM, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosci Methods*. 2004;136:45-53.
3. Ghoshal NG. Nervos espinhais. In: Getty R. Sisson e Grossman anatomia dos animais domésticos. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986. v.1, p.1068-9.
4. Schaller O, Constantinescu GM, Habel RE, Sack WO, Simoens P, de Vos NR. Illustrated veterinary anatomical nomenclature. 2nd ed. Stuttgart: Enke Verlag; 2007.
5. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJ. Tratado de anatomia veterinária. 3a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
6. Getty R. Sisson e Grossman anatomia dos animais domésticos. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986. v.2.
7. Lahunta A, Habel RE. Applied veterinary anatomy. Philadelphia: WB Saunders Company; 1986.
8. Betts CW, Crane SW. Manual de terapêutica cirúrgica dos pequenos animais. São Paulo: Manole; 1988.
9. Smith BP. Medicina interna de grandes animais. 3a ed. São Paulo: Manole; 2006.
10. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Nomina anatomica veterinária. 5th ed. Knoxville: World Association on Veterinary Anatomist; 2005.
11. Pirlot P. Morfologia evolutiva de los cordados. 6a ed. Barcelona: Omega; 1976.
12. König HE, Liebich HG. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. Porto Alegre: Artmed; 2011.
13. Schwarze E, Schröder L. Sistema nervioso: órganos de los sentidos. Zaragoza: Acribia; 1970. v.4.
14. Vasconcelos BG, Santos MCD, Santos AC, Viana DC, Honorato AGO, Pereira CCH, et al. Origin and distribution of the ischiatic nerve in mixed-breed sheep. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2014;51:102-10.
15. Lima EMM, Silva FOC, Severino RS, Drummond SS, Campos DB, Santana MIS, et al. Origem e distribuição dos nervos isquiáticos em caprinos da raça Saanen. *Cienc Rural*. 2008;38:372-7.

16. Ferraz RHS, Lopes GR, Melo APF, Prada ILS. Estudo anatômico da porção intrapélvica do nervo isquiático em fetos de bovinos azebuados. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2006;43:302-8.
17. Campos DB, Silva FOC, Severino RS, Drummond SS, Lima EMM, Bombonato PP, et al. Origem e distribuição dos nervos isquiáticos em fetos de bovinos azebuados. *Ars Vet.* 2003;19:219-23.
18. Martins TMM, Pereira KF, Lima FC, Santos ALQ, Malysz T. Origem e distribuição do nervo isquiático no veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). *Pesqui Vet Bras.* 2013;43:273-8.
19. Ellenberger W, Baum H. *Handbuch der vergleichenden anatomie der haustiere.* 18th ed. Berlin: Springer-Verlag; 1985.
20. Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Böhm BG. *Lehrbuch der anatomie der hustiere: nervensystem, sinnesorgane, endokrine, drüsen.* Berlin: Parey Verlag; 2004. v.4.
21. Guimarães GC, Machado MRF, Santos ALQ, Vieira LG, Souza AG, Silva JMM, et al. Origem e distribuição do nervo isquiático no gato doméstico (*Felis catus domesticus*, Linnæus, 1758). *Biosci J.* 2005;21:189-95.
22. Santos RC, Albuquerque JFG, Silva MCV, Moura CEB, Chagas RSN, Barbosa RR, et al. Anatomia do nervo isquiático em mocós (*Kerodon rupestris* WIED, 1820) aplicada a clínica de animais silvestres. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2006;43:647-53.
23. Oliveira GB, Rodrigues MN, Sousa ES, Albuquerque JFG, Moura CEB, Ambrósio CE, et al. Origem e distribuição dos nervos isquiáticos do preá. *Cienc Rural.* 2010; 40:1741-5.
24. Oliveira GB, Rodrigues MN, Sousa RS, Moura CEB, Miglino MA, Oliveira MF. Origin of the lumbosacral plexus in *Galea spixii* (Wagler, 1831) (Rodentia, Cavidae). *Biotemas.* 2014; 27: 107-115.
25. Machado ABM. *Neuroanatomia funcional.* 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2006.
26. Pereira KF, Paranaíba JFFS, Helrigle C, Araujo EG. Origem e distribuição anatômica do nervo isquiático de mão-pelada (*Procyon cancrivorus*). *Pesqui Vet Bras.* 2011;31:74-8.
27. Castro TF, Souza DAS, Silva Filho RP, Pereira MAM. Sistematização e distribuição da inervação lombar e sacral em *Arctocephalus australis*. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2009;46:404-11.
28. Cruz VS, Cardoso JR, Araújo LBM, Souza PR, Borges NC, Araújo EG. Aspectos anatômicos do plexo lombossacral de *Myrmecophaga tridactyla* (Linnaeus, 1758). *Biosci J.* 2014;30:235-44.

Recebido em: 27/05/2015

Aceito em: 28/09/2016

UTILIZAÇÃO DE DIETAS DE ALTO CONTEÚDO DE VOLUMOSOS SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM COELHOS¹

Luiz Carlos Machado¹
Walter Motta Ferreira²

RESUMO

As dietas com elevado conteúdo de volumosos, também denominadas de simplificadas e semi-simplificadas, são um novo conceito em cunicultura que associam economia e bem-estar intestinal. Para empregar-las é essencial a compreensão do processo digestivo e suas consequências sobre o trato digestório. Foram usados 56 animais NZB de 75 dias (abate), sendo uma dieta controle e seis dietas experimentais com elevada inclusão de volumosos, variando-se o nível de FDA e as fontes forrageiras. Foram avaliadas características de carcaça e intestinais, tomando-se como referência o peso absoluto e relativo dos órgãos. As dietas experimentais proporcionaram piora no peso da carcaça ($P < 0,05$). Também o rendimento de carcaça foi influenciado, onde a dieta com base em farinha das folhas de mandioca (FFM) apresentou os piores resultados ($P < 0,05$). As dietas alternativas proporcionaram elevação nas características de pesos relativos do tubo digestivo, estômago e intestino delgado ($P < 0,05$). O peso do ceco foi também influenciado e as dietas que continham FFM como fonte fibrosa, apresentaram valores superiores ($P < 0,05$). O peso do fígado foi influenciado e a dieta controle apresentou resultados superiores ($P < 0,05$). A redução no peso da carcaça e do fígado associadas a uma elevação no peso do sistema digestório devem ser consideradas antes da adoção deste tipo de programa de alimentação.

Palavras - chave: cunicultura, parte aérea da mandioca, sistema digestivo.

THE UTILIZATION OF DIETS WITH HIGHT CONTENT OF FORAGE ON THE WEIGHT OF THE ORGANS OF THE DIGESTIVE SYSTEM IN RABBITS

ABSTRACT

The diets with high content of forage, also known as simplified and semi-simplified, are a new concept in rabbit breeding that combine economy and intestinal welfare and it is essential the understanding of the process at gastrointestinal tract level. A total of 56 rabbits WNZ were used and these animals were 75 days (slaughtering). There were used a control diet and six experimental with high of forage, varying the ADF level and the forage sources. There were evaluated carcass and intestinal parameters, taking as reference the absolute and relative weight of organs. The experimental diets provided worsening in carcass weight ($P < 0.05$). Also carcass yield was influenced, where the diet based on cassava leaves flour (CLF) showed the worst results ($P < 0.05$). Alternative diets gave rise to the parameters of relative weight of gut, stomach and small intestine ($P < 0.05$). The weight of the cecum was also influenced and diets that had CLF showed greater weight ($P < 0.05$). Liver weight was affected and the control diet showed superior results ($P < 0.05$). The reduction in carcass weight and liver associated with an increase in the gastrointestinal tract weight should be considered before the adoption of this type of feeding program.

Keywords: aerial part of the cassava, digestive system, rabbit production.

¹ Professor do Instituto Federal Minas Gerais, Campus Bambuí. Contato principal para correspondência.

² Professor titular da Escola de Veterinária das UFMG.

UTILIZACIÓN DE DIETAS CON ELEVADO CONTENIDO DE VOLUMOSOS SOBRE EL PESO DE LOS ÓRGANOS DEL SISTEMA DIGESTIVO EN CONEJOS

RESUMEN

Las dietas con elevado contenido de volumosos para conejos, también llamadas simplificada o semi-simplificada, son un nuevo concepto en cunicultura y combinan economía y bienestar intestinal, siendo fundamental la comprensión del proceso a nivel del tracto gastrointestinal. 56 conejos de la raza Nueva Zelanda Blanca con 75 días de edad fueron utilizados, siendo una dieta llamada control y otras seis dietas experimentales con elevada inclusión de distintas fuentes de forraje, variando el contenido de FDA. Fueron evaluados parámetros de canal y del tracto intestinal, tomando como referencia el peso absoluto y relativo de órganos. Las dietas experimentales proporcionaron disminución en el peso de la canal ($P<0,05$). También hubo influencia sobre el rendimiento de la canal, donde la dieta a base de harina de hojas de yuca (HHY) presentó los peores resultados ($P<0,05$). Las dietas experimentales proporcionaron aumento en los parámetros de peso del tracto digestivo, peso del estómago y del intestino delgado ($P<0,05$). El peso del ciego también fue influenciado y dietas que contienen HHY como fibrosa presentaron mayor valor ($P<0,05$). El peso del hígado fue afectado y la dieta control mostró resultados superiores ($P<0,05$). La reducción en el peso de la canal y hepático asociada con un aumento en el peso del tracto gastrointestinal debe ser considerada antes de la adopción de este tipo de programa de alimentación.

Palabras claves: parte aérea de la yuca, aparato digestivo, cunicultura.

INTRODUÇÃO

O estudo das dietas com elevada inclusão de ingredientes fibrosos para coelhos vem sendo conduzido por vários pesquisadores (1-5) sendo essa dieta comumente denominada de simplificada. Os resultados experimentais obtidos até o momento são contraditórios, sendo, de maneira geral, inferiores a aqueles obtidos com a utilização de dietas tradicionais. É interessante observar que na administração desse tipo de dieta haverá redução da mortalidade dos animais devido à menor incidência de transtornos digestivos(1,6,7), sendo este efeito protetor explicado pela maior intensidade de estímulos para contrações íleo-cecais, evitando um tempo excessivo de retenção da digesta (6,7).

Quanto ao quesito economia, as dietas simplificadas podem ser uma alternativa rentável, pois seu custo é menor quando comparadas às dietas tradicionais. A fim de buscar o ponto de equilíbrio entre a máxima economia e o desempenho satisfatório do animal, Machado et al. (3) sugeriram a utilização de dietas semi-simplificadas, adicionando pequena quantidade de amido e proteína de boa qualidade nutricional, afim de proporcionar aporte mínimo de glicose e aminoácidos provindos de fontes tradicionais, visando melhoria geral do processo digestivo, principalmente da atividade fermentativa cecal. Faria et al. (4) sugerem a utilização de uma mistura de diferentes ingredientes forrageiros, visando complementaridade nutricional e melhoria da eficiência de utilização pelos animais.

Para melhor elaboração de dietas alternativas e maximização do desempenho produtivo, a compreensão do processo ao nível do sistema digestório é essencial. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da utilização de dietas simplificadas e semi-simplificadas sobre o peso dos órgãos do sistema digestório de coelhos em crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de metabolismo animal do departamento de Zootecnia, da EV-UFMG, Belo Horizonte, e durante o experimento as médias das temperaturas mínima e máxima foram de 20,8 e 26,7°C, respectivamente. As gaiolas utilizadas foram de arame galvanizado, de tamanho 0,30 x 0,60m, numa área disponível de 0,18m², sendo alojado um animal por gaiola. Anteriormente à chegada dos animais, as instalações foram limpas e desinfetadas com auxílio de vassoura de fogo. O bebedouro utilizado foi o do tipo chupeta automático e o comedouro semi-automático.

Os animais utilizados foram providos pela fazenda experimental prof. Hélio Barbosa, situada no município de Igarapé, MG, e consistiram de coelhos da raça Nova Zelândia Branca, desmamados aos 35 e abatidos aos 75 dias de idade, de ambos os sexos. Foram utilizados oito animais por dieta experimental, num total de 56 animais. A aprovação do comitê de ética animal (CETEA/UFMG) foi registrada sob o número 171/08.

Os tratamentos consistiram de sete dietas experimentais com diferentes níveis de inclusão de alimentos volumosos, sendo assim denominadas: REF: dieta controle; SFA: dieta simplificada com base na mistura de farinha das folhas de mandioca (FFM) e feno de alfafa (FAL); SSM: dieta semi-simplificada com base em feno do terço superior da rama da mandioca (FTSRM); SSA: dieta semi-simplificada com base em FAL; SSF: dieta semi-simplificada com base em FFM; SSFA: dieta semi-simplificada com base na mistura de FFM e FAL e SSMA: dieta semi-simplificada com base na mistura de FTSRM e FAL.

A dieta controle foi formulada para atender às exigências propostas por De Blas e Wiseman (8) e para as dietas simplificadas e semi-simplificadas, se procurou ao máximo, a aproximação das exigências citadas acima e quando não foi possível ajustar o conteúdo de ED, se procurou fornecer pelo menos 2200 kcal/kg, valor mínimo que permite aos coelhos regular o seu consumo em função da densidade energética da ração (8). Foram verificados os níveis totais dos aminoácidos lisina, metionina+cistina, treonina, triptofano e arginina, embora não fora necessária a adição dos três últimos. Para incremento do conteúdo energético da dieta e melhoria na digestibilidade dos demais nutrientes foi adicionado óleo de soja (1). Visando a melhoria da palatabilidade e da qualidade do pélete, foi adicionado também melão em pó. A composição percentual e nutricional das dietas experimentais se encontra na tabela 1. O pélete foi elaborado com 4 a 5mm de diâmetro e 10 a 15mm de comprimento. Durante o experimento, foi fornecida ração à vontade para os animais.

Análises químico-bromatológicas dos ingredientes fibrosos e dietas experimentais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da EV-UFMG, seguindo as metodologias propostas por Compêndio (9) e Van Soest et al. (10). A composição química dos demais ingredientes foi obtida a partir de Villamide et al. (11), Maertens et al. (12) e Rostagno et al. (13).

O abate foi realizado aos 75 dias de idade, pela manhã, a partir das 8 h. Para avaliação das características digestivas, após o sacrifício, foram retirados os órgãos intactos e assim obtidos, utilizando-se balança de precisão, o peso total do tubo digestivo (PTD), que considerou o estômago, intestino delgado e ceco, peso do ceco (PC), peso do estômago (PE) e peso do intestino delgado (PID) sendo todas essas medições realizadas logo após o abate e tomando como base o órgão repleto de conteúdo. Foi avaliado também o peso do fígado (PF). Além do peso absoluto, foi calculado também o peso relativo (%) tomando-se como base o peso do animal aos 75 dias de idade. Para determinação do peso da carcaça (PCA) os animais foram pesados após o sacrifício, sendo retirados pele, cabeça, rins, pulmões, sistema digestório, esôfago e traqueia, deixando-se o coração e o fígado. O rendimento de carcaça (RCA) foi determinado a partir da divisão do PCA pelo peso aos 75 dias, multiplicando-se o quociente por 100.

Tabela 1. Composição percentual e nutricional das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dietas experimentais						
	REF	SFA	SSM	SSA	SSF	SSFA	SSMA
Feno de alfafa	37,735	47,000	-	83,759	-	41,039	40,095
Farinha das folhas de mandioca	-	41,826	-	-	78,410	40,000	-
Feno terço superior da rama da mandioca	-	-	70,329	-	-	-	37,282
Milho	7,548	-	8,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Farelo de soja	4,184	-	10,000	0,043	6,874	5,525	6,020
Farelo de trigo	25,000	-	-	-	-	-	-
Óleo de soja	-	5,327	5,961	5,363	4,282	4,811	6,000
Milho desintegrado com palha e sabugo	20,000	-	-	-	-	-	-
Premix ¹	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Fosfato monoamônio	0,979	0,571	0,578	0,647	0,434	0,534	0,603
Sal comum	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Melaço em pó	2,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Bentonita	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Calcário	0,544	-	-	0,187	-	0,091	-
DL-metionina	0,011	-	-	-	-	-	-
Lisina-HCl	-	0,276	0,133	-	-	-	-
Princípios nutritivos	Composição analisada						
Matéria seca	91,31	91,12	91,12	91,18	90,17	90,26	90,89
Proteína bruta	15,15	17,13	17,42	16,41	17,76	19,55	17,47
Matéria mineral	8,43	9,56	9,04	9,77	7,93	8,62	9,47
FDN	36,35	32,95	46,53	42,16	31,26	33,71	41,30
FDA	16,46	23,76	27,71	25,52	23,74	23,83	26,67
NIDA (%FDA)	0,67	1,74	1,62	0,96	2,68	2,24	1,68
PB lignificada (%) ³	4,58	15,12	16,14	9,30	15,76	17,03	15,38
Hemiceluloses (FDN - FDA)	19,89	9,19	18,82	16,64	7,52	9,88	14,63
LDA	2,71	8,17	8,79	7,05	8,86	8,16	8,78
Celulose (FDA - LDA)	13,75	15,59	18,92	18,47	14,88	15,67	17,89
Relação LDA/Celulose	0,20	0,52	0,46	0,38	0,60	0,52	0,49
Cálcio	0,91	1,40	1,42	1,34	1,09	1,32	1,35
Fósforo	0,69	0,47	0,47	0,43	0,38	0,45	0,48
Energia bruta (kcal/kg)	3945	4391	4356	4214	4524	4294	4327
Energia digestível ² (kcal/kg)	2519	2394	2156	2204	2453	2326	2196

¹Vaccinar- composição do premix vitamínico/ mineral por Kg do produto: Vit. A, 2000000 UI; Vit. D3, 20000UI; Vit. E, 4000mg; Vit. K3, 722mg; Vit. B1, 400mg; Vit. B2, 1000mg; Vit. B6, 600mg; Vit. B12, 2000mcg; Niacina, 6000mg; Ácido fólico, 100mg; Ácido pantotênico, 3000mg; Biotina, 21mg; Colina, 100000mg; Selênio, 19mg; Iodo, 140mg; Cobalto, 200mg; Ferro, 20000mg; Cobre, 4000mg; Manganês, 4000mg, Zinco, 14000mg, Avilamicina 1000mg.

²ED (kcal/kgMS)= EB(kcal/kg MS) x (84,77 - 1,16 X %FDA MS)/100 (9)

³Se está denominando de PB lignificada àquela fração da PB contida na FDA

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com sete tratamentos e oito repetições sendo cada unidade experimental constituída de um coelho. As médias obtidas foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se os recursos do programa computacional SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o experimento não foram observadas diarreias ou quaisquer tipos de enfermidades digestivas. As Tabelas 2 e 3 apresentam os valores referentes às características de carcaça e digestivas, em relação ao peso absoluto e peso relativo respectivamente.

Tabela 2. Peso da carcaça, órgãos do tubo digestivo e fígado de acordo com as dietas experimentais.

Característica	Dietas							CV (%)
	REF	SFA	SSM	SSA	SSF	SSFA	SSMA	
PV75 (g)	2159,8a	1754,4bc	1924,0b	1914,9b	1623,4c	1933,6b	1898,1b	8,22
PCA (g)	1057,7a	826,0c	930,2b	894,4b	717,9c	907,1b	909,3b	12,49
PTD (g)	307,6a	348,9a	328,9a	363,1a	367,1a	371,8a	330,7a	13,64
PE (g)	63,6b	102,3a	93,6 ^a	109,0a	91,7a	85,6a	97,0a	21,70
PID (g)	108,0b	128,5a	117,0b	123,4b	145,0a	132,7a	118,8b	16,38
PF (g)	86,7a	53,4b	53,3b	61,2b	42,2b	53,6b	54,9b	19,19
PC (g)	131,6b	120,7b	115,4b	128,3b	128,2b	151,1a	117,2b	12,78

Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste SNK ao nível de 5% de probabilidade PV75: peso vivo aos 75 dias, PCA: peso da carcaça, PTD: peso do tubo digestivo (estômago, intestino delgado e ceco), PC: peso do ceco, PE: peso do estômago, PID: peso do intestino delgado, PF: peso do fígado.

Tabela 3. Pesos relativos da carcaça, órgãos do tubo digestivo e fígado de acordo com as dietas experimentais¹.

Característica	Dietas							CV (%)
	REF	SFA	SSM	SSA	SSF	SSFA	SSMA	
RCA (%)	49,0a	47,1 ^a	48,3a	46,6a	44,2b	46,9a	47,9a	13,64
POTD (%)	14,3d	20,0b	17,1c	19,0b	22,6a	19,2b	17,4c	8,99
POE (%)	3,00c	5,85 ^a	4,83b	5,70a	5,69a	4,42b	5,12b	18,91
POID (%)	5,00d	7,36b	6,08c	6,43c	8,94a	6,86c	6,25c	11,13
POF (%)	4,00a	3,05b	2,76b	3,20b	2,63b	2,77b	2,90b	14,13
POC (%)	6,10b	6,89ab	6,02b	6,77ab	7,87a	7,82a	6,18b	13,33

¹Para cálculo do peso relativo foi utilizado o valor de peso vivo final

Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste SNK ao nível de 5% de probabilidade RCA: rendimento de carcaça, POTD: porcentagem de tubo digestivo (estômago, intestino delgado e ceco), POC: porcentagem de ceco, POE: porcentagem de estômago, POID: porcentagem de intestino delgado, POF: porcentagem de fígado.

Os animais que recebiam as dietas simplificadas e semi-simplificadas apresentaram pior PCA ($P < 0,05$). Também o RCA foi influenciado pela dieta onde se verifica menor valor para o tratamento SSF. Nota-se que animais de inferior peso ao abate apresentam menor rendimento de carcaça, pois nessa situação o conteúdo relativo do sistema digestório, cabeça e pele tendem a ser maiores. Trocino et al. (14), aumentando o nível de amido e reduzindo os de FDA, perceberam diminuição linear do peso relativo do sistema digestório. Os valores de RCA aqui observados são muito próximos aos observados por Faria et al. (4) e inferiores a Fernandez-Carmona et al. (1). Piora no RCA foram observadas por Machado et al. (15) e Oliveira et al. (5). Fernandez-Carmona et al. (1) relaciona um maior valor de rendimento de carcaça com a elevação no conteúdo energético da dieta, normalmente associado a baixos níveis de fibra. No presente trabalho houve grande variação no conteúdo de FDA (16,46 a 27,71%). Em situações de déficit nutricional, o corpo animal prioriza os nutrientes disponíveis para manutenção e crescimento de órgãos vitais e assim a musculatura estriada que compõe grande parte da carcaça receberá menos quantidade de nutrientes. Dietas com maior conteúdo de fibra proporcionam maiores estímulos ao desenvolvimento do tubo digestivo o que favorece a um menor quociente entre a carcaça e o peso do animal vivo (14,16).

Pela observação das características de PTD, PID, POTD e POID, percebe-se tendência de aumento dos valores quando se eleva o teor de FDA. Chama-se atenção também para as dietas SSF, SFA e SSFA, que se destacaram nesses quesitos e que apresentam elevada inclusão de FFM, ingrediente que em seu processo de desidratação industrial foi submetido a temperaturas superiores a 100°C, havendo formação de complexos entre aminoácidos e carboidratos. Este fenômeno, denominado de reação de Maillard, provoca queda acentuada na absorção de nutrientes. Essas dietas apresentavam aroma caramelizado, característico após a ocorrência desta reação. Ainda neste sentido, Scapinello et al. (17) destacam que a parte aérea da mandioca apresenta taninos livres e condensados, substâncias que prejudicam a digestibilidade dos nutrientes, formando estruturas estáveis com as proteínas, indisponibilizando-as no trato gastrointestinal, reduzindo sua digestibilidade, além da inibição de enzimas digestivas (18). Com objetivo de favorecer a digestão e absorção de nutrientes o corpo animal se adapta a uma maior taxa de passagem associada a menor quantidade de nutrientes disponíveis. Dessa maneira a proporção do tubo digestivo foi maior nos animais que ingeriram dietas simplificadas e semi-simplificadas. Corroborando com os resultados aqui obtidos, Fernandez-Carmona et al. (1) verificaram maiores valores para POTD em animais que recebiam dietas simplificadas. Trocino et al. (14) perceberam redução linear no peso do sistema digestório quando se aumentou o nível de amido e se diminuiu os de FDA. Já Klinger et al. (19) variaram o conteúdo e a fonte de fibra das dietas e não perceberam diferenças para os mesmas características aqui avaliadas.

Com relação ao PC somente a dieta SSFA apresentou diferenças significativas e considerando a POC, além da SSFA, a SSF apresentou resultados superiores. Essas dietas continham elevada inclusão de FFM. Conforme citado por Gidenne (6) e Trocino et al. (7) a quantidade de material que adentra o ceco sofre influência do tipo de fibra e da granulometria das rações, dentre outros fatores. A análise de granulometria da FFM revelou que a maior parte é composta por partículas muito finas, menores que 0,60 mm, o que contribuiu para maior peso do ceco cheio. Também Arruda et al.⁽¹⁶⁾ perceberam diferenças no PC, havendo efeito dos constituintes da parece celular dos diferentes ingredientes estudados sobre o tempo de retenção. Klinger et al. (19) e Klinger et al. (20) variaram a fonte de fibra, não percebendo diferenças para o peso do ceco.

A dieta controle proporcionou menores PE e POE ($p < 0,05$) o que corrobora com os achados de Fernandez-Carmona et al. (1), e Arruda et al. (16). Já Klinger et al. (19) e Klinger et al. (20) não perceberam diferenças entre o peso do estômago quando foi variada a fonte fibrosa. Em linhas gerais, a partir do incremento no teor de FDA das dietas haverá elevação no consumo dos animais favorecendo o aumento no peso e na proporção do estômago, havendo ainda maior distensão gástrica.

Maiores PF e POF foram observados no tratamento controle, como também verificado por Fernandez-Carmona et al. (1) e Arruda et al. (16). O fígado é o órgão central do metabolismo e quando se utilizam dietas com alto nível de inclusão de ingrediente fibrosos, há elevação no conteúdo de fatores antinutricionais, elevação na taxa de passagem e diminuição do volume de nutrientes absorvidos, havendo assim menor taxa de metabolismo, razão pela qual o órgão apresenta menor peso. Outro fator que contribui para isso é a menor deposição de glicogênio hepático quando se utiliza esse tipo de dieta, que possui nula ou baixa inclusão de cereais e baixo teor de amido. Confirmando essa hipótese, pode-se perceber que a maior parte das dietas que usavam milho obtiveram maior peso do fígado quando comparados à dieta SFA, que não continha esse cereal. Arruda et al. (16) perceberam maior peso de vísceras comestíveis (fígado + coração) para animais que recebiam maior quantidade de amido. Para contrabalancear o efeito da baixa quantidade de carboidratos não estruturais o animal aumenta seu consumo até atingir um limite físico.

CONCLUSÕES

Animais alimentados com dietas com elevada inclusão de volumosos apresentam maior peso relativo do sistema digestório, influenciado pelo maior nível de fibra e menor disponibilidade de nutrientes. A adoção de um programa nutricional com dietas simplificadas e semi-simplificadas pode ser interessante para aumentar o peso do sistema digestivo de primíparas, aumentando também sua capacidade de consumo de matéria seca. Contudo, a introdução desse programa pode ser prejudicial ao tamanho do fígado dos animais bem como rendimento de carcaça. Novos experimentos devem ser conduzidos para melhor compreensão do tema, principalmente sobre o ponto de vista econômico.

REFERÊNCIAS

1. Fernandez-Carmona J, Bernat F, Cervera C, Pascual JJ. High lucerne diets for growing rabbits. *World Rabbit Sci.* 1998;6(2):237-40.
2. Pascual JJ, Cervera C, Fernandez-Carmona J. A feeding programme for young rabbit does based on lucerne. *World Rabbit Sci.* 2002;10(1):7-13.
3. Machado LC, Ferreira WM, Faria HG, Scapinello C, Alves CSA. Avaliação da dieta simplificada com base em feno de alfafa para coelhas reprodutoras. *Vet Zootec.* 2007;14(2):291-9.
4. Faria HG, Ferreira WM, Scapinello C, Oliveira CEA. Efeito da utilização de dietas simplificadas, à base de forragem, sobre a digestibilidade e o desempenho de coelhos Nova Zelândia. *Rev Bras Zootec.* 2008;37(10):1797-801.
5. Oliveira AFG, Scapinello C, Martins EM, Jobim CC, Monteiro, AC, Figueira JL. Efeito de dietas semi-simplificadas formuladas com subprodutos de mandioca ensilados ou não sobre o desempenho e características de carcaça de coelhos. *Acta Sci Anim Sci.* 2011;33(1):59-64.
6. Gidenne T. Recent advances in rabbit nutrition: emphasis on fibre requirements, a review. *World Rabbit Sci.* 2000;8(1):23-32.
7. Trocino A, Garcia J, Carabaño R, Xiccato G. A meta-analysis on the role of soluble fibre in diets for growing rabbits. *World Rabbit Sci.* 2013;21(1):1-15.
8. De Blas C, Wiseman J. *The nutrition of the rabbit.* 4th ed. Cambridge: CAB International; 2010.
9. *Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal.* São Paulo: Sindirações; 2005.
10. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 1991;74(10):3583-97.
11. Villamide MJ, Maertens L, De Blas C. Feed evaluation. In: De Blas C, Wiseman J. *The nutrition of the rabbit.* 4th ed. Cambridge: CAB International; 2010. p.151-62.
12. Maertens L, Perez JM, Villamide M, Cervera C, Gidenne T, Xiccato G. Nutritive value of raw materials for rabbits: Egran tables 2002. *World Rabbit Sci.* 2002;10(4):157-66.

13. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. 3th ed. Viçosa: UFV; 2011.
14. Trocino A, Fragkiadakis M, Majolini D, Carabaño R, Xiccato G. Effect of increase of dietary starch and soluble fibre on digestive efficiency and growth performance of meat rabbits. *Anim Feed Sci Technol.* 2011;165(3):265-77.
15. Machado LC, Ferreira WM, Faria HG, Scapinello C, Alves CSA, Oliveira CEA, et al. Evaluation of the productive performance of growing rabbits of 30 days to slaughter fed with simplified diets with base on forage. In: *Proceedings of the 3rd Rabbit Congress of the Americas; 2006; Maringá. World Rabbit Sci.* 2006;15:48.
16. Arruda AMV, Lopes DC, Ferreira WM, Rostagno HS, Queiroz AC, et al. Desempenho e características de carcaça de coelhos alimentados com rações contendo diferentes níveis de amido e fontes de fibra. *Rev Bras Zootec.* 2003;32(6):1311-20.
17. Scapinello C, Falco JE, Furlan AC, Faria HG. Valor nutritivo do feno da rama de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) para coelhos em crescimento. *Rev Bras Zootec.* 1999;28(5):1063-7.
18. McDougall G, Morrison IM, Stewart D, Hillman JR. Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *J Sci Food Agric.* 1996;70:133-50.
19. Klinger ACK, Toledo GSP, Silva LP, Marchke F, Chimainki M, Siqueira L. Bagaço de uva como ingrediente alternativo no arraçoamento de coelhos em crescimento. *Cienc Rural.* 2013;43(9):1654-9.
20. Klinger ACK, Toledo GSP, Eggers DP, Pretto A, Chimainski M, Silva LP. Casca de soja em dietas para coelhos em crescimento. *Cienc Rural.* 2015;45(1):98-103.

Recebido em: 13/06/2016

Aceito em: 05/10/2016

***Toxoplasma gondii*: SOROPREVALÊNCIA EM OVINOS COM APTIDÃO LEITEIRA NA MESORREGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA, BRASIL**

Renata Arruda Ossani¹
Anderson Barbosa de Moura
Michelle Federle
Antonio Pereira de Sousa
Marcio Orides
Amelia Sartor
Humberto Alcides Toaldo

RESUMO

Os ovinos são acometidos por diversas parasitoses, entre elas a toxoplasmose, que apresenta implicações sanitárias importantes por ser uma zoonose. Infecções humanas pelo consumo de leite caprino não pasteurizado já foram registradas. O objetivo do presente trabalho foi determinar a ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em rebanhos ovinos leiteiros na região Oeste de Santa Catarina. No período de Março a Julho de 2013, foram colhidas 298 amostras de sangue de ovinos com aptidão leiteira em duas propriedades no município de Chapecó, Oeste de Santa Catarina. As amostras foram processadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI, $\geq 1:64$). Do total de amostras avaliadas, 37 (12,4%) foram positivas. Os títulos observados foram 1:64 (32) e 1:256 (cinco). Os resultados demonstraram que a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos com aptidão leiteira, no Oeste de Santa Catarina, é menor que a observada em ovinos de corte, possivelmente pelo manejo sanitário mais intenso, comum em rebanhos leiteiros.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, ovinos leiteiros, RIFI, Santa Catarina.

***Toxoplasma gondii*: SEROPREVALENCE IN DAIRY SHEEP IN WEST MESORREGION OF STATE OF SANTA CATARINA, BRAZIL**

ABSTRACT

The sheep are affected by various parasites, including toxoplasmosis that has important health implications because it is a zoonotic disease. Human infections by the consumption of unpasteurized goat's milk have been recorded. The aim of this study was to determine the occurrence of antibodies anti-*Toxoplasma gondii* in dairy sheep flocks in western Santa Catarina mesorregion. From March to July 2013, 298 blood samples from dairy sheep flocks were taken on two farms in Chapecó, west of state of Santa Catarina, Brazil. Samples were processed by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA, $\geq 1:64$). Of the samples tested, 37 (12.4%) were positive. The titers observed were 1:64 (32) and 1:256 (five). The results showed that the occurrence of antibodies against *T. gondii* in dairy sheep, in the west of Santa Catarina, is lower than that observed in beef sheep, possibly due to more intensive health sanitary management, common in dairy herds.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, dairy sheep, IFA, State of Santa Catarina.

¹ Universidade do Estado de Santa Catarina. Contato para correspondência.

***Toxoplasma gondii*: SEROPREVALENCIA EN OVEJAS CON APTITUD DE LECHE EN OESTE SANTA CATARINA MESORREGIÃO, BRASIL**

RESUMEN

Las ovejas se ven afectadas por diversos parásitos, incluyendo la toxoplasmosis, que tiene implicaciones importantes para la salud, ya que es una zoonosis. Las infecciones humanas de consumo de leche cabra no pasteurizada se han registrado. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de anticuerpos contra el *Toxoplasma gondii* en rebaños de ovejas de leche en la región occidental de Santa Catarina. En el período de marzo a julio de 2013, 298 muestras de sangre de las ovejas con aptitud lechera se tomaron en dos propiedades en Chapecó, oeste Santa Catarina. Las muestras fueron procesadas por inmunofluorescencia Reacción (IFA, $\geq 1: 64$). Del total de muestras analizadas, 37 (12,4%) fueron positivos. Los títulos observados fueron 1:64 (32) y 1: 256 (cinco). Los resultados mostraron que la presencia de anticuerpos contra *T. gondii* en ovejas de aptitud lechera en el oeste de Santa Catarina, es inferior a la observada en las ovejas de carne, posiblemente, el más intenso de gestión sanitaria, común en los hatos lecheros.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, ovejas lecheras, IFAT, Santa Catarina.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial que acomete o ser humano e outros animais homeotérmicos, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (1). Os felídeos são os únicos hospedeiros que eliminam os oocistos pelas fezes (2), contaminando o ambiente e propagando a infecção (3). Apresenta alta prevalência em muitas áreas do mundo, tendo importância na medicina humana e na veterinária (4).

O *T. gondii* desde 1954, é apontado como um dos agentes causadores de abortamento na espécie ovina, sendo a maior causa de problemas reprodutivos desta espécie (5). A contaminação da espécie ovina com o *T. gondii* normalmente acontece pela ingestão de água ou de alimentos contaminados com oocistos excretados nas fezes de felídeos (6,7).

Fatores de risco associados à infecção em ovinos parecem estar relacionados com dieta, sexo, sistema de criação e a presença de gatos na fazenda (8-11).

Nos últimos anos, o interesse acerca da infecção toxoplásmica em pequenos ruminantes, devido ao seu papel na transmissão do protozoário ao ser humano, por meio do consumo de produtos de origem animal, tem aumentado (12,13). O agente pode ser transmitido pelo consumo de carne crua ou mal cozida e de leite “in natura”, procedentes de animais infectados (14-16).

O diagnóstico de toxoplasmose pode ser realizado por testes sorológicos (RIFI, ELISA, MAT), necropsias de fetos abortados, exames histopatológico e imunoistoquímico e da reação em cadeia da polimerase (PCR) (17).

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a soroprevalência por meio da detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii* e identificar fatores de risco para a infecção em ovinos com aptidão leiteira na mesorregião Oeste de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na região Oeste do Estado de Santa Catarina, em duas propriedades criadoras de ovinos com aptidão leiteira (raça Lacoune), na cidade de Chapecó. Foram colhidas, no período de fevereiro a abril de 2013, 298 amostras de sangue de ovinos (128 fêmeas em lactação, 155 fêmeas secas e 15 machos). A amostragem foi constituída

considerando-se uma prevalência esperada de 50%, erro de 5,0% e nível de confiança de 90% (18). Na data da colheita, do sangue foi aplicado questionário epidemiológico contemplando manejo e possíveis fatores de risco como raça, sexo, idade, dieta principal, contato com gatos, contato com outros animais, fonte de água, problemas reprodutivos e/ou neurológicos, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os soros foram submetidos à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii*, conforme técnica descrita por Camargo (19), utilizando-se como antígenos taquizoítos da cepa RH do protozoário. Os soros dos ovinos foram diluídos em PBS, utilizando 1:64 como ponto de corte (20). As amostras positivas foram submetidas à titulação por diluição sequencial, em múltiplos de quatro, até a máxima diluição reagente.

Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente pelos testes exato de Fisher e qui-quadrado ($p \leq 0,05$) (21) para correlacionar os resultados da sorologia com as variáveis analisadas (raça, sexo, idade, dieta principal, contato com gatos, contato com outros animais, fonte de água, problemas reprodutivos e/ou neurológicos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de ovinos avaliados para pesquisa de anticorpos IgG contra *T. gondii*, 12,41% (37/298) foram positivos. Os títulos de anticorpos foram 1:64 (trinta e duas) e 1:256 (cinco). A amostragem foi constituída somente por animais adultos para evitar a detecção de anticorpos colostrais que poderia influenciar na prevalência observada (22).

Apesar da ocorrência de possíveis reações cruzadas, muitos autores utilizam a diluição 1:16 como ponto de corte para a pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* pela RIFI (5,23). No presente trabalho, foram considerados positivos os soros ovinos que apresentam reação na diluição 1:64 (19), que aumenta a especificidade da técnica, diminuindo assim, possíveis resultados falso positivos, sendo utilizada por vários autores (20,24,25).

Embora a presença de anticorpos, isoladamente, não implique em infecção ativa, a relação entre soropositividade e a presença de cistos teciduais de *T. gondii* em tecidos ovinos é estatisticamente significativa, conforme demonstram os resultados de Yldz et al. (26), corroborando assim a importância de estudos de soroprevalência nesta espécie.

Os estudos acerca da prevalência da toxoplasmose em ovinos exclusivamente com aptidão leiteira, são escassos. Valores superiores aos do presente estudo foram relatados na Grécia por Tzanidakis et al. (27), que observaram, utilizando a técnica de ELISA, alta prevalência (48,6%) em rebanhos ovinos leiteiros. Esses autores identificaram o manejo intensivo ou semi-intensivo ao qual os animais eram submetidos, como fator de risco. O oferecimento de concentrado e de água de poço (ou seja, água não corrente) favoreceria a contaminação destes por oocistos. Ainda, a alta densidade poderia contribuir para uma maior taxa de infecção entre esses animais.

Também na Grécia, Diakou et al. (28), detectaram 53,71% de positividade (ELISA) em ovelhas de leite. Embora concordem com Tzanidakis et al. (27), sugerindo que o manejo semi-intensivo possa ser o responsável pelos altos índices observados, os autores não fizeram análise de fatores de risco. Na região da Toscana na Itália, investigando 33 rebanhos de ovinos leiteiros, pela técnica de RIFI ($\geq 1:64$), Cenci-Goga et al. (29) encontraram 33,3% % de positivos. Esses autores não identificaram os fatores de risco para a infecção.

Na Argentina, em um estudo com rebanho ovino leiteiro (RIFI, 1:50), anticorpos contra *T. gondii* foram detectados em 17,3% (122/704) dos animais (30). Esse resultado, embora semelhante ao do presente estudo (12,4%), foi obtido com o emprego de um ponto de corte menor e, ao contrário dos nossos resultados, a maioria das amostras positivas para *T. gondii* (42,6% - 52/122) apresentavam títulos de anticorpos $\geq 1:400$, indicando infecção ativa.

Não foi observada correlação ($P>0,05$) entre a sorologia positiva para *T. gondii* e as variáveis analisadas (raça, sexo, idade, dieta principal, contato com gatos, contato com outros animais, fonte de água, problemas reprodutivos e/ou neurológicos). Embora 91,9% dos positivos sejam fêmeas, a distribuição dos sororreagentes de acordo com o sexo (13% dos machos e 12,4% das fêmeas foram positivos) não configura associação, e somente 7,72% dos animais avaliados eram machos. Com relação à idade, embora 94,6% (35/37) dos animais positivos tinham entre um e dois anos, esse grupo representou 89,93% dos animais testados (268/298), não indicando associação. As demais variáveis analisadas apresentaram resultados distribuídos de forma uniforme.

Em vários estados brasileiros existem estudos relatando a sorologia de *T. gondii* em rebanhos ovinos de corte, que apontam prevalência variando entre 7,7% e 54,6% (11,31-37). A amplitude dos resultados relatados pode ser consequência da idade, alimentação, sexo, sistema de criação e a presença de gatos na fazenda (8-11).

Possivelmente, devido ao manejo intensivo, incluída aí a assistência veterinária frequente, ao qual os rebanhos ovinos leiteiros são submetidos, nossos resultados revelaram uma soroprevalência menor em ovinos com aptidão leiteira, no Oeste de Santa Catarina que aquela observada em ovinos de corte (56,9%) no Estado (38). Cosendey-KezenLeite et al. (39) também verificaram que, em criações intensivas, a soroprevalência da toxoplasmose ovina é significativamente menor.

CONCLUSÃO

A soroprevalência de anticorpos contra *T. gondii* em ovinos leiteiros da mesorregião Oeste do estado de Santa Catarina é de 12,41%, menor que aquela observada em ovinos destinados ao abate, no estado de Santa Catarina, e em animais com aptidão leiteira em outras regiões do mundo.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do CAV/UDESC sob protocolo - 1.03.12.

APOIO E FINANCIAMENTO: FAPESC, CAPES.

REFERÊNCIAS

1. Amendoeira MRR, Costa T, Spalding SM. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. Rev Souza Marques. 1999;1:15-35.
2. Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. J Parasitol. 2008;38:1257-78.
3. Amendoeira MRR. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. An Acad Nac Med. 1995;155:224-5.
4. Tenter AM, Heckroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30:1217-58.
5. Silva AV, Cunha ELP, Meireles LR, Gottschalk S, Mota RA, Langoni H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. Cienc Rural. 2003;33:115-9.

6. Escopelli KS. Avaliação sorológica de anticorpos da classe IgG para *Toxoplasma gondii* em soros de ovinos da região da Grande Porto Alegre/RS, através das técnicas de hemaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI) [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
7. Pugh DG. Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca; 2004.
8. Klun I, Djurkovic-Djurkovic O, Katic-Radiovojevic S, Nikolic A. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet Parasitol.* 2006;135:121-31.
9. Samra NA, McCrindle CM, Penzhorn BL, Cenci-Goga B. Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 2007;78:116-20.
10. Pinheiro Jr JW, Mota RA, Oliveira AA, Faria EB, Gondim LF, Silva AV, et al. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. *Parasitol Res.* 2009;105:709-15.
11. Lopes WDZ, Santos TR, Silva RS, Rossanese WM, Souza FA, Faria Rodrigues JD, et al. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. *Res Vet Sci.* 2010;88:104-6.
12. Ueno TE, Gonçalves VS, Heinemann MB, Dilli TL, Akimoto BM, Souza SM, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from federal District, central region of Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2009;41:547-52.
13. Rossi GF, Cabral DD, Ribeiro DP, Pajuaba ACAM, Corrêa RR, Moreira RQ, et al. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais state, Brazil, by different serological methods. *Vet Parasitol.* 2011;175:252-9.
14. Dubey JP, Sharma SP. Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol.* 1980;66:111-4.
15. Chiari CA, Neves DP. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984;79:337-40.
16. Figueiredo JF, Silva DA, Cabral DD, Mineo JR. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the Indirect Haemagglutination, Immunofluorescence and Immunoenzymatic Tests in the Region of Uberlândia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:687-92.
17. Pereira-Bueno J, Quinalha-Gozalo A, Pérez-Pérez V, Alvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet Parasitol.* 2004;121:33-43.
18. Organización Panamericana de la Salud. Bioestadística: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud; 1979. (n. 18).

19. Camargo ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev Bras Patol Clín. 1964;10:143-69.
20. Figliuolo LPC, Kasai N, Ragozo AMA, De 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.
21. R Development Core Team. A language and environment for statistical computing [Internet]. Minneapolis: R Foundation for Statistical Computing; 2009 [cited 2014 Ago 18]. Available from: <http://www.R-project.org>.
22. West M, Venturini C, Passucci J, González C, Bacigalupe D. Seroconversion against *Toxoplasma gondii* in 3- to 4-month-old female dairy sheep. Vet Argent. 1998;15:176-9.
23. Mainard RS, Modolo JR, Stachissini AVM, Padovani CR, Langoni H. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36:759-61.
24. van der Puije WN, Bosompem KM, Canacoo EA, Wastling JM, Akanmori BD. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. Acta Trop. 2000;76:21-6.
25. Cavalcante ACR. Toxoplasmose caprina no Ceará: soropidemiologia e caracterização de cepas de *Toxoplasma gondii* [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.
26. Yildiz K, Kul O, Gökpinar S, Atmaca HT, Gençay YE, Gazyağci AN, et al. The relationship between seropositivity and tissue cysts in sheep naturally infected with *Toxoplasma gondii*. Turk J Vet Anim Sci. 2014;38:169-75.
27. Tzanidakis N, Maksimov P, Conraths FJ, Kioussis E, Brozos C, Sotiraki S, et al. *Toxoplasma gondii* in sheep and goats: seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. Vet Parasitol. 2012;190:340-8.
28. Diakou A, Papadopoulos E, Panousis N, Karatzias C, Giadinis N. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* seroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming. Vet Parasitol. 2013;198:387-90.
29. Cenci-Goga BT, Ciampelli A, Sechi P, Veronesi F, Moretta I, Cambiotti V, et al. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. BMC Vet Res. 2013;9:9-25.
30. Hecker YP, Moore DP, Manazza JA, Unzaga JM, Späth EJ, Pardini LL, et al. First report of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy sheep from Humid Pampa, Argentina. Trop Anim Health Prod. 2013;45:1645-7.
31. Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. Cienc Rural. 1999;29:91-7.

32. Gondim LFP, Barbosa Jr HV, Ribeiro Filho CH, Saeki H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. *Vet Parasitol.* 1999;82:273-6.
33. Silva AV, Langoni H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol.* 2001;97:191-8.
34. Meireles LR, Galisteo Jr AJ, Andrade Jr HF. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2003;40:267-71.
35. Ogawa L, Navarro IT, Freire RL, Oliveira RC, Vodotto OP. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos da região de Londrina no Estado do Paraná. *Semina Cienc Agrar.* 2003;24:57-62.
36. Romanelli PR, Freire RL, Vidotto O, Marana ER, Ogawa L, De Paula VS, et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná state, Brazil. *Res Vet Sci.* 2007;82:202-7.
37. Soares HS, Ahid SMM, Bezerra ACDS, Pena HFJ, Dias RA, Gennari SM. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;160:211-4.
38. Sakata FBLS, Bellato V, Sartor AA, Moura AB, Souza AP, Farias JA. *Toxoplasma gondii* antibodies sheep in Lages, Santa Catarina, Brazil, and comparison using IFA and ELISA. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012;21:197-8.
39. Cosendey-KezenLeite RI, Oliveira FC, Frazão-Teixeira E, Dubey JP, Souza GN, Ferreira AM, et al. Occurrence and risk factors associated to *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Rio de Janeiro, Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2014;46:1463-66.

Recebido em: 03/07/2015

Aceito em: 06/10/2016

BEM ESTAR DE EQUINOS DE TRACÇÃO E PERFIL SÓCIO-ECONÔMICO DOS CARROCEIROS DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL

Luís Antônio Sangioni¹
Gustavo Cauduro Cadore¹
Sônia de Avila Botton¹
Fernanda Silveira Flores Vogel¹
Sergio da Silva Fialho²
Felipe Lamberti Pivotto²
Marinês Lazzari²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de bem estar dos equinos de tração em Santa Maria, RS, e verificar o perfil sócio-econômico dos seus respectivos proprietários, vinculados ao projeto de extensão “Programa de Ação Social Amigos dos Carroceiros” (PASAC). Este estudo possui característica descritiva e retrospectiva, onde os dados primários foram coletados durante as atividades desenvolvidas no PASAC, desenvolvido pelo curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, no período de março de 2011 a dezembro de 2013. Foram cadastrados 191 equinos de 123 famílias, sendo que, nenhum destes animais apresentava raça definida, tendo em sua maioria, idade acima dos 11 anos (45,6%, 87/191). Quanto à condição corporal, 58,6% (112/191) dos animais apresentavam aspecto de magro à regular, 33% (63/191) possuíam bom estado aparente e 8,4% (16/191) eram obesos. Entre as principais afecções clinicamente diagnosticadas no PASAC destacaram-se: desordens nutricionais, escoriações, conjuntivites, parasitoses, doenças infecto contagiosas, anemias, afecções músculo esqueléticas e pulmonares. A maior parte dos carroceiros (54,5%, 67/123) atendidos apresentava faixa etária entre 21 a 40 anos, ficando a eles a responsabilidade das atividades de trabalho e dos cuidados dos animais. Quanto ao nível de escolaridade 9,8% (12/123) não eram alfabetizados, 71,5% (88/123) possuíam o ensino fundamental incompleto e 18,7% (23/123) possuíam o ensino fundamental completo. Diante do perfil constatado, ações sociais e educativas devem ser incentivadas, com o objetivo de proporcionar uma melhor qualidade de vida dos carroceiros, bem como a promoção de programas visando o bem estar dos equinos de tração.

Palavras-chave: ação social, trabalho informal, tração animal, cavalos, veterinários.

WELFARE OF DRAUGHT HORSES AND ECONOMIC SOCIAL ASPECTS OF THE CARTERS OF SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL STATE

ABSTRACT

The objective of this study was evaluate the conditions of the welfare of the draught horses in Santa Maria, central region of the Rio Grande do Sul state, and verify the economic social aspect of their owners. Data were collected during activities in the social project “Programa de Ação Social Amigos dos Carroceiros” (PASAC) (equivalent to “Social Program Carters Friend”) developed by the Veterinary Medicine college at Universidade Federal de Santa Maria, from March 2011 to December 2013. One hundred and ninety-one horses, belonging

¹ Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. Contato para correspondência.

² Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

to 123 families were registered in the PASAC. None of these animals showed breed and the age of most animals was 11 years old (45.6% - 87/191). In the assessment of body condition, 58.6% (112/191) of the animals had slim to regular aspect, 33% (63/191) had good shape and 8.4% (16/191) were obese. The main clinical affections diagnosed included: nutritional disorders, abrasions, conjunctivitis, parasites, infectious diseases, anemia, pulmonary, and skeletal muscle disorders. The majority of carters (54.5% - 67/123) were 21 to 40 years old, and they had a responsibility with work and care of animals. The education level of carters observed was: 9.8% (12/123) were illiterate, 71.5% (88/123) had incomplete elementary education and 18.7% (23/123) had elementary school. Based on the evidenced profile, social and educational measures need to be encouraged, with the aim of providing a better quality of life for carters, as well as programs promoting the welfare of draught horses.

Keywords: social activity, informal job, animal traction, horses, veterinarians.

BIEN ESTAR DE LOS CABALLOS DE TRACCIÓN Y PERFIL SOCIO-ECONÓMICO DE LOS CARRETEROS DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar las condiciones de bien estar de los caballos de tracción en Santa Maria, Rio Grande do Sul y comprobar el perfil socio-económico de sus respectivos propietarios, vinculado al proyecto de extensión "Programa de Ação Social Amigos dos Carroceiros (PASAC)" desarrollado por los estudiantes del curso de Medicina Veterinaria de la Universidad Federal de Santa María (UFSM). Este estudio tiene característica descriptivo y retrospectivo, donde se recogieron los datos primarios durante las actividades realizadas en PASAC, de 13 de marzo 2011 a diciembre de 2013. Se han registrado 191 caballos de 123 familias, y ninguno de estos animales habían raza. En suma yoría tenían edades mayores de 11 años (45,6%, 87/191). Para la condición corporal, 58,6% (112/191) de los animales tenían La apariencia delgada a regular, 33% (63/191) tuvo buen estado y 8,4% (16/191) eran obesos. Los principales estados patológicos clínicamente diagnosticados fueron: trastornos nutricionales, abrasiones, conjuntivitis, parasitosis, enfermedades infecciosas contagiosas, anemia y trastornos músculo esquelético y de pulmón. La mayoría de los carreteros (54,5%, 67/123) habían edades comprendidas entre 21 y 40 años, con virtién dose em la responsabilidad de las actividades de trabajo y el cuidado de los animales. Cuanto al nivel de estúdios, 9,8% (12/123) eran analfabetos, 71,5% (88/123) tenían educación primaria incompleta y 18,7% (23/123) habían completado la escuela primaria. Con base en estos resultados, las actividades sociales y educativas deben ser alentados, con el fin de proporcionar una mejor calidad de vida para los carreteros y deben promover programas para el bien estar de los caballos de tracción.

Palabras clave: acción social, de trabajo informal, de tracción animal, caballos, veterinarios.

INTRODUÇÃO

Desde o final da década de 70, o Brasil vem sofrendo um processo de reestruturação produtiva, onde a indústria brasileira avançou em sua modernização com ênfase na informatização, robotização e racionalização organizacional, gerando altas taxas de desemprego. Como consequência houve redução dos empregos assalariados com registros legais, aumento e intensificação do trabalho informal, principalmente com o uso da mão de obra familiar (1). Devido a isso, cidadãos que não têm acesso a estas melhorias, acabam se tornando marginalizados e excluídos da sociedade, sem acesso aos bens de consumo e

serviços básicos, sem oportunidade de emprego formal, ficando subordinados ao subemprego ou ao emprego informal. Esta situação gera famílias que vivem em situação de vulnerabilidade social, ou seja, situações decorrentes da pobreza, do abandono, da dependência química, de maus tratos físicos e psicológicos, tanto humanos quanto animal. Além disso, se destacam os problemas de saúde, como as zoonoses, decorrentes da interação homem-animal-meio ambiente. Desta forma, a atuação de profissionais envolvidos na saúde sanitárias das comunidades (2).

Nos empregos informais, incluem-se o trabalho dos carroceiros, que são cidadãos comuns, que fazem uso de tração animal, sendo responsáveis pela coleta e transporte de grande parte do entulho originado da construção civil, limpeza de jardins, utensílios domésticos descartados, pequenos fretes com a utilização das carroças como meio de transporte e a reciclagem do lixo urbano (3). A maioria dos carroceiros, nos países em desenvolvimento, ainda não favorece uma condição de bem estar aos seus animais de trabalho, sendo muitas vezes necessária intervenção de profissionais qualificados para o desenvolvimento de programas educacionais, a fim de melhorar a condição zoonosológica dos animais e proporcionar uma maior eficiência do trabalho e aumento da renda familiar (4). Alguns equipamentos utilizados no domínio dos equinos podem afetar diretamente o bem estar e a sanidade dos animais (5,6). A utilização de equídeos para a tração de carga constitui-se numa prática socialmente aceita, desde que respeitadas às necessidades e características dos animais, porém a exposição desses às condições insalubres, carências nutricionais, ferimentos, cargas excessivas e ferrageamentos incorretos, ocasionam a rejeição social desta prática e requerem proteção legal (7). Entre as recomendações para melhorar o bem estar destes animais devem incluir a promoção da educação aos proprietários nos requisitos nutricionais e nas práticas de manejo a melhoraria das condições dos equipamentos dos animais e aplicação das leis que regulamentem o bem estar animal (5).

Na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), realizam-se importantes atividades de pesquisa, ensino e extensão no curso de Medicina Veterinária promovendo o bem estar animal. Dentre os projetos de extensão à comunidade destaca-se o “Programa de Ação Social Amigos dos Carroceiros” (PASAC). A finalidade do PASAC foi promover uma visão de posse responsável dos equinos, melhorar a condição física desses cavalos e proporcionar um melhor rendimento no trabalho e despertar a atenção dos carroceiros para o bem estar dos seus animais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de bem estar dos equinos de tração em Santa Maria, RS, e verificar o perfil sócio-econômico dos seus respectivos proprietários, vinculados ao projeto de extensão PASAC.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo possui característica descritiva e retrospectiva, com coleta de dados primários no período de março de 2011 a dezembro de 2013. As informações foram obtidas durante as atividades desenvolvidas nos atendimentos clínicos e ambulatoriais aos equídeos de tração, pelos docentes e discentes do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no município de Santa Maria, região central do estado do Rio Grande do Sul. Os atendimentos foram realizados quinzenalmente, na comunidade atendida pelo PASAC, em condições compatíveis com a biossegurança. Os dados contendo os aspectos clínicos dos animais (identificação, resenha e histórico clínico) e as informações sócio-econômicas dos proprietários e seus familiares foram registradas em fichas cadastrais. No primeiro atendimento foram realizadas avaliações clínicas, coleta de amostras para exames laboratoriais e quando necessário encaminhamento para procedimentos específicos, que incluam: pequenas cirurgias, administração de antiparasitários, fluidoterapia, quando havia indicação clínica. Durante os atendimentos, os proprietários recebiam informações sobre bem estar animal, aspectos sanitários, nutricionais, casqueamento e ferrageamento, bem

como participavam de ações sociais realizadas por grupos específicos de alunos vinculados aos diversos programas de extensão realizados pela UFSM. As reavaliações dos animais foram realizadas quinzenalmente, verificando-se a evolução clínica e as condições de bem estar de cada animal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período do estudo foram cadastrados no PASAC 191 animais pertencentes a 123 famílias. A faixa etária dos equinos de tração foi bastante variável sendo entre 1 a 21 anos (Tabela 1). A idade dos animais foi constatada por meio das informações dos proprietários e pelo exame da arcada dentária dos cavalos. A maior parte dos equinos (45,6% - 87/191) possuía idade acima dos 11 anos, sendo que dentro deste grupo 15,7% (30/191) possuíam idade superior a 16 anos, sendo considerados equinos idosos para a realização de trabalhos em carroças. Geralmente animais nesta faixa etária não apresentam aptidão à realização de exercícios extenuantes, devido às alterações na composição corpórea e déficit da resposta imune, reduzindo sua capacidade para atividades laborais as quais esses animais estavam submetidos (8). Quanto ao sexo dos animais, os machos foram mais prevalentes (65,4%, 125/191), sendo 75% (94/125) destes castrados. Segundo Guimarães e Christopher (9) o rendimento do cavalo é maior quando ele é castrado, pois esses animais apresentam temperamento mais dócil e são mais adaptados à tração. Todos os equídeos de tração do PASAC não possuíam uma raça definida. Os equinos de raças puras raramente são adquiridos para tração em carroças; uma vez que o custo de aquisição é muito elevado em relação aos animais sem raça definida.

Verificou-se que 58,6% (112/191) dos animais do PASAC apresentaram o escore corporal de magro a regular, 33% (63/191) estavam em bom estado aparente e 8,4% (16/191) eram obesos (Tabela 1). A avaliação da condição corporal de um cavalo pode ser considerada um indicador do seu estado nutricional (10). É frequente, encontrar equinos de trabalho muito emagrecidos pelo recebimento de alimentos de baixa qualidade ou em quantidade insuficiente (11). Conforme relato de proprietários dos animais, os equinos avaliados eram mantidos em terrenos baldios, com predominância de campo nativo, o qual representava sua principal fonte de alimentação. Em termos nutricionais, as condições desta vegetação não eram satisfatórias para a manutenção fisiológica dos animais, sendo assim, todos os equinos recebiam uma alimentação suplementar ofertada pelos proprietários (Tabela 1). Entre os alimentos mais utilizados, para suplementação da alimentação foram fornecidas: ração comercial, farelo de trigo e milho, em combinações inadequadas e em quantidades insuficientes, que muitas vezes não assegurava uma nutrição equilibrada. A desinformação sobre uma dieta adequada pode resultar em desequilíbrios nutricionais com o emprego de ingredientes impróprios ou em quantidades inadequadas, podendo tornar os animais susceptíveis a diversas doenças e ocasionar uma menor capacidade de trabalho (12,13). A adição de alimento concentrado e a menor oferta de forragem diminuem o tempo de ingestão e estimulam movimentos mastigatórios mais verticais, promovendo alterações dentárias (14), que também foram observadas neste estudo. Os equinos que tracionam carroças ou charretes podem aumentar em até 2,4 vezes a necessidade de reposição energética, necessitando também de água de boa qualidade sempre à disposição (15). Equinos podem sofrer de estresse calórico quando trabalham em condições de alta temperatura, sem acesso à água e sem o alívio da sombra nas áreas de descanso (11). Neste trabalho constatou-se que o consumo de água desses animais foi insuficiente, pois na maioria dos casos, a ingestão de água ocorria somente após o término da jornada de trabalho.

Tabela 1. Distribuição da faixa etária, sexo, condição corporal e alimentação dos equinos de tração de Santa Maria - RS.

<i>Idade</i>		n (%)
	0 a 5 anos	44 (23)
	6 a 10 anos	60 (31,4)
	11 a 15 anos	57 (29,9)
	16 a 20 anos	27 (14,1)
	Mais de 21 anos	3 (1,6)
	Total	191 (100)
<i>Sexo</i>		n (%)
	Fêmea	66 (34,6)
	Macho	125 (65,4)
	Total	191 (100)
<i>Condição Corporal</i>		n (%)
	Magro	35 (18,3)
	Regular	77 (40,3)
	Bom	63 (33)
	Obeso	16 (8,4)
	Total	191 (100)
<i>Alimentos</i>		n (%)
	Ração (R)	23 (12,1)
	Farelo de trigo (T)	27 (14,1)
	Milho (M)	19 (10)
	T+M	87 (45,5)
	T+M+R	13 (6,8)
	Outros alimentos	22 (11,5)
	Total	191 (100)

Além das desordens nutricionais foram diagnosticadas nos exames clínicos as afecções músculo esqueléticas e pulmonares, escoriações, conjuntivites, parasitoses, doenças infecto contagiosas e anemias. Conforme Costa (15) animais com comprometimento sanitário, mal nutrido, realizando esforços excessivos, não recebendo imunização preventiva, sofrendo constantes ferimentos e estresse, estão sujeitos a desenvolverem enfermidades frequentes e uma reduzida expectativa de vida.

Os dados sócio-econômicos analisados neste estudo estão apresentados na Tabela 2. Com relação à faixa etária dos carroceiros atendidos no PASAC observou-se que a maioria dos indivíduos (54,5% - 67/123) apresentou idade entre 21 a 40 anos, sendo predominantemente do sexo masculino, sendo a eles atribuídas às responsabilidades das atividades de trabalho e dos cuidados dos animais. Verificou-se que alguns menores de idade também conduziam os animais para o atendimento, bem como realizavam os cuidados dos animais. Quanto ao nível de escolaridade, evidenciou-se que 9,8% (12/123) não eram alfabetizados, enquanto que a grande maioria (71,5% - 88/123) possuía o ensino fundamental incompleto. Apenas 18,7% (23/123) possuíam o ensino fundamental completo (Tabela 2). A falta de escolaridade implica diretamente em não qualificação para as diversas funções laborais existentes no mercado de trabalho formal, gerando diretamente um aumento no número de atividades informais (16).

Tabela 2. Distribuição da faixa etária, nível de escolaridade, renda familiar, jornada de trabalho, carga das carroças e quilometragem percorrida com os equinos de tração dos carroceiros de Santa Maria - RS.

<i>Faixa etária</i>	<i>n (%)</i>
10 a 20 anos	23 (18,7)
21 a 30 anos	34 (27,6)
31 a 40 anos	33 (26,9)
41 a 50 anos	15 (12,2)
Mais de 51 anos	18 (14,6)
Total	123 (100)
<hr/>	
<i>Nível de escolaridade</i>	<i>n (%)</i>
Não alfabetizado	12 (9,8)
Fundamental Incompleto	88 (71,5)
Fundamental Completo	20 (16,3)
Ensino Médio Incompleto	3 (2,4)
Total	123 (100)
<hr/>	
<i>Renda familiar mensal</i>	<i>n (%)</i>
Metade do salário mínimo	48 (39,1)
Até um salário mínimo	38 (30,9)
Mais de um salário mínimo	37 (30)
Total	123 (100)
<hr/>	
<i>Jornada de Trabalho</i>	<i>n (%)</i>
1 – 5 horas	74 (60,2)
Mais de 6 horas	43 (35)
Não utiliza	6 (4,8)
Total	123 (100)
<hr/>	
<i>Carga da carroça</i>	<i>n (%)</i>
De 150 a 500 Kg	39 (32)
501 a 800 Kg	39 (32)
Mais de 801 kg	45 (36)
Total	123 (100)
<hr/>	
<i>Quilometragem percorrida</i>	<i>n (%)</i>
0 a 5 km	21(17,1)
6 a 20 km	21 (17,1)
Mais de 21 km	81 (65,8)
Total	123 (100)

A realidade envolvendo a exploração de equídeos por carroceiros, diagnosticada nesta pesquisa, não é diferente da encontrada em outras cidades brasileiras (17-19). A maioria dos carroceiros vinculados ao PASAC (70% - 86/123) obtinha uma renda média mensal abaixo do salário mínimo (Tabela 2). O baixo nível econômico dos carroceiros dificulta o acesso à assistência veterinária privada, o que pode implicar em uma deficiente condição sanitária e de bem estar animal (4,12). Adicionalmente, as necessidades básicas e de saúde da família não eram supridas. O cavalo constitui um elemento de fundamental importância na economia da reciclagem do lixo urbano, pois além de gerar uma renda familiar, também serve como meio de transporte de pessoas e cargas (20). Esta condição também foi evidenciada neste estudo.

A jornada média de trabalho com os equinos de tração do PASAC variou de 1 a 5 horas em 60,2% (74/123) dos casos avaliados (Tabela 2). Todos os carroceiros participantes do

estudo relataram que não estabeleciam um horário para seus animais descansarem durante a jornada de trabalho, indicando que só havia descanso dos equinos na ausência de atividade laboral. Todavia, verificou-se que uma pequena parcela dos familiares (4,8% - 6/123) não utilizava o animal para tração, pois consideravam estes equinos como sendo de estimação, muitas vezes preparando-os e utilizando-os para realizarem cavalgadas, desfiles cívicos e folclóricos.

A carga das carroças transportadas pelos equinos, estimada pelos carroceiros, variou de 150 a mais de 1000 Kg (Tabela 2). O Decreto do Distrito Federal (DF) nº 26289 de 2005 regulamentou a lei de trânsito de veículo de tração animal e determinou que a capacidade máxima da carga deste tipo de veículo deve ser de 350 Kg (21), o que excedeu a carga transportada pelos animais observada neste estudo. A maioria dos carroceiros (65,8% - 81/123) circulava mais de 20 km de distância diária (Tabela 2), dentro dos bairros ou eventualmente realizando pequenos fretes ou utilizando as carroças como transporte urbano familiar até o centro da cidade. Segundo Smythe (22), os animais que tracionam carroças e charretes costumam enfrentar muitas situações estressantes e ameaçadoras, como: a colocação de arreios e peias, o barulho e o movimento nas ruas, o excesso de carga e o horário prolongado de trabalho, além do descanso insuficiente e o manejo inadequado, também incluindo a aplicação de castigos, especialmente quando o animal se recusa a tracionar. Muitos carroceiros realizam os cuidados de seus animais baseados em informações adquiridas pela própria experiência, com vizinhos ou outros colegas de profissão, muitas vezes fundamentadas em conceitos errôneos e resultando em manejos inadequados (12).

Os equinos usados para tração, principalmente de carroças ou charretes na área urbana, enfrentam uma forma de vida totalmente diferente do seu ambiente natural, tendo que se adaptar a um meio inadequado a sua anatomia e fisiologia e a desenvolverem atividades e condutas bem diferenciadas de sua natureza primitiva. Isso determina graves problemas de bem estar para esses animais (23). Estima-se que existam em torno de 300 milhões de animais de tração utilizados por dois bilhões de pessoas em cerca de 30 países (24). Considerando a quantidade de animais envolvidos e o grande número de pessoas que utilizam equinos de tração, como a principal ou a única fonte de renda familiar, ou como meio de transporte urbano, esta realidade denota uma importante questão de bem estar animal na atualidade das cidades brasileiras.

CONCLUSÃO

Neste estudo, constatou-se uma condição insatisfatória de bem estar dos equinos de tração de Santa Maria, sendo que a mesma se encontra em consonância com a realidade de outras localidades no Brasil. Medidas sócio-educativas devem ser incentivadas e promovidas pelas instituições educacionais e poder público para que haja difusão da educação referente aos cuidados dos equinos de tração na população envolvida, a fim de que estas medidas possam proporcionar um melhor rendimento no trabalho e despertar a atenção dos carroceiros para o bem estar dos seus animais.

REFERÊNCIAS

1. Wunsch Filho V. Reestruturação produtiva e acidentes de trabalho no Brasil: estrutura e tendências. *Cad Saude Publica*. 1999;15(1):41-51.
2. Rosa LAB, Kneipp JM, Gomes CM. A percepção dos recicladores da cidade de Santa Maria/RS. In: *Anais do 11o Congresso Iberoamericano de Extension Universitaria*; 2011; Santa Fé. Santa Fé: Universidade Nacional do Litoral; 2011. p.1-11.

3. Silva PJ, Brito MJ. Práticas da gestão de resíduos da construção civil: uma análise da inclusão social de carroceiros e cidadãos desempregados. *Gest Prod.* 2006;13(3):545-56.
4. Aluja SA. The welfare of working equids in Mexico. *Appl Anim Behav Sci.* 1998;59(1-3):19-29.
5. Hovell GJR. Welfare considerations when attaching animals to vehicles. *Appl Anim Behav Sci.* 1998;59(1-3):11-7.
6. Cook WR. Pathophysiology of bit control in the horse. *J Equine Vet Sci.* 1999;19(3):196-204.
7. Ramaswamy NS. Draught animal welfare. *Appl Anim Behav Sci.* 1998;59:73-84.
8. McKeever KH. Aging and how it affects the physiological response to exercise in the Horse. *Clin Tech Equine Pract.* 2003;2(3):258-65.
9. Guimarães LA, Christopher U. Rural transport in eastern Amazonia: limitations, options, and opportunities. *J Rural Stud.* 1997;13(4):429-40.
10. Jones WE. Genética e criação de cavalos. São Paulo: Roca; 1989.
11. Naviaux JL. Cavalos na saúde e na doença. São Paulo: Roca; 1990.
12. Reichmann P. Projeto carroceiro V: assistência médico veterinária aos carroceiros e seus animais de tração da região de Londrina – PR. *Rev Eletronica Estação.* 2003;(2).
13. Silva Filho JM, Palhares MS, Maranhão RPA, Rezende HHC, Melo UP. Manejo alimentar dos animais de tração da regional Pampulha – Belo Horizonte. In: *Anais do 2o Congresso Brasileiro de Extensão Universitária; 2004; Belo Horizonte. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004. p.34-7.*
14. Baker GJ. Dental physiology. In: Easley KJ, Baker GJ. *Equine dentistry.* Londres: WB Saunders; 2002. p.29-34.
15. Costa LAP. Manual de hipologia. Rio de Janeiro: Biblioteca do Exército; 1997.
16. Iriart JAB, Oliveira RP, Xavier SS, Costa MAS, Araújo GR, Santa VS. Representação do trabalho informal e dos riscos à saúde entre trabalhadoras domésticas e trabalhadores da construção civil. *Cienc Saude Coletiva.* 2008;13(1):165-75.
17. Kaari P. A exploração de eqüídeos por carroceiros no Distrito Federal: direito, diagnóstico e educação ambiental [especialização]. Brasília: Universidade de Brasília; 2006.
18. Maranhão RPA, Palhares MS, Melo UP, Rezende HHC, Braga CE, Silva Filho JM, et al. Afecções mais frequentes do aparelho locomotor de eqüídeos de tração no município de Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58(1):21-27.
19. Oliveira LM, Marques RL, Nunes CH, Cunha AMO. Carroceiros e eqüídeos de tração: um problema sócio-ambiental. *Caminhos Geogr.* 2007;8(24):204-16.

20. Bursztyn M, Araújo CH. Da utopia à exclusão: vivendo nas ruas de Brasília. Rio de Janeiro: Garamond/Codeplan; 1997.
21. Decreto nº 26.289, de 18 de outubro de 2005. Altera o Decreto nº 19.804, de 20 de novembro de 1998 que regulamenta a Lei nº 1.553, de 15 de julho de 1997, relativa ao trânsito de veículos de tração animal nas vias públicas urbanas e faixas de domínio das rodovias do Distrito Federal, e dá outras providências. Diário Oficial da União. 19 Out 2005.
22. Smythe RH. A psique do cavalo. São Paulo: São Paulo; 1990.
23. Delgado CAG. Guía para el cuidado del equino de trabajo. Bogotá: ADA; 1999.
24. Broom D. Animal welfare: the concept and the issues. In: Dolins FL. Attitudes to Animals: views in animal welfare. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. p.129-42.

Recebido em: 24/01/2015

Aceito em: 26/10/2016

PERFORMANCE OF HEIFERS FROM DIFFERENT GENETIC GROUPS WITHOUT ANTHELMINTIC TREATMENT

José Henrique Neves¹
Ricardo Lopes Dias Costa²
Adilson Marini³
Ricardo Veludo Gomes Soutello⁴
Thiago Nunes Barreto⁵

ABSTRACT

In Andradina, São Paulo state, the degree of resistance against endo- and ectoparasites was evaluated in heifers from three genetic groups: crossbred Nelore x Aberdeen Angus (Nel x AAn; n=12), Guzerá (Guz; n=22) and Nelore (Nel; n=24). During 12 months, the body weight of each animal was recorded every 28 days as well as the number of *Haematobia irritans* flies near the animals, and fecal samples were collected to count nematode eggs per gram of feces (EPG). The Nel x AAn group had higher fly counts in comparison with other groups throughout the experiment. There was a significant interaction ($P < 0.001$) between the number of flies and time, and the difference between groups increased over time. The Nel group had lower mean EPG values in four of the twelve experimental months. The animals of the Nel x AAn group had higher average body weight gain since the beginning of the experiment. There was a significant interaction between weight gain and time ($P < 0.001$) and the difference in weight of the Nel x AAn group increased over time in relation to the Guz and Nel groups. It can be concluded that the crossbred Nel x AAn females presented superior weight gain in relation to the Guz and Nel groups, although they were more affected by *Haematobia irritans*. In conclusion, the use of crossbred cattle is a good strategy to increase the efficiency of meat production.

Keywords: cattle, weight gain, helminths, horn fly, resistance.

DESEMPENHO DE NOVILHAS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS SEM TRATAMENTO ANTI-HELMÍNTICO

RESUMO

Em Andradina, estado de São Paulo, o grau de resistência contra endo e ectoparasitas foi avaliado em novilhas de três grupos genéticos: mestiços Nelore x Aberdeen Angus (Nel x AAn; n=12), Guzerá (Guz; n = 22) e Nelore (Nel; n = 24). Durante 12 meses, o peso corporal de cada animal foi aferido a cada 28 dias, bem como a contagem do número de moscas *Haematobia irritans* nos animais, e amostras fecais foram colhidas para contagem de ovos de nemátodeos por grama de fezes (OPG). O grupo Nel x AAn apresentaram maiores contagens de moscas, em comparação com outros grupos, durante o experimento. Houve interação significativa ($P < 0,001$) entre o número de moscas e o tempo, sendo que a diferença entre os grupos aumentou ao longo do tempo. O grupo Nel apresentou menores contagens médias de OPG em quatro dos doze meses experimentais. Os animais do grupo Nel x AAn apresentaram maior ganho de peso corporal médio desde o início do experimento. Houve interação

¹ Mestrando em Clínica Veterinária/Enfermidades Parasitárias, FMVZ-UNESP-Botucatu-SP. Contato para correspondência.

² Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, APTA/SAA, Nova Odessa, SP.

³ Agência Paulista de Tecnologia de Agronegócios, Pólo Extremo Oeste/APTA/SAA, Andradina, SP.

⁴ Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho - Unesp, Campus Dracena, SP.

⁵ Cooperativa CAMDA, Iturama, MG.

significativa entre o ganho de peso e tempo ($P < 0,001$) e a diferença de peso do grupo Nel x AAn aumentou ao longo do tempo, em relação aos grupos Guz e Nel. Pode-se concluir que fêmeas mestiças Nel x AAN apresentaram ganho de peso superior em relação aos grupos Guz e Nel, embora elas fossem mais afetadas por *Haematobia irritans*. Em conclusão, a utilização de bovinos mestiços é uma boa estratégia para aumentar a eficiência da produção de carne.

Palavras-chave: bovinos, ganho de peso, helmintos, mosca de chifre, resistência.

DESEMPEÑO DE NOVILLAS DE DIFERENTES GRUPOS GENETICOS SIN TRATAMIENTO ANTIHELMINTICO

RESUMEN

En Andradina, estado de São Paulo, el grado de resistencia contra endo y ectoparásitos se evaluó en tres grupos genéticos de novillas: Aberdeen Angus x Neloré (Nel x AAN; $n = 12$), Guzerá (Guz; $n = 22$) y Neloré (Nel, $n = 24$). Durante 12 meses, el peso corporal de cada animal fue medido cada 28 días, se realizó conteo del número de moscas *Haematobia irritans* sobre los animales y se tomaron muestras fecales para realizar el conteo de huevos de nematodos por gramo de heces (OPG). El grupo de novillas Nel X AAN presentó recuentos más altos de moscas en comparación con otros grupos durante el experimento. Se encontró relación significativa ($P < 0,001$) entre el número de moscas y el tiempo, aumentando dicha diferencia entre los grupos con el tiempo. El grupo Nel presentó conteos más bajos de OPG en cuatro de los doce meses de experimentación. Los animales del grupo Nel x AAN tuvieron una ganancia de peso corporal mayor al promedio desde el comienzo del experimento. Se presentó una relación significativa entre la ganancia de peso y el tiempo ($P < 0,001$) y la diferencia de peso del grupo Nel x AAn aumentó a lo largo del tiempo en relación con los grupos de Guz y Nel. Se puede concluir que las hembras mestizas Nel x AAN mostraron un aumento de peso mayor en comparación con los grupos de Guz y Nel, aunque estas fueron más afectadas por *Haematobia irritans*. En conclusión, el uso de animales mestizos es una buena estrategia para aumentar la eficiencia en la producción de carne.

Palabras clave: bovinos, aumento de peso, helmintos, resistencia, mosca de los cuernos.

INTRODUCTION

Brazil currently has more than 211 million cattle (1), and it is the largest commercial beef producer (2). Parasitism is a major problem in cattle breeding, with a large impact on production. There are many reports of losses caused by gastrointestinal nematodes (3,4) and ectoparasites (5,6). The control of these parasites is mainly through the use of endectocides of the macrocyclic lactone class (7). This poses a problem because not only do the drugs belonging this class (abamectin, doramectin, moxidectin and ivermectin) generally have low efficacy to control endoparasites and ectoparasites, they are eliminated with feces and act on other fauna, interfering with the harmony of the ecosystem (8).

Although cattle are typically infected by both endoparasites and ectoparasites, studies examining weight gain in relation to infections and parasitic infestations are scarce. Thus, the aim of this study was to evaluate the performance regarding weight gain of heifers of different genetic groups, naturally parasitized by gastrointestinal nematodes and flies of *Haematobia irritans*, without the treatment with anthelmintics.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted at the APTA Research Farm in the municipality of Andradina, São Paulo, Brazil (geographical coordinates 20°53'46" south latitude, 51°22'46" west longitude and altitude averaging 405 m) in the period from June 2007 to May 2008.

Nellore and Guzerá cows belonging to a closed squad selection of the farm were inseminated during the breeding season (December 2006 and January 2007) with conventional semen from three bulls (Aberdeen Angus, Nellore and Guzerá). The calves issued from these matings were weaned at between 8 and 9 months, consisting of 12 crossbred Nellore x Aberdeen Angus (Nel x AAn), 22 Guzerá (Guz) and 24 Nellore (Nel). The average weights (\pm standard error) were 178.2 \pm 5.94, 159.5 \pm 3.98 and 163.1 \pm 4.9 kg, respectively.

The heifers remained in a 50-hectare paddock planted with *Brachiaria decumbens*, with access to water and mineral salt *ad libitum*. The animals were properly vaccinated against foot and mouth disease and received no anthelmintic or antiparasite treatment before and during the experimental period.

The animals were individually weighed on electronic scales every 28 days, totaling 12 samples (newly weaning at 8-9 months to 19-20 months of age). The number of *Haematobia irritans* flies present in the dorsal region, from the neck until the ends of the hip of each animal, was counted (9). Fecal samples were also collected for later counting of nematode eggs in a McMaster chamber.

The stool samples were processed according to the modified McMaster technique (10), which consists of nematode egg counts in the feces, with 1 egg found in the analysis assumed to represent 50 EPG.

The average rainfall and average temperature during the period of the experiment, from June 2007 to May 2008 were measured at the farm (Figure 1).

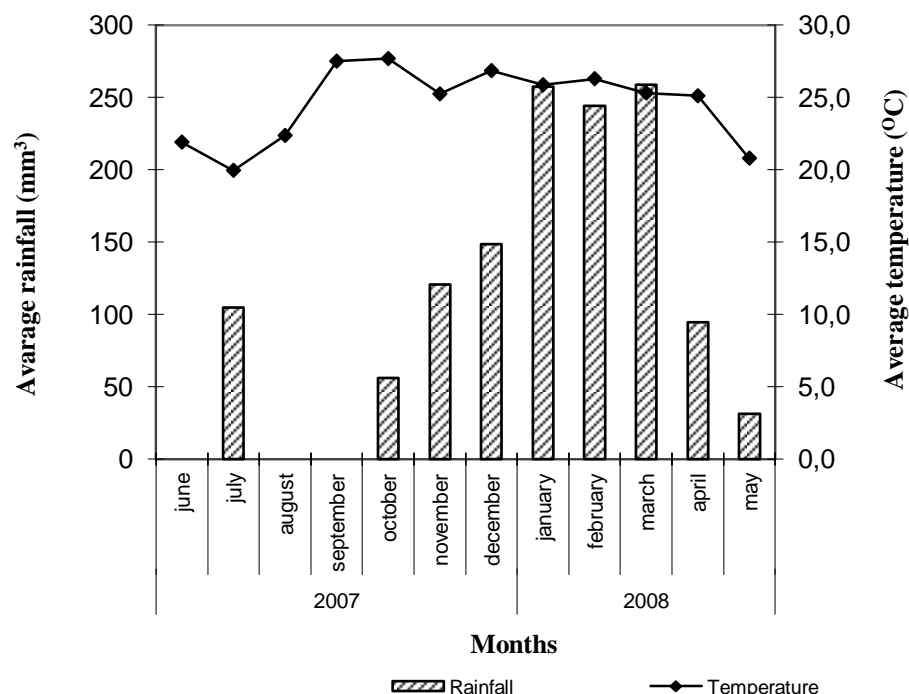


Figure 1. Average temperature (°C) and average rainfall (mm) in June 2007 to May 2008, at the Apta Research Farm, Andradina, SP, Brazil.

The data relating to EPG counts, fly counts and weight of the animals were subjected to repeated measures analysis using the SAS[®] software (version 9.1). Means were compared by

the Tukey test with a significance level of 5%. The data relating to EPG counts were analyzed after logarithmic transformation ($\log_{10}(x+1)$).

RESULTS

The monthly rainfall during the study period was 110 ± 99.61 mm, with extremes in the months of June, August and September 2007, when there was no rain; and the months of January, February and March 2008, when rainfall figures were 257, 244 and 259 mm, respectively. The average monthly temperature was 24.6 ± 2.64 °C, ranging from 20.0 °C in July to 27.7 °C in October.

The Nel group had lower mean scores of EPG in the months of June and July 2007 and April 2008 compared to the Guz group ($P < 0.05$), and in March 2008 compared to the Nel x AAn group (Figure 2).

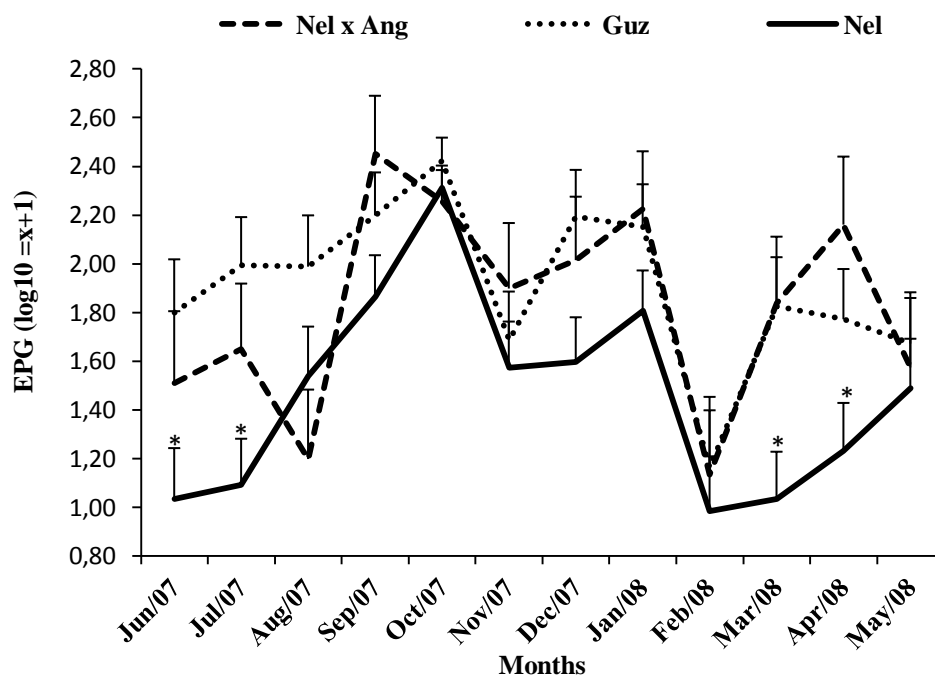


Figure 2. Means (\pm standard error) of EPG ($\log_{10}=x+1$) in the months of June 2007 to May 2008 of three groups of heifers: crossbred $\frac{1}{2}$ Nellore x $\frac{1}{2}$ Aberdeen Angus, Guzerá, and Nellore, at the APTA Research Farm, Andradina, SP, Brazil; Means (\pm standard error) followed by * differ by the Tukey test at $P < 0.05$; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$.

The mean (\pm standard error) of the *Haematobia irritans* fly counts are presented in Figure 3, where the Nel x AAn group had higher mean scores in all months except June and July 2007, compared to the Guz and Nel groups.

In Figure 3 it can be seen that the mean horn fly count of the crossbred Nel x AAn group was significantly greater than those of the Guz and Nel groups, in all samplings throughout the experimental period. There was also a significant time x group interaction for horn fly values: the difference between groups increased over time.

The accumulated weight gains during the evaluation were 177.2 ± 6.52 , 129.3 ± 6.31 and 118.9 ± 6.88 kg (\pm standard deviation) for the Nel x AAn, Guz and Nel groups, respectively.

In Figure 4 it can be seen that the mean live weight of the crossbred Nel x AAn group was significantly greater than those of the Guz and Nel groups, in all samplings throughout the experimental period. There was also a significant time x group interaction for live weight values: the difference between groups increased over time.

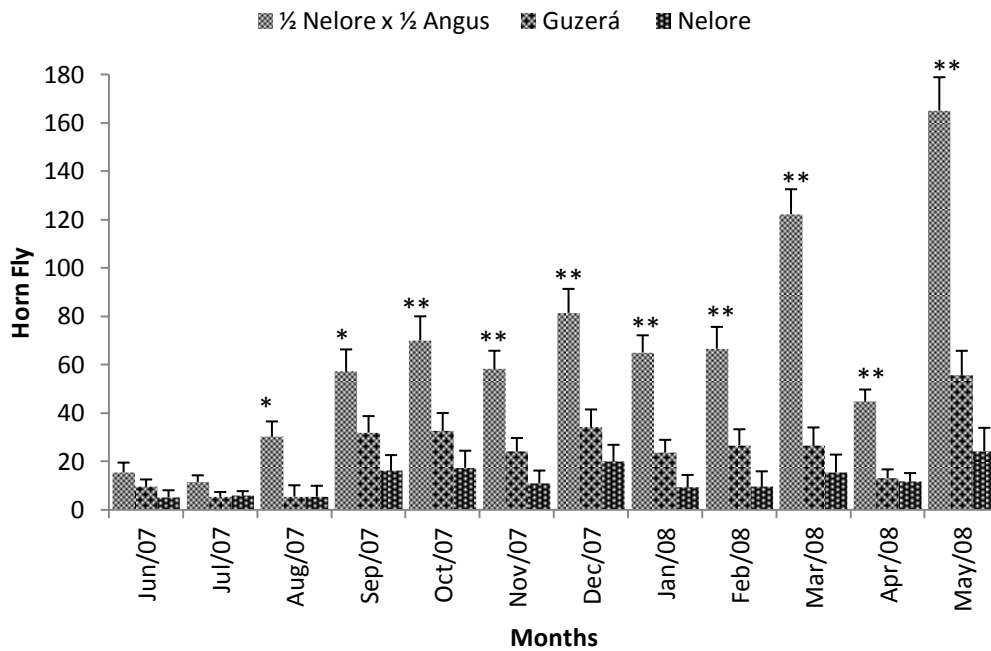


Figure 3. Means (\pm standard error) of horny fly counts in the months of June 2007 to May 2008 of three groups of heifers: crossbred $\frac{1}{2}$ Nellore x $\frac{1}{2}$ Aberdeen Angus, Guzerá, and Nellore, at the APTA Research Farm, Andradina, SP, Brazil; Means (\pm standard error) followed by * differ by the Tukey test at $P < 0.05$; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$.

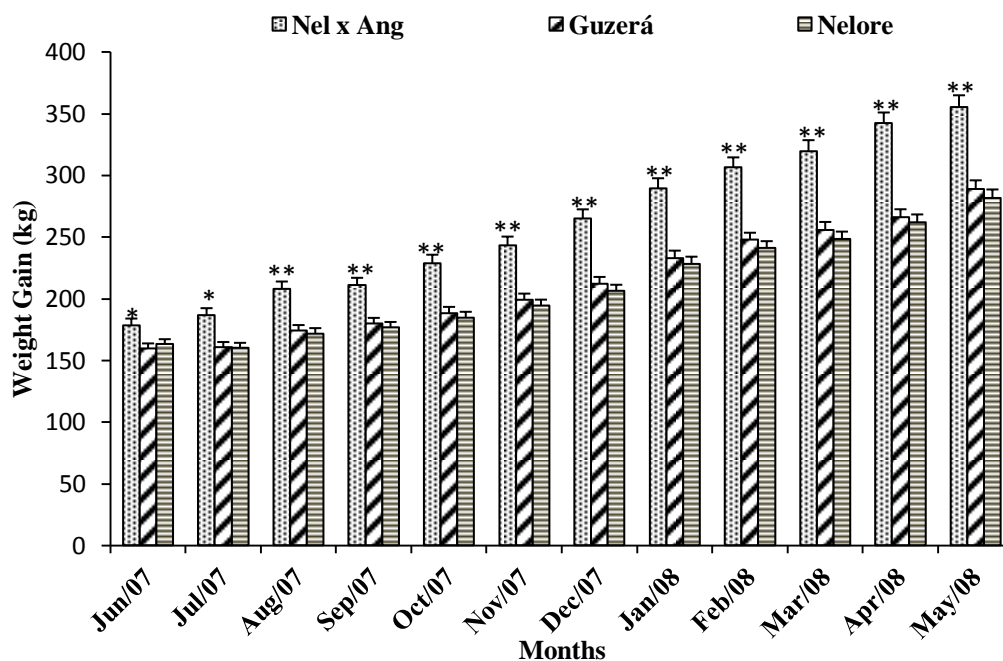


Figure 4. Weight gain in the months of June 2007 to May 2008 of three groups of heifers: crossbred Nellore x Aberdeen Angus, Guzerá, and Nellore, at the APTA Research Farm, Andradina, SP, Brazil. Means (\pm standard error) followed by * differ by the Tukey test at $P < 0.05$; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$.

DISCUSSION

The Nel animals showed lower EPG counts ($P < 0.05$) in four of the twelve months evaluated regarding endoparasitoses: in July 2007 and April 2008, compared to the Guz group, and in March 2008 in relation to Nel x AAn group.

In contrast, Oliveira et al. (11) evaluated the natural resistance to endoparasites of heifers from the genetic groups Nellore, crossbred Nellore x Senepol and crossbred Nellore x Angus, also in the state of São Paulo, and found no significant differences between the three groups ($p > 0.05$). However, the authors observed that the animals in the Nellore group showed higher mean EPG than the Nellore x Angus group. However, the authors reported there was a great difference in EPG values between animals of the same genetic group (Nellore), with various animals having EPG of zero and several with high EPG.

The results described corroborate those of (12), who evaluated the 100 Nellore steers, aged 11-12 months, and observed a significant difference ($P < 0.05$) between individuals of the same genetic group, and serum total IgE level can serve as to select an additional, sensitive to infections Nellore marker *Haemonchus placei* and *Cooperia punctata*.

Infestation by *H. irritans* flies has also been assessed in the three genetic groups, but the economic losses caused by this parasite alone are usually difficult to measure. However, according to Kaufman and Weeks (13), economic losses in beef cattle are caused by infestations of more than 200 flies/animal, while Bianchin et al. (14) observed that Nellore cattle showed significant loss ($P < 0.05$) of 5-26 kg/animal, with mean infestations by *H. irritans* between 4-55 flies/animal.

The average scores (\pm standard error) of *H. irritans* found in this study were 66 ± 12.46 , 24 ± 4.16 and 13 ± 1.73 , for the Nel x AAn, Guz and Nel groups, respectively. These averages are below those considered capable of causing losses by Kaufman and Weeks (13), but similar to those found by Bianchin et al. (14).

The Nel x AAn group showed the highest infestation of *H. irritans* (Table 1), throughout the experiment except for the months June and July 2007. This observation confirms reports of Bianchin et al. (15), Delabona and Bicudo (16), and Almeida et al. (17), that *Bos taurus* x *Bos indicus* animals are more susceptible to *H. irritans* than *Bos indicus*.

Although the Nel x AAn group had the highest scores of *H. irritans* for 10 of the 12 months evaluated, this group showed a mean cumulative weight gain of 48 and 58 pounds more than the contemporary Guz and Nel groups, respectively.

In the state of Santa Catarina, Cardoso et al. (18) observed superior performance of crossbred Angus calves compared to purebred Crioulo Lageano calves, with average weight gains of 301 and 239 kg, respectively, after 494 days of experiment. This performance of the animals in the crossbred Angus group were higher than those found here, probably due to the higher nutritional value of the pastures described by Cardoso et al. (18), while the animals of our study were fed exclusively on *Brachiaria decumbens*.

In Mato Grosso do Sul, Soutello et al. (4) evaluated male calves without anthelmintic treatment and without protein supplementation, observing weight gain of 152.5 kg during the 17-month experiment, lower than the performance found in this study, probably because the groups are composed of five Guzerá and five crossbred Nellore x Angus animals.

The existence of cattle with natural resistance to endoparasites (11,12) and ectoparasites (19) has been reported by several authors and was also observed in this experiment. Therefore, for sustainable cattle production, with minimal use of chemicals, the adoption of measures such as selection of resistant animals and identification and exclusion of susceptible animals as suggested previously for sheep by Bassetto et al. (20) seems to be the best alternative.

CONCLUSION

The crossbred Nellore x Aberdeen Angus (*B. indicus* x *B. taurus*) heifers had greater weight gain in relation to the purebred Guz and Nel groups, despite being more affected by *Haematobia irritans*, so using animals of this cross is a good strategy to increase the efficiency of beef production.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) and Polo Extremo Oeste for the availability of the herd and Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina for the scholarship.

REFERENCES

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2014 [cited 2014 Feb 6]. Available from: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=24&i=P>.
2. Anualpec. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: FNP; 2012.
3. Borges FA, Almeida GD, Heckler RP, Lemes RT, Onizuka MKV, Borges DGL. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. *Trop Anim Health Prod.* 2013;45(3):723-7.
4. Soutello RVG, Condi GK, Paes F, Fonzar JF. Influência do parasitismo e da suplementação protéica no desenvolvimento ponderal de novilhos mestiços Angus-Nelore e da raça Guzerá. *Cienc Agrar Saude.* 2002;2(1):21-7.
5. Catto JB, Bianchin I, Feijó GLD, Araújo FR, Ramos CAN, Castelão ABC. Weight gain and control of endo-and ectoparasites of beef heifers treated with allopathic, herbal and homeopathic drugs. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013;22(4):502-10.
6. Rodrigues DS, Leite RC. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2013;65(5):1570-2.
7. Delgado FEF, Lima WDS, Cunha AP, Bello ACPP, Domingues LN, Wanderley RPB, et al. Verminoses dos bovinos: percepção de pecuaristas em Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2009;18(3):29-33.
8. Lumaret J-P, Errouissi F, Floate K, Römbke J, Wardhaugh K. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(6):1004-60.
9. Almeida FA, Zocoller-Seno MC, Basso FC, Valério Filho WV. Comparação de métodos de contagem da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em diferentes regiões do corpo de bovinos da raça Guzerá e mestiço. In: Anais do 17o Congresso de Iniciação Científica da Unesp; 2005; Ilha Solteira, SP. Ilha Solteira: Unesp; 2005. p. 1-2.
10. Ueno H, Gonçalves PC. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4a ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency. 1998.

11. Oliveira MCS, Alencar MM, Chagas ACS, Giglioti R, Oliveira HN. Gastrointestinal nematode infection in beef cattle of different genetic groups in Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;166(3-4):249-54.
12. Bricarello PA, Zaros LG, Coutinho LL, Rocha RA, Kooyman FNJ, De Vries E, et al. Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. *Vet Parasitol.* 2007;148(3-4):272-8.
13. Kaufman P, Weeks ENI. Horn fly management [Internet]. Gainesville, FL: UF/IFAS Extension; 2012 [cited 2014 Feb 6]. Available from: <https://edis.ifas.ufl.edu/in952>.
14. Bianchin I, Koller WW, Alves RGO, Detmann E. Efeito da mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), no ganho de peso de bovinos Nelore. *Cienc Rural.* 2004;34(3):885-90.
15. Bianchin I, Koller WW, Detmann E. Sazonalidade de *Haematobia irritans* no Brasil Central. *Pesqui Vet Bras.* 2006;26(2):79-86.
16. Delabona GS, Bicudo HEMC. Uma técnica simples para estudar o desenvolvimento da mosca-do-chifre, *Haematobia irritans* (DIPTERA; MUSCIDAE). *Genet Esc.* 2007;2(1):17-9.
17. Almeida FA, Basso FC, Zocoller-Seno MCS, Valério Filho WV. Dinâmica populacional da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em bovinos da raça Guzerá e mestiço em Selvíria, MS. *Semina Cienc Agrar.* 2010;31(1):157-62.
18. Cardoso CP, Silva BF, Trinca LA, Amarante AFT. Resistance against gastrointestinal nematodes in Crioulo Lageano and crossbred Angus cattle in southern Brazil. *Vet Parasitol.* 2013;192(1-3):183-91.
19. Jensen KM, Jespersen JB, Birkett MA, Pickett JA, Thomas G, Wadhams LJ, et al. Variation in the load of the horn fly, *Haematobia irritans*, in cattle herds is determined by the presence or absence of individual heifers. *Med Vet Entomol.* 2004;18(3):275-80.
20. Bassetto CC, Silva BF, Fernandes S, Amarante AFT. Contaminação da pastagem com larvas infectantes de nematoides gastrintestinais após o pastejo de ovelhas resistentes ou susceptíveis à verminose. *Rev Bra Parasitol Vet.* 2009;18(4):63-8.

Recebido em: 23/06/2015

Aceito em: 26/10/2016

EFICÁCIA DE ADITIVO À BASE DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURA NA DIETA DE LEITOAS INTOXICADAS COM ZEARALENONA

Danielle Fabião Gomes Moreira Leitão¹
Águida Aparecida de Oliveira¹
Kelly Moura Keller²
Bruno da Silva de Vasconcelos³
Luiz Antonio Moura Keller⁴
Marcos Aronovich⁵
Carlos Alberto da Rocha Rosa⁶

RESUMO

As micotoxinas determinam perdas econômicas importantes para suinocultura e os adsorventes à base de parede celular de leveduras são uma alternativa para reduzir este problema. Considerando que a eficácia desses tipos de adsorventes são linhagem-dependentes, apresentando variabilidade de resposta em função da composição da parede celular da levedura utilizada, torna-se necessária a avaliação de cada novo produto antes de sua comercialização. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de um aditivo anti-micotoxina (AAM) à base de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, Safmannan[®], na prevenção da micotoxicose decorrente da ingestão de zearalenona (ZEA). Foram utilizadas 36 leitoas pré-púberes cujas dietas apresentaram dois níveis de inclusão de AAM (0,0 e 0,2%) e três níveis de inclusão de ZEA (0,0; 0,25 e 0,6 mg kg⁻¹ ou ppm). O período experimental teve duração total de 21 dias, sendo realizadas avaliações semanais de: peso vivo, ganho de peso, consumo de ração e volume vulvar; pesos relativos de fígado, trato reprodutivo total e o conjunto útero-ovário-vagina também foram calculados. A adição de 0,0% AAM com 0,6 ou 0,25 ppm ZEA na dieta de leitoas pré-púberes causou sinais clínicos de hiperestrogenismo. A adição do AAM nas dietas contendo ZEA demonstrou ser uma alternativa estatisticamente significativa para redução dos efeitos tóxicos desta micotoxina.

Palavras-chave: micotoxina, adsorvente, *Saccharomyces cerevisiae*, suínos.

EFFECTIVENESS OF ADDITIVES BASED ON YEAST CELL WALL IN DIETS OF GILTS INTOXICATED BY ZEARALENONE

ABSTRACT

Mycotoxins determine important economic losses to the swine and adsorbents based on yeast cell wall are an alternative to reduce this problem. Whereas the effectiveness of these types of adsorbents is strain-dependent, with response variability depending on the composition of the yeast cell wall used, it becomes necessary assessment of each new product prior to its commercialization. Thus, the aim of this study was to evaluate the efficacy of an anti-mycotoxin additives (AMA) based on the yeast cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*,

¹ Doutoranda em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Contato principal para correspondência: danifabiao@hotmail.com.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Setor de Suinocultura, Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

⁴ Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Agrossocioambiental Sustentável, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

⁵ Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro.

⁶ Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Safmannan[®], in preventing mycotoxicosis caused by ingestion of zearalenone (ZEA). A total of 36 pre-pubertal gilts, whose diets had two levels of AAM (0.0 and 0.2 %) and three inclusion levels of ZEA (0.0, 0.25 and 0.6 mg kg⁻¹ or ppm). The experimental period extended to 21 days and weekly, was measured the parameters: live weight, weight gain, feed intake and vulvar volume; relative weights of liver, total reproductive tract and the set uterus-ovary-vagina were also calculated. The addition of 0.0% AMA with 0.6 or 0.25 mg kg⁻¹ ZEA in the diet of pre-pubertal gilts caused clinical signs of hyperestrogenic. The addition of the AMA in diets containing ZEA proved to be a good alternative for reducing the toxic effects of this mycotoxin.

Keywords: mycotoxin, adsorbent, *Saccharomyces cerevisiae*, swine.

EFICACIA DE ADITIVO A BASE DE PARED CELULAR DE LEVADURA EN LA DIETA DE CERDAS JÓVENES EXPUESTAS A ZEARALENONA

RESUMEN

Las micotoxinas determinan pérdidas económicas significativas a la ganadería porcina y los adsorbentes de pared celular de levadura son una alternativa para reducir este problema. Considerando que la efectividad de estos tipos de adsorbentes son dependientes de la cepa, con variabilidad de la respuesta como una función de la composición de la pared celular de levadura utilizada, es necesario revisar cada nuevo producto antes de su comercialización. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de un aditivo anti-micotoxinas (AAM) basado en la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, Safmannan[®], en la prevención de micotoxicosis como resultado de la ingestión de zearalenona (ZEA). Fueron utilizadas 36 cerdas jóvenes, cuyas dietas tenían dos niveles de inclusión de AAM (0,0 y 0,2%) y tres niveles de inclusión de ZEA (0,0, 0,25 y 0,6 6 mg kg⁻¹ o ppm). El ensayo tuvo duración total de 21 días, y se llevaron a cabo evaluaciones semanales de: peso corporal, ganancia de peso, consumo de alimento y el volumen de la vulva, también se calcularon los pesos relativos de hígado, tracto reproductivo total y conjunto útero-ovário vagina. La adición de 0.0% de AAM con 0,6 o 0,25 ppm ZEA en las dietas de las cerdas prepúberes causó signos clínicos de hiperestrogenismo. La adición de AAM en las dietas que contienen ZEA demostró ser una buena alternativa para reducir los efectos tóxicos de esta micotoxina.

Palabras clave: micotoxinas, adsorbente, *Saccharomyces cerevisiae*, cerdos.

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são substâncias tóxicas provenientes do metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos, cuja composição apresenta baixo peso molecular e baixa capacidade imunogênica (1). As micotoxinas estão amplamente presentes em matérias-primas destinadas à alimentação animal, como grãos, em especial o milho (2), sendo responsáveis por gerar grandes prejuízos devido à contaminação da cadeia produtora de alimentos, risco para a saúde humana e impacto na saúde e na produção animal (3).

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogênica, não esteroide (4-7) produzida por fungos do gênero *Fusarium*, dentre os quais estão incluídos *F. graminearum* e *F. culmorum* (8). Estas espécies são encontradas, principalmente, em cevada, arroz, trigo e no milho (9).

Após sua ingestão, a ZEA é absorvida no trato gastrointestinal e biotransformada, principalmente no fígado, e são formados dois metabólitos, α e β zearalenol (9), que causam distúrbios reprodutivos e efeitos de hiperestrogenismo por se ligarem a receptores estrogênicos (10). A síndrome do hiperestrogenismo é observada em doses superiores a 0,1

ppm ZEA (9), sendo caracterizada visualmente pelo avermelhamento e o aumento dos lábios vulvares, podendo também ocorrer prolapso retal ou vaginal decorrente do relaxamento dos esfíncteres (11). Alterações macro e microscópicas também são observadas como metaplasia no corpo e cornos uterinos, na cérvis, vagina e glândula mamária. Os suínos são a espécie mais suscetível à ZEA (12), pois há maior formação de α zearalenol, que possui maior afinidade pelos receptores estrogênicos (9).

O uso de aditivos anti-micotoxinas (AAM) é uma estratégia que pode ser usada para reduzir os efeitos negativos da intoxicação por ZEA, pois são capazes de adsorver, biotransformar ou neutralizar as micotoxinas (13). Existem várias substâncias que são capazes de se ligar a estes compostos tóxicos, evitando sua absorção intestinal a partir do alimento contaminado (3). A parede celular de leveduras (PCL) é um exemplo de substância adsorvente (14). Cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido largamente utilizados, por possuir componentes em sua parede celular capazes de adsorver uma variedade de micotoxinas dos alimentos (15), quando suplementados nas dietas dos animais (16). A composição em polissacarídeos, a estrutura e espessura da PCL variam consideravelmente (17). A parede celular da *S. cerevisiae*, tem uma dupla camada, consistindo numa estrutura multilaminar microfibrilar constituída por polissacarídeos (90 %), sendo os manano-oligossacarídeos (MOS) e os β -glucanos, os principais polímeros estruturais (18). Esta diversidade reflete-se com a presença de uma grande variedade de potenciais sítios para a complexação de moléculas (19). Desta forma, pode-se dizer que as propriedades benéficas das PCL são linhagem-dependentes e não podem ser extrapoladas ao gênero nem à espécie, tornando necessária a avaliação de cada nova cepa (ou produto derivado). Yiannikouris et al. (20) comprovaram *in vitro* este fato, demonstrando que a adsorção de ZEA foi correlacionada com a quantidade de β -D-glucanos contidos na parede celular da levedura. Quatro linhagens foram testadas, onde as que apresentaram níveis mais elevados de β -D-glucanos, foram capazes de adsorver maiores quantidades de ZEA, com maiores constantes de associação e taxas de afinidade. Enquanto que linhagens com conteúdos mais elevados de quitina apresentaram menor flexibilidade de suas paredes celulares, o que restringiu o acesso da ZEA aos sítios de ligação com os β -D-glucanos envolvidos na formação do complexo micotoxina-adsorvente.

Muitos ensaios *in vivo* já realizados estão disponíveis na literatura mundial, e visaram estudar os efeitos da ZEA em leitões pré-púberes, como também testar a eficácia de um aditivo anti-micotoxina, sendo este a base de PCL ou não. Porém, poucos são os trabalhos que possuam e/ou divulguem a composição centesimal do produto testado, sendo esta uma informação de grande importância, já que o efeito da adsorção a micotoxina está associado aos teores de glucanos e mananos. E ainda, este é o primeiro estudo que utilizou em sua metodologia estatística a comparação de médias via contraste ortogonal.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de um produto comercial, Safmannan[®], à base de PCL e rico em MOS e β -glucanos, na prevenção dos efeitos tóxicos decorrentes da ingestão de ZEA.

MATERIAL E MÉTODOS

O produto comercial à base de PCL utilizado como AAM no estudo foi o Safmannan[®] (Safmannan[®], comercializado pela empresa Lesaffre do Brasil Produtos Alimentícios Ltda, São Paulo, Brasil). Trata-se de produto totalmente livre de resíduos de antibióticos, metais pesados, produtos químicos, e contaminantes microbianos, que apresenta a seguinte composição química: umidade 5% máx., proteína 28% máx., fósforo 1% mín., β -glucanos 23% mín., MOS 21% mín., matéria seca 95% mín., gordura 20% mín. e cinzas 4% máx. Em sua composição física apresenta coloração creme a dourado, odor típico de levedura e sem

evidências de impurezas. O nível de inclusão utilizado no experimento seguiu a dose máxima recomendada pelo fabricante, isto é 2 g kg^{-1} ou 0,2%.

A ZEA foi produzida por meio de fermentação controlada tendo o arroz branco polido como substrato de acordo com Jiménez et al. (21). Foi feita uma suspensão dos esporos fúngicos cultivados em água destilada que foi adicionada ao arroz. Foi utilizada a linhagem de *Fusarium graminearum* UNRC 3639, cultivada em placas de Petri em meio BDA (batata, dextrose, agar). Todo o núcleo de ZEA foi autoclavado, após o período de 30 dias, seco a 50°C , em estufa de secagem, e triturado. A ZEA foi extraída com solução de água destilada e acetronitrila, purificada pela coluna de extração MycoSep[®] 226 AflaZON de acordo com as informações do fabricante (Romer Labs[®]), e quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O núcleo foi acrescido a dieta base dos animais na devida proporção, utilizando-se misturador do tipo Y, a fim de se obter as concentrações de 0,6 e de 0,25 ppm ZEA na ração experimental.

Foram utilizadas 36 leitoas pré-puberes da linhagem Topigs com idade inicial de 34 dias e peso inicial médio de $8 \pm 0,48 \text{ kg}$. Os animais foram alojados em baias do tipo suspensa, sendo dois animais alocados em uma baia. As fêmeas passaram por um período de adaptação de sete dias, pois foram desmamadas e deslocadas por caminhão para o local do ensaio *in vivo*. Dessa forma precisaram se adaptar às novas instalações, alimentação e ambiente, garantindo assim a uniformidade inicial dos animais, que foi verificada através de parâmetros zootécnicos do período de adaptação. O período experimental foi de 21 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e três repetições por tratamento, sendo a baia a unidade experimental.

As leitoas foram distribuídas nos tratamentos (dietas) que seguiram esquema fatorial 2×3 , com dois níveis de inclusão de AAM (0,0 e 0,2%) e três níveis de inclusão de ZEA (0,0; 0,25 e 0,6 ppm) nas dietas, sendo 0,0% AAM + 0,0 ppm ZEA (T01), 0,2% AAM + 0,0 ppm ZEA (T02), 0,0% AAM + 0,25 ppm ZEA (T03), 0,2% AAM + 0,25 ppm ZEA (T04), 0,0% AAM + 0,6 ppm ZEA (T05), e 0,2% AAM + 0,6 ppm ZEA (T06).

Todas as fêmeas receberam água e ração à vontade. Os animais foram monitorados diariamente, três vezes ao dia, ao longo de todo o experimento. Ocorreu monitoramento diário da temperatura no local do experimento. Os parâmetros avaliados foram: peso vivo (PV), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e volume vulvar, determinado pela multiplicação da mensuração da altura, largura e profundidade da vulva das fêmeas, no 7º, 14 e 21º dia de experimento, medição feita com paquímetro digital. No final do experimento, três animais de cada tratamento foram abatidos, sendo respeitado o período médio de 6 horas de jejum alimentar com água *ad libitum*, e insensibilizados por eletroanestesia, seguindo os princípios do abate humanitário. As fêmeas foram então, evisceradas e seus órgãos, trato reprodutivo total, conjunto útero-ovário-vagina e fígado, foram retirados, pesados e medidos. O modelo do estudo seguiu as recomendações da Portaria nº 130 de 24 de Maio de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (22).

Devido às diferentes características nos dados coletados, utilizamos o modelo ANOVA padrão para os pesos relativos dos órgãos dos animais e o modelo ANOVA com medidas repetidas para as informações coletadas ao longo do tempo, considerando o efeito do tempo. Em ambos os casos testou-se o modelo completo, e isto significa que todas as variáveis e todas as possíveis interações foram testadas. Em casos de significância estatística de interações envolvendo o fator de interesse (AAM) foi aplicado o teste T-student via contrastes ortogonais.

Para dados não paramétricos (volume vulvar), foi necessário transformar a variável pelo uso de função logarítmica para garantir a suposição de normalidade. Todos os testes estatísticos consideraram 5% de significância, e as análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS[®] (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao peso vivo, não foi observada diferença significativa, mas houve diferença estatística significativa para a variável tempo ($p < 0,01$) (Tabela 1). Esta diferença era esperada, já que ao longo das semanas as fêmeas apresentaram aumento de seu peso vivo. O consumo desta micotoxina não interferiu no peso vivo dos animais, pois a ZEA não afeta a digestibilidade das dietas. Além disso, a ingestão experimental de ZEA purificada nas dietas, sem a presença do fungo, não altera a composição nutricional dos ingredientes da ração (2).

Tabela 1. Efeito dos tratamentos (dietas) sobre o peso vivo (em Kg) ao 1°, 7°, 14° e 21° dia de experimento¹.

Tratamentos (dietas)	Peso vivo (kg)			
	1° dia	7° dia	14° dia	21° dia
0,0% AAM				
0 ppm ZEA	11,10 ± 0,48	15,52 ± 1,21	20,10 ± 1,67	25,90 ± 1,40
0,25 ppm ZEA	10,47 ± 0,60	14,30 ± 1,08	19,04 ± 1,70	23,62 ± 2,18
0,6 ppm ZEA	11,08 ± 1,50	15,12 ± 1,81	19,38 ± 2,77	23,63 ± 3,42
0,2% AAM				
0 ppm ZEA	11,20 ± 0,85	15,13 ± 1,42	19,19 ± 1,71	23,46 ± 2,37
0,25 ppm ZEA	11,21 ± 0,96	15,23 ± 1,60	19,84 ± 1,86	24,25 ± 2,01
0,6 ppm ZEA	10,80 ± 1,25	14,28 ± 1,05	18,13 ± 1,40	23,25 ± 1,35

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições; AAM, Aditivo anti micotoxinas (Safmannan[®]); ZEA, zearalenona

Já para ganho de peso foi observado que houve efeito independente da variável AAM, bem como sua interação com ZEA e com ZEA e tempo conjuntamente ($p < 0,05$). O tempo foi novamente significativo ($p < 0,01$). Observando os resultados dos contrastes temos que o uso do AAM está associado ao menor peso independentemente de quaisquer outras variáveis (diferença de -0.31). Fixando-se o tempo adicionalmente ao ZEA observa-se que o uso do AAM está associado ao maior ganho de peso após 21 dias de tratamento na administração de ZEA a 0,6 ppm ($p < 0,05$) e associada a menores pesos no começo do estudo (1ª semana) sem uso de ZEA ($p < 0,01$) (Tabela 2). Teixeira et al. (6) não observaram diferença de ganho de peso entre o grupo controle e o grupo intoxicado experimentalmente com 0,75 mg kg⁻¹ de ZEA, resultados em desacordo com o presente estudo.

Tabela 2. Efeito dos tratamentos (dietas) sobre o ganho de peso (em Kg) ao 7°, 14° e 21° dia de experimento¹.

Tratamentos (dieta)	Ganho de peso (kg)		
	7° dia	14° dia	21° dia
0,0% AAM			
0 ppm ZEA	4,42 ± 0,89	4,58 ± 0,78	5,80 ± 0,80
0,25 ppm ZEA	3,83 ± 0,67	4,74 ± 0,69	4,58 ± 0,67
0,6 ppm ZEA	4,04 ± 0,80	4,26 ± 1,20	4,25 ± 0,78
0,2% AAM			
0 ppm ZEA	3,93 ± 0,65	4,06 ± 0,36	4,27 ± 0,98
0,25 ppm ZEA	4,02 ± 0,80	4,61 ± 0,60	4,41 ± 0,20
0,6 ppm ZEA	3,48 ± 0,56	3,84 ± 0,74	5,12 ± 0,49

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições; AAM, Aditivo anti micotoxinas (Safmannan[®]); ZEA, zearalenona

Com relação ao consumo de ração, a variável AAM sozinha não apresentou significância estatística, mas sua interação com os níveis de ZEA sim ($p < 0,01$). Também foi observado efeito da variável tempo ($p < 0,01$). O consumo de ração foi estatisticamente maior na ausência de AAM quando não há presença de ZEA (T01) ($p < 0,01$). Considerando apenas a presença do AAM, o grupo de animais intoxicados com 0,25 ppm de ZEA tiveram maior consumo de ração ao final dos 21 dias (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito dos tratamentos (dietas) sobre o consumo de ração ao 7º, 14º e 21º de experimento¹.

Tratamentos (dieta)	Consumo de ração (kg)		
	7º dia	14º dia	21º dia
0,0% AAM			
0 ppm ZEA	5,77 ± 0,85	7,52 ± 0,55	9,02 ± 0,09
0,25 ppm ZEA	5,27 ± 0,53	7,15 ± 0,15	8,52 ± 0,18
0,6 ppm ZEA	5,33 ± 0,80	6,70 ± 1,48	7,97 ± 1,31
0,2% AAM			
0 ppm ZEA	5,40 ± 0,10	6,82 ± 0,54	7,89 ± 0,20
0,25 ppm ZEA	6,13 ± 0,33	7,66 ± 0,15	8,47 ± 0,19
0,6 ppm ZEA	5,04 ± 0,26	6,61 ± 0,66	8,08 ± 0,34

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições; AAM, Aditivo anti micotoxinas (Safmannan[®]); ZEA, zearalenona

Os resultados zootécnicos desse estudo, descritos anteriormente divergem com os de Ortiz et al. (16), que relataram ser benéfica a suplementação com AAM à base de parede celular de *S. cerevisiae* na dieta de monogástricos, pois promove o crescimento, possuindo ação promotora e favorável ao desenvolvimento e ao ganho de peso dos animais. Porém, de acordo com Andretta et al. (5) e Teixeira et al. (6) que relatam em suas pesquisas que a presença de ZEA não interferiu significativamente sobre os índices zootécnicos e sobre o desempenho produtivo dos animais.

Já para o volume vulvar (cm³) houve significância do uso do AAM independentemente das variações de ZEA ($p < 0,01$), sendo que o volume vulvar é maior na ausência do uso do AAM (Tabela 4). Foram também significativos os níveis de ZEA ($p < 0,01$), o tempo ($p < 0,01$) e a interação de ZEA e tempo ($p < 0,01$). Porém, não houve diferença significativa para a interação AAM e ZEA, mostrando que o AAM e a ZEA possuem efeitos fixos, o AAM possui a mesma capacidade de adsorção para as duas concentrações de ZEA, quando consideramos o volume vulvar. E ainda, o volume vulvar é sempre maior na ausência do uso do AAM, visto nas fêmeas do grupo T03 e T05. Os sinais clínicos hiperestrogênicos nas leitoas destes grupos, já podem ser notados a partir da primeira semana do experimento, cujos resultados foram similares aos descritos por Andretta et al. (4), com a adição de 2 mg kg⁻¹ ZEA na ração de leitoas. Portanto, o volume vulvar é a primeira manifestação a ser observada quando há intoxicação por ZEA, uma vez que aumenta rapidamente. O monitoramento do volume vulvar é uma ferramenta importante para avaliar a intoxicação por ZEA, e conseqüentemente a eficácia do AAM.

A análise dos resultados do peso relativo dos órgãos após o abate não detectou nenhuma significância estatística quanto ao peso relativo do fígado. Portanto, a inclusão de ZEA e/ou AAM nas dietas não afetou o peso relativo do órgão. Estes resultados encontrados estão em acordo com os de Andretta et al. (4), que também não observaram diferença para o peso absoluto e relativo do fígado entre o grupo controle e os grupos que ingeriram a ZEA.

Tabela 4. Efeito dos tratamentos (dietas) sobre o volume vulvar ao 7°, 14° e 21° dia de experimento¹.

Tratamentos (dietas)	Volume vulvar (cm ³)		
	7° dia	14° dia	21° dia
0,0% AAM			
0 ppm ZEA	3,24 ± 0,95	3,48 ± 1,58	6,14 ± 3,58
0,25 ppm ZEA	4,24 ± 0,93	9,94 ± 4,23	19,02 ± 7,59
0,6 ppm ZEA	9,21 ± 5,16	16,61 ± 12,42	34,66 ± 19,97
0,2% AAM			
0 ppm ZEA	2,10 ± 0,69	2,86 ± 0,95	3,82 ± 0,83
0,25 ppm ZEA	3,25 ± 1,12	6,57 ± 2,51	12,06 ± 5,83
0,6 ppm ZEA	5,93 ± 4,03	15,83 ± 13,05	25,46 ± 15,24

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições; AAM, Aditivo anti micotoxinas (Safmannan[®]); ZEA, zearalenona

Já o peso relativo do trato reprodutivo total foi estatisticamente significativo quanto à variável AAM ($p < 0,05$), independentemente dos níveis de ZEA. Como também houve diferença estatística significativa para a variável ZEA, sem a presença do AMM ($p < 0,01$). O peso relativo foi maior na ausência do AAM (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito dos tratamentos (dietas) sobre o peso relativo de órgãos ao 21° dia de experimento¹.

Tratamentos (dietas)	Peso relativo de órgãos (%)		
	Fígado	Trato reprodutivo total	Conjunto útero-ovário -vagina
0,0% AAM			
0 ppm ZEA	3,376 ± 0,822	0,089 ± 0,017	0,060 ± 0,013
0,25 ppm ZEA	3,256 ± 0,388	0,260 ± 0,012	0,198 ± 0,019
0,6 ppm ZEA	2,623 ± 0,387	0,367 ± 0,048	0,293 ± 0,029
0,2% AAM			
0 ppm ZEA	3,103 ± 0,206	0,092 ± 0,012	0,082 ± 0,017
0,25 ppm ZEA	3,057 ± 0,214	0,197 ± 0,036	0,154 ± 0,018
0,6 ppm ZEA	3,127 ± 0,123	0,335 ± 0,009	0,266 ± 0,022

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão das repetições; AAM, Aditivo anti micotoxinas (Safmannan[®]); ZEA, zearalenona

Por fim, o peso relativo do conjunto útero-ovário-vagina após o abate foi significativo para a variável ZEA isolada ($p < 0,01$), mostrando, mais uma vez, maior peso nas leitoas que consumiram ZEA na ausência de AAM. Ocorreu efeito da interação AAM e ZEA para este parâmetro, sendo que para as fêmeas intoxicadas com 0,25 ppm ZEA + 0,2% AAM (T04) ocorreu um menor peso relativo para este conjunto. Logo, o efeito do adsorvente foi dependente do nível de ZEA, não possuindo mais o efeito fixo para as duas concentrações de ZEA, sendo inclusive responsável por diminuir o peso relativo do conjunto útero-ovário-vagina quando aplicada a metodologia de contraste, comparando ao grupo T02 e T06.

Estes resultados concordam com Doll e Danicke (10), concluindo que o hiperestrogenismo causado pelo consumo de ZEA se torna mais evidente à medida que a concentração desta micotoxina aumenta. Os danos no trato reprodutivo das fêmeas são decorrentes da ingestão de ZEA, que ocorrem devido à competição desta micotoxina e de seus metabólitos, provenientes da metabolização hepática, pelos receptores estrogênicos (3).

A ingestão de ZEA causa aumento no útero em concentrações $> 0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ (4). Oliver et al. (12) descreveram resultados similares após o período de quatro semanas de consumo de ZEA, sendo que o peso do trato reprodutivo total dobrou em relação ao grupo sem ingestão de ZEA. Fato que ocorre em razão da ZEA e os seus metabólitos possuem alta afinidade de ligação pelos receptores estrogênicos no útero (3), estimulando uma maior produção de proteínas pela parede uterina, causando o aumento do peso deste órgão (7).

O uso da parede celular de *S. cerevisiae* tem se tornado um método cada vez mais difundido na produção animal com o objetivo de amenizar os efeitos das micotoxinas já presentes nos alimentos. Com relação à ZEA, a inclusão de parede celular de *S. cerevisiae* na dieta apresenta cerca de 80% de capacidade de adsorção desta toxina (9), sendo que os β -glucanos podem ser responsáveis pela maior parte da adsorção, e que esta ligação ocorre na superfície da PCL (20).

Desta forma, a inclusão do AAM na dieta no presente estudo não produziu nenhum efeito negativo sobre os parâmetros analisados, sendo inclusive, capaz de melhorar significativamente alguns parâmetros, possuindo capacidade de ligação / adsorção frente às concentrações de ZEA testadas (0,25 e 0,6 ppm). Entretanto, Huwig et al. (14) relataram capacidade da parede celular de linhagem de *S. cerevisiae* em adsorver ZEA na concentração de 2,7 mg, bem superiores às do presente estudo. Tais resultados servem para reforçar nossa hipótese de que as propriedades benéficas dos micro-organismos são dependentes da linhagem, e reforçam a necessidade de estudos deste tipo para novos AAM à base de produtos biológicos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a eficácia do produto, pois a sua inclusão conseguiu prevenir os efeitos tóxicos da ZEA.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à empresa Lesaffre do Brasil Produtos Alimentícios Ltda.

COMITÊ DE ÉTICA

Todos os procedimentos realizados encontram-se de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação animal, estabelecidos pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo o experimento aprovado pela mesma (protocolo 367/2013) em 11 de julho de 2013.

APOIO E FINANCIAMENTO: CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Keller LAM, Gonzalez Pereyra ML, Keller KM, Alonso VA, Oliveira AA, Almeida TX, et al. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. J Stored Prod Res. 2013;52:42-47.
2. Hauschild L, Lovatto PA, Lehnen CR, Carvalho AA, Garcia GG, Mallmann CA. Digestibilidade e metabolismo de dietas de suínos contendo zearalenona com adição de organoaluminossilicato. Pesq Agropec Bras. 2007;42:219-224.

3. Bryden WL. Mycotoxin contamination of feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Technol.* 2012;173:134-158.
4. Andretta I, Lovatto PA, Hauschild L, Dilkin P, Garcia GG, Lanferdini E, et al. Alimentação de leitoas púberes com dietas contendo zearalenona. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008;60: 1227-1233.
5. Andretta I, Lovatto PA, Lanferdini E, Lehnen CR, Rossi CAR, Hauschild L, et al. Alimentação de leitoas pré-púberes com dietas contendo aflatoxinas ou zearalenona. *Arch Zootec.* 2010;59:123-130.
6. Teixeira LC, Ferreira-Montiani F, Dittrich-Locatelli R, Santini E, Alberton GC. Effects of zearalenone in prepubertal gilts. *Pesq Vet Bras.* 2011;31:656-662.
7. Mostrom MS. Zearalenone. In: GUPTA, R. C. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles.* 2 ed. London: Academic Press, 2012. p.1266-1271.
8. Chatopadhyay P, Pandey A, Chaurasia AK, Upadhyay A, Karmakar S, Singh L. Hepatic hyperplasia and damages induces by zearalenone Fusarium Mycotoxins in BALB/c Mice. *Arch Gastroenterol.* 2012;49:77-81.
9. Fink-Gremmels J, Malekinejad H. Review Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim. Feed Sci Technol.* 2007;137:326-341.
10. DOLL S, Danicke S. The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Prev Vet Med.* 2011;102:132-145.
11. Mallmann CA, Dilkin P. *Micotoxinas e micotoxicoses em suínos.* Santa Maria: Sociedade Vicente Palloti; 2007.
12. Oliver WT, Miles JR, Diaz DE, Dibner JJ, Rottinghaus GE, Harrell RT. Zearalenone enhances reproductive tract development, but does not alter skeletal muscle signaling in prepubertal gilts. *Anim Feed Sci Technol.* 2012;174:79-85.
13. Keller KM, Oliveira AA, Almeida TX, Keller LAM, Queiroz BD, Nunes LMT, et al. Efeito de parede celular de levedura sobre o desempenho produtivos de frangos de corte intoxicados com Aflatoxina B1. *Rev Bras Med Vet.* 2012;34:101-105.
14. Huwig A, Freimund S, Kappeli O, Dutler H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett.* 2001;122:179-188.
15. Arrieta D, Pérez ML, Foncesa JH, Oviedo MG, Miranda S, Luengo A. Efecto Del consumo de cultivo de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* y/o selenio em pollos de engorde expuestos a bajos niveles de Aflatoxina B1 en la dieta. *Rev Cient Facult Cienc Vet Univ Del Zulia.* 2008;18:93-102.
16. Ortiz A, Reuto J, Fajardo E, Sarmiento S, Aguirre A, Arbelaz G, et al. Evaluación de la capacidad probiótica “in vitro” de una cepa nativa de *Saccharomyces Cerevisiae*. *Univ Sci.* 2008;13:138-148.

17. Klis FM, Boorsma A, Groot PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2006;23:185-202.
18. Brady D, Stoll AD, Starke LE, Duncan JR. Chemical and enzymatic extraction of heavy-metal binding polymers from isolated cell-walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 1994;44:297-302.
19. Zouboulis AI, Matis KA, Lazaridis NK. Removal of metal ions from simulated wastewater by *Saccharomyces* yeast biomass: Combining biosorption and flotation processes. *Separ Sci Technol*. 2001;36:349-365.
20. Yiannikouris A, François J, Poughon L, Dussap CG, Bertin G, Jeminet G, et al. Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Food Prot*. 2004;67:1195-1200.
21. Jiménez M, Máñez M, Hernández E. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *Int. J. Food Microbiol*. 1996; 29:417-421.
22. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº130, de 24 de maio de 2006. Institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 25 de maio de 2006.

Recebido em: 25/07/2015
Aceito em: 26/10/2016

AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DA TOXOPLASMOSE EM BUBALINOS DE TRÊS MESORREGIÕES DO ESTADO DO PARÁ¹

Valdelice de Lourdes Corrêa Pinheiro¹
Daniela Barbosa da Silva²
Gabriela Capriogli de Oliveira²
Kylma Lorena Saldanha das Chagas³
Alexandre do Rosário Casseb⁴
Sandro Patroca da Silva⁵
Andrea Maria Goes Negrão⁴
Hélio Langoni⁶

RESUMO

Com o objetivo de se investigar a frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bubalinos do Pará, foram escolhidas 256 amostras de soro sanguíneo de fêmeas bubalinas de forma aleatória, provenientes das seguintes mesorregiões Paraenses: Baixo Amazonas (n=87), Marajó (n=124) e Sudeste Paraense (n=45). As amostras faziam parte do banco de soro do laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) e foram submetidas ao Teste da Aglutinação Direta Modificada (MAT) para detecção de anticorpos da classe IgG anti- *Toxoplasma gondii*. Das 256 amostras de soros bubalinos analisados por esta técnica, 31,65% (81/256) resultaram positivas com títulos iguais ou maiores que 16, e 68,35% (175/256) delas mostraram-se não reagentes. O título mais frequentemente encontrado foi o de 16 (71,60%), seguido do título 64 (17,28%). Apenas dois animais (2,47%) apresentaram o título 1024 e somente um animal (1,23%) apresentou o título mais alto, de 4096. A presença de búfalos soropositivos é um indicativo da circulação do *Toxoplasma gondii* nas mesorregiões estudadas e isto merece uma atenção especial, visto que esses animais mantêm uma estreita relação com os seres humanos e servem de alimento, podendo, portanto, ser um meio de infecção para os humanos e os outros animais.

Palavras-chave: Toxoplasmose, búfalos, Pará, MAT.

SEROLOGICAL EVALUATION OF TOXOPLASMOSIS IN BUFFALOES FROM THREE MESORREGIONS OF PARÁ STATE.

ABSTRACT

Aiming to investigate the frequency of serological antibodies anti-*Toxoplasma gondii* in buffaloes from Pará, it was chosen 256 samples from buffaloes cows randomly. They were from the following mesoregions from Para: Baixo Amazonas (n=87), Marajó (n=124) e Sudeste Paraense (n=45). The samples were from the serum bank of the Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, from the Federal Rural University of Amazon and

¹ Médica Veterinária Residente em Inspeção Higienística Sanitária de Produtos de Origem Animal na Universidade Federal Rural da Amazônia. Contato para correspondência.

² Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Laboratório de Zoonoses. FMVZ- UNESP - Botucatu.

³ Residente em Diagnóstico por Imagem do Instituto da Saúde e Produção Animal na Universidade Federal Rural da Amazônia.

⁴ Professor Adjunto da Universidade Federal Rural da Amazônia. Instituto da Saúde e Produção Animal, Laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas dos Animais.

⁵ Instituto da Saúde e Produção Animal, Laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas dos Animais Universidade Federal Rural da Amazônia.

⁶ Professor Titular Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP.

were submitted to the Direct Agglutination Test (MAT) for the detection of IgG antibodies to *Toxoplasma gondii*. The 256 buffaloes sera samples analyzed by this technique, 31.65% (81/256) were positive, with titles bigger than or equal to 16 and 68.35% (175/256) of them were non-reactive. The most frequently title found was 16 (71.60%) followed by the title 64 (17.28%). Only two animals (2.47%) had the title 1024 and only one animal (1.23%) had the highest title (4096). The presence of seropositive buffaloes is an indicative of the *Toxoplasma gondii* movement in the mesoregions studied. This fact deserves special attention, because these animals maintain a close relationship with the humans and also serve as food. Therefore, they can be a mean of infection for men and other animals.

Keywords: Toxoplasmosis, buffaloes, Pará, MAT.

EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LA TOXOPLASMOSIS EN BUFALOS DE TRES MESORREGIONES DEL ESTADO PARA

RESUMEN

Con el fin de investigar la frecuencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en los búfalos de Pará, se eligieron 256 muestras de suero sanguíneo de hembras de búfalo al azar, de las siguientes mesorregiones paraenses: Bajo Amazonas (n = 87), Marajó (n = 124) y el sureste de Pará (n = 45). Las muestras fueron parte del banco de suero de Microbiología y Enfermedades Infecciosas de laboratorio de la Universidad Federal Rural de la Amazonia (UFRA) y fueron sometidos a la prueba de aglutinación directa modificada (MAT) para la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*. De las 256 muestras de suero de búfalos analizado por esta técnica, 31,65% (81/256) fueron positivos con títulos iguales o mayores que 16, y 68,35% (175/256) de ellos mostraron ser no reactivo. El título de 16 fuera el más frecuentemente encontrado (71,60%), seguido del título 64 (17,28%). Sólo dos animales (2,47%) tuvieron el título en 1024 y sólo un animal (1,23%) presentó el mayor título: 4096. La presencia de búfalos seropositivos es indicativo de la circulación del *Toxoplasma gondii* en mesorregiones estudiado y esto merece una atención especial, ya que estos animales mantiene una estrecha relación con los seres humanos y proporcionan alimento y por lo tanto pueden ser un medio de infección a hombres y otros animales.

Palavras chave: toxoplasmosis, búfalos, Pará, MAT.

INTRODUÇÃO

O Pará é uma das 27 unidades federativas do Brasil. É o segundo maior estado do país com uma extensão de 1.248.042,515 km² dividida em 144 municípios. Também é o estado mais populoso da região Norte, contando com uma população de 7.321.493 habitantes. Seu relevo é baixo e plano, sendo que 58% do território se encontra abaixo dos 200 metros. O clima típico da região é quente e úmido, caracterizado por muitas chuvas e temperatura média anual de 26,5°C. É dividido em seis mesorregiões: Baixo Amazonas, Marajó, Metropolitana de Belém, Nordeste Paraense, Sudoeste Paraense e Sudeste Paraense (1).

O Brasil tem atualmente um rebanho de cerca de 3,5 milhões de cabeças de búfalos de água (*Bubalus bubalis*), e segundo dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o Pará abriga o maior rebanho de búfalos do país, com cerca de metade do rebanho brasileiro, o que se deve em parte a boa produtividade e a fácil adaptação destes animais às condições geoclimáticas paraenses (2). A mesorregião do Marajó, por sua vez, possui metade do rebanho do estado, logo conclui-se que o maior rebanho brasileiro está

localizado no Marajó. Já o segundo maior rebanho bubalino está localizado na região do Baixo Amazonas e a região do Sudeste Paraense concentra o quarto maior rebanho (1).

A toxoplasmose é uma importante doença parasitária frequentemente encontrada em nosso meio e devido ao seu potencial zoonótico é de grande importância em saúde pública. Nos animais de produção, a doença é responsável por grandes perdas econômicas, principalmente, devido abortamentos (3).

Com o desenvolvimento de técnicas laboratoriais para o diagnóstico da toxoplasmose, tem sido possível a realização de estudos soroepidemiológicos em humanos, assim como em muitas espécies animais (4). Porém de acordo com Silva et al. (2), pouco se sabe sobre a infecção em alguns animais de produção, especialmente em búfalos, nos quais se estima que estes animais, assim como os bovinos, não manifestem sintomatologia clínica quando infectados, devido sua elevada resistência natural ao parasita.

Como já mencionado, o estado do Pará possui o maior rebanho de búfalos do país e há poucas informações sobre a prevalência da infecção nestes animais, que podem, por isso, estarem servindo como fonte de infecção para seres humanos (2). Tomando como base tais informações, a importância que este protozoário tem em saúde pública e a importância das mesorregiões estudadas na representatividade do rebanho bubalino paraense, o objetivo do presente estudo foi avaliar os aspectos sorológicos da toxoplasmose em bubalinos nas mesorregiões do Marajó, Baixo Amazonas e Sudeste Paraense pelo teste de Aglutinação Direta Modificada (MAT).

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de soro pertenciam a três mesorregiões do Pará: Baixo Amazonas (n=87), Marajó (n=124) e Sudeste Paraense (n=45), totalizando 256 amostras. Todas eram provenientes de fêmeas bubalinas, com idade acima de 36 meses e faziam parte do banco de soros sanguíneos do laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). Estas foram escolhidas de forma aleatória, sendo coletadas anteriormente na calha de sangria de um matadouro do estado. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da UFRA, sob o Protocolo 052/2013 (CEUA) – Processo UFRA 23084.016456/2013-37, do projeto intitulado Imunodiagnóstico e Aspectos Epidemiológicos da Leptospirose, Toxoplasmose, Brucelose e Tuberculose em Animais Domésticos no Estado do Pará. Foi utilizada a técnica de Aglutinação Direta Modificada, conforme descrito por Desmonts e Remington (5).

Foram consideradas positivas as diluições onde houve a formação de uma película cobrindo pelo menos metade do fundo da cavidade, e negativas quando o antígeno depositou-se no fundo do poço, ocorrendo à formação de “botão ou anel no fundo” de contorno bem definido. Os animais com títulos iguais ou maiores a 16 foram considerados positivos. Inicialmente, para a triagem desses animais foram feitas diluições seriadas de 1:16 a 1:64. Essas diluições foram escolhidas por serem utilizadas nas maiorias dos trabalhos como ponto de corte. Os soros dos animais com títulos iguais a 64 foram novamente diluídos seriadamente e testados até chegar ao título máximo da reação (4096). Foram utilizados soro controles positivos e negativos previamente testados para a técnica por tentativas e erros. Os soros que responderam em três testes consecutivos foram utilizados como controle.

Para avaliação dos dados sorológicos foi realizada análise estatística descritiva simples, pelo encontro de frequências absolutas e relativas, sendo possível ilustrar, por meio de tabelas e gráficos, os dados sorológicos encontrados. Nas análises estatísticas que compararam a diferença dos resultados por mesorregiões foi utilizado o teste do qui-quadrado (χ^2), tendo nível alfa de 0,05 e utilizando o software BioEstat 5.3.

O Teste de Aglutinação Direta Modificada (MAT) realizado nesta pesquisa foi processado no 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” (UNESP) campus de Botucatu, São Paulo.

RESULTADOS

Das 256 amostras de soros bubalinos analisados pela MAT, para a investigação de animais sororreagentes contra *Toxoplasma gondii*, 31,65% (81/256) tiveram resultados positivos com títulos iguais ou maiores que 16. A figura 1 apresenta os resultados percentuais da ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* nos soros dos búfalos investigados.

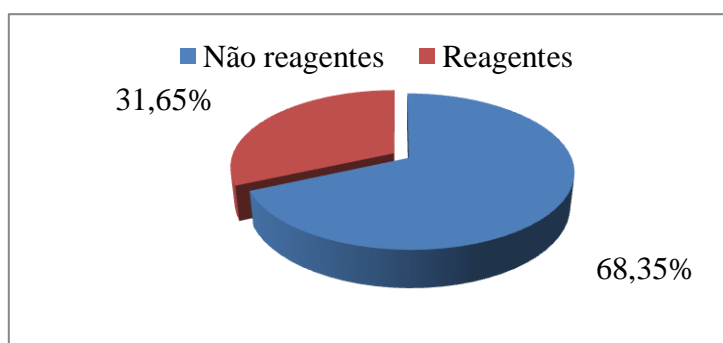


Figura 1. Percentual de bubalinos reagentes e não reagentes no teste da Aglutinação Direta Modificada para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

Em relação aos perfis sorológicos dos bubalinos examinados de acordo com a mesorregião de procedência dos animais observou-se uma variação de 8,04% a 71,11% na frequência de sororreagentes entre as mesorregiões. O teste do qui-quadrado, quando aplicado a esses dados, revelou haver diferença estatística significativa entre as mesorregiões ($p < 0,0001$; $\chi^2 = 55,09$). O título mais frequentemente encontrado foi 16 (71,60%), seguido do título 64 (17,28%). Apenas seis animais apresentaram o título 256, correspondendo 7,41% do total. Apenas dois animais (2,47%) apresentaram o título 1024 e somente um animal (1,23%) apresentou o título maior, de 4096.

Quanto à titulação encontrada dos bubalinos examinados de acordo com a mesorregião de procedência, observa-se que em todas elas, o título mais frequentemente encontrado foi o de 16 (83,34% no Marajó, 57,15% no Baixo Amazonas e 59,38% no Sudeste Paraense). Somente na região do Sudeste Paraense, obteve-se um reagente (3,12% do total de animais) até a titulação máxima (4096) e somente a região do Baixo Amazonas apresentou um maior número de animais com títulos até 256 (28,57%) do que até 64 (14,28%) (tabela 1).

Tabela 1. Perfil sorológico do *Toxoplasma gondii* em bubalinos de acordo com a mesorregião de procedência dos animais.

Procedência	Positivos (n)	%	Títulos (n)				Total
			16	64	256	1024	
Marajó	42	33,87	35	4	2	1	42
Baixo Amazonas	07	08,04	4	1	2	0	07
Sudeste Paraense	32	71,11	19	9	2	1	31
Total							

n: número de animais

%; porcentagem de animais positivos

Obs: A mesorregião do Sudeste Paraense foi a única que apresentou um reagente até a maior titulação (4096).

DISCUSSÃO

Este estudo demonstra, a partir da MAT, a diferença sorológica para a toxoplasmose em três mesorregiões paraenses, tal qual o proposto por Daguer (6), que argumenta que este tipo de avaliação é válida, pois a infecção toxoplásmica varia de região para região devido a alguns fatores, como: o tamanho da amostra proveniente de cada região, a sensibilidade do teste sorológico empregado e as particularidades de cada local. Baseado nisso foi feita a escolha aleatória dos soros de modo que o maior número de amostras (124) foram provenientes da mesorregião do Marajó, que possui o maior rebanho de búfalos do estado do Pará (cerca de 280.000 cabeças). A mesorregião do Baixo Amazonas possui o segundo maior rebanho bubalino paraense com cerca de 142.000 cabeças, e por isto foi a segunda em maior número de amostras (87). Já a região do Sudeste Paraense foi a região com menos amostras de soros analisadas (45) devido esta ser a quarta em produtividade bubalina no estado do Pará (7900 cabeças em média) (1).

Os resultados de bubalinos soropositivos encontrados neste estudo (31,65%) foi bastante superior aos demais encontrados utilizando a MAT como técnica diagnóstica. Dubey et al. (7) não conseguiram determinar anticorpos anti-*T.gondii* em búfalos do Egito, a partir desta técnica. Doze anos depois, no entanto, Shaapan et al. (8) repetiram o estudo e encontraram 22,5% de soropositivos no local.

Os resultados revelados na presente pesquisa são ainda superiores aos encontrados em diferentes partes do Brasil. Pita Gondim et al. (9), utilizando o Teste da Aglutinação em Latex, encontraram 3,85% de bubalinos soropositivos na Bahia. Silva et al. (10) no Pará, encontraram somente 1,1% de búfalos positivos, utilizando a RIFI como técnica diagnóstica. Este estudo demonstrou maior proximidade de resultados com aquele realizado por Silva et al. (2) também no Pará. Estes autores encontraram 41,6% de soropositivos pelo ELISA e 36% pela RIFI. Em São Paulo, Souza et al. (11) também encontraram um elevado número de animais sororreagentes (49,9%) pela RIFI. Esta diferença de animais sororreagentes entre as diferentes regiões se deve basicamente ao tipo de manejo dos animais, a quantidade de amostras coletadas, bem como o teste sorológico utilizado (12). Essa discrepância de achados, ainda, de acordo com Silva et al. (2), pode estar diretamente relacionada à sensibilidade e especificidade das diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas bem como a ausência de um título de corte padrão entre as mesmas.

A elevada prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* encontrada neste estudo pode ser atribuída, possivelmente, ao ineficiente manejo sanitário dos rebanhos estudados, e a ausência de um diagnóstico rotineiro aliado ao controle deficiente (13). Isto tudo decorre, muitas vezes, da falta de informação do produtor frente aos mecanismos de transmissão e prevenção da doença. Fatores socioeconômicos das regiões estudadas também devem ser levados em consideração quando se analisa a positividade de qualquer doença. Quanto a isso, temos como exemplo a mesorregião do Marajó, uma das regiões alvo deste estudo. Esta região possui um dos menores índices de desenvolvimento humano (IDH) do país e nela se observa a ocorrência de múltiplas doenças infectocontagiosas (2). Dentre estas, temos a toxoplasmose, como demonstrado neste trabalho.

No entanto, de acordo com Silva e Silva (14) a mesorregião do Sudeste Paraense juntamente com a metropolitana de Belém, são economicamente mais expressivas que as demais mesorregiões. E, neste estudo, a mesorregião do Sudeste Paraense foi aonde mais se obteve búfalos reagentes (71,11%), apesar da boa condição socioeconômica da localidade. Porém, apesar de ser a mesorregião mais desenvolvida em relação às outras estudadas, é a região do Pará que atualmente apresenta um dos maiores índices de desmatamento, o que favorece a movimentação de felinos silvestres – responsáveis pela contaminação ambiental – no meio rural (14).

Os baixos títulos apresentados pelos bubalinos no presente trabalho (16 em 71,60% dos positivos e 17,68% na titulação 64) corroboram com os demais estudos realizados no Pará, indicando uma possível infecção subclínica nesses animais. Silva et al. (2) utilizando ELISA e RIFI como métodos diagnósticos, encontraram 62,71% dos búfalos com título igual a 64. Silva et al. (10), também relataram a maioria dos sororreagentes com título de 64, utilizando a RIFI. Da mesma forma, Benigno et al. (15), pelo teste de aglutinação indireta, relataram 71,43% dos bovinos com titulação 64. Existe, no entanto, a possibilidade de alguns desses resultados serem falsos positivos por possível reação cruzada com outros protozoários Apicomplexa, especialmente do gênero Neospora.

Com relação às mesorregiões, a mais frequentemente estudada pela maioria dos autores é a região do Marajó, e isso se dá pela importância econômica que a criação de búfalos tem nessa região. As demais mesorregiões não são estudadas como um todo, no entanto, alguns estudos abordam alguns municípios provenientes destas. Silva et al. (2), realizaram estudo com amostras provenientes de Paragominas (mesorregião do Sudeste Paraense) e encontraram 15 sororreagentes de 20 coletados, o equivalente a 75% de amostras positivas (no presente estudo foi encontrado 33,87% de sororreagentes). Silva et al (10), observaram, no município de Xinguara, também pertencente ao Sudeste Paraense, uma prevalência em torno de 38%, se aproximando dos estudos de Silva et al. (2). Estes mesmos autores estudaram ainda o município de Oriximiná (mesorregião do Baixo Amazonas) e encontraram 80% de sororreagentes, valor este bem acima do encontrado no presente trabalho (8,04%).

As diferenças regionais da frequência da infecção por *T. gondii* nas diferentes espécies já são bem conhecidas (6). Os resultados da presente pesquisa corroboram esses fatos, uma vez que foi observada diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos bubalinos reagentes de acordo com as três mesorregiões de procedência dos animais ($p < 0,0001$; $\chi^2 = 55,09$).

CONCLUSÕES

A presença de búfalos soropositivos, ainda que com titulação baixa, é um indicativo da circulação do *Toxoplasma gondii* nas mesorregiões estudadas (Baixo Amazonas, Marajó e Sudeste Paraense). O elevado número de búfalos soropositivos nestas mesorregiões merece uma atenção especial, visto que esses animais mantêm uma estreita relação com os seres humanos e servem de alimento, podendo, portanto, ser um meio de infecção para humanos e os outros animais.

- Data de aprovação na comissão de ética: 31/01/2014.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2010 [cited 2010 Set 30]. Available from: <http://www.ibge.gov.br>.
2. Silva JB, Fonseca AH, Andrade SJT, Silva AGM, Oliveira CMC, Barbosa JD. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no estado do Pará. Pesqui Vet Bras. 2013;33:581-5.
3. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii* from animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30:1217-68.
4. Liesenfield O. Oral Infection of c57BL/6 Mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? J Infect Dis. 2002;185:96-101.

5. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. J Clin Microbiol. 1980;11:562-8.
6. Daguer H. Ocorrência da infecção por *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) em bovinos e funcionários de matadouro da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2003.
7. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998;11:267-99.
8. Shaapan RM, El-Nawawy FA, Tawfik MA. Sensitivity and specificity of various serological tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. Vet Parasitol. 2008;153:359-62.
9. Pita Gondim LFP, Barbosa Jr HV, Ribeiro Filho CHA, Saeki H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. Vet Parasitol. 1999;82:273-6.
10. Silva SP, Mota RA, Faria EB, Fernandes EFTS, Neto OLS, Albuquerque PPF, et al. Anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em búfalas (*Bubalis bubalis*) criadas no Estado do Pará. Pesqui Vet Bras. 2010;30:443-6.
11. Souza CO, Tashima NT, Silva MA, Tumitan ART. Estudo transversal de toxoplasmose em alunas de um curso superior da região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43:59-61.
12. Dubey JP. A review of toxoplasmosis in wild birds. Vet Parasitol. 2002;106:121-53.
13. Viana RB, Del Fava C, Moura ACB, Cardoso EC, Araújo CV, Monteiro BM, et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, *Brucella* sp e *Leptospira* spp, em búfalos (*Bubalis bubalis*) criados na Amazônia. Arq Inst Biol. 2009;76:453-7.
14. Silva FC, Silva LJM. História regional e participação social nas mesorregiões paraenses. Papers NAEA. 2008;226:1-22.
15. Benigno RNM, Francez LC, Souza CJ, Souza CJ, Serra-Freire NM. Avaliação soroprevalência da toxoplasmose em bovídeos criados no Marajó e encaminhados para abate em Belém-Pará. Rev Cienc Tecnol. 2009;9:14-23.

Recebido em: 29/02/2015

Aceito em: 31/10/2016

EFICÁCIA ACARICIDA DA ASSOCIAÇÃO DE CIPERMETRINA, FENTHION E CLORPIRIFÓS EM BOVINOS NATURALMENTE INFESTADOS POR *Rhipicephalus microplus* NA AMAZÔNIA MATOGROSSENSE

Maycon Junior Heidmann¹
Anderson Augusto Dionisio de Souza²
Cristiano Grisi do Nascimento³
Gabrielle Nellis Bragaglia⁴
Lidia Marinho Silva Lima⁴
Sandra Barioni Toma⁴
Simone Cristina Rosa⁴
Bruno Gomes de Castro⁵

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a eficácia da associação do piretróide Cipermetrina e dos organofosforados Fenthion e Clorpirifós frente ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em um rebanho naturalmente infestado no estado de Mato Grosso, foram avaliados 24 animais com infestação média de 33,11 teleóginas. Após divisão randomizada dos animais em dois grupos, foi utilizada a formulação tópica por pulverização FC-30 (Ourofino Saúde Animal, SP, Brasil) na metade dos animais, enquanto que a outra metade foi utilizada como grupo controle. Foram realizadas contagens dos carrapatos três dias antes do tratamento, e semanalmente após a aplicação do produto (eficácia terapêutica), bem como avaliando sua reinfestação (eficácia preventiva). Perfis terapêuticos e preventivos indicam que a formulação controla o parasitismo por *R. (B.) microplus* em bovinos por pelo menos 21 dias após o tratamento.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, controle químico, resistência acaricida.

ACCARICIDE EFFICACY OF CYPERMETHRIN, FENTHION AND CHLORPYRIFOS ASSOCIATION IN NATURAL INFESTED CATTLE WITH *Rhipicephalus microplus* IN AMAZON REGION

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the efficacy of an association of pyrethroids and organophosphate formula in the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* control in a natural infested cattle from Mato Grosso State. They were evaluated 24 animals with 33.11 engorged female ticks of medium infestation. After a randomized division in two groups, 12 animals were treated with the formulation FC-30 (Ourofino Animal Health, SP, Brasil) and the other half was the controlled group. After treatment, they were made week counts (therapeutic efficacy), as well the reinfestation (preventive efficacy). Therapeutic and preventive profiles

¹ Médico Veterinário - Secretaria de Agricultura de Ipiranga do Norte, MT.

² Acadêmico de Medicina Veterinária - UFMT Sinop.

³ Convolution Antiparasitary Division, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

⁴ Ourofino Agronegócio Ltda, Cravinhos, SP, Brasil.

⁵ Prof. Adjunto da Universidade Federal de Mato Grosso Campus Universitário de Sinop. Av. Alexandre Ferronato, 1200 - Sinop, MT. 78557-267 Contato para correspondência.

showed efficacy of the formulation in the control of *R. (B.) microplus* in the tested cattle for, at least, 21 days after treatment.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, chemical control, acaricidal resistance.

EFICACIA ACARICIDA DE LA ASOCIACIÓN ENTRE CIPERMETRINA, FENTIÓN Y CLORPIRIFOS EN BOVINOS NATURALMENTE INFESTADOS POR *Rhipicephalus microplus* EN LA AMAZONIA MATOGROSENSE

RESÚMEN

Con el objetivo de evaluar la eficacia de la asociación entre el piretroide Cipemetrina y los organofosforados FentiÓN y Clorpirifos frente a la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, en un rebaño naturalmente infestado en el estado de Mato Grosso, fueron evaluados 24 animales con infestación media de 33,11 teleóginas. Luego de la división aleatoria de los animales en dos grupos, se utilizó la formulación tópica por pulverización FC-30 (Orofino Salud Animal, SP, Brasil) en la mitad de los animales, mientras que la otra mitad fue utilizada como grupo control. Se realizaron recuentos de las garrapatas tres días antes del tratamiento y semanalmente luego de la aplicación del producto (eficacia terapéutica). También se analizó la reinfestación de estos animales (eficacia preventiva). Los perfiles terapéuticos y preventivos indican que la formulación controla el parasitismo por *R. (B.) microplus* en bovinos por lo menos 21 días después del tratamiento.

Palabras clave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, control químico, resistencia acaricida.

INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de carne bovina ocupa posição de destaque no contexto da economia rural brasileira, ocupando vasta área do território nacional e respondendo pela geração de emprego e renda de milhões de brasileiros. Além disso, a pecuária de corte nacional possui uma diversidade de sistemas de produção advinda, sobretudo, das diversidades regionais. Essas variações estão diretamente relacionadas com as diferenças de clima, fertilidade dos solos e tipo de tecnologia empregada na cadeia produtiva e, principalmente o impacto dos problemas sanitários sobre a produtividade do rebanho (1).

Os carrapatos e as enfermidades por eles transmitidas são problemas para o desenvolvimento da bovinocultura em todo o mundo. Dentre as espécies de carrapato de grande importância na Sanidade Animal, destaca-se *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Esta espécie é parasita habitual de bovinos e animais silvestres na América do Sul, tendo sua relevância associada à espoliação do animal, levando-o à perda de peso, baixa conversão alimentar, além da possibilidade de transmissão de patógenos (2,3). De acordo com Grisi et al. (4), no Brasil, as perdas econômicas relacionadas ao controle e tratamento dos patógenos transmitidos estava em torno de dois milhões de dólares por ano.

Como método de controle da população da referida espécie, no Brasil, o uso de acaricida é amplamente utilizado, sendo, muitas das vezes, utilizado de forma incorreta (2). Desta forma, o uso indevido e indiscriminado de formulações sem auxílio técnico, bem como o uso em subdoses está levando a geração de populações de carrapato multi-resistentes à acaricida em diversas regiões do Brasil (5). Diversos estudos reportaram a resistência de populações de *R. (B.) microplus* a organofosforados, piretróides sintéticos, amitraz, ivermectina e inclusive a fipronil, ou seja, grande parte dos grupos de drogas acaricidas disponíveis no mercado nacional (6,7,8).

Dentre os produtos de maior comercialização para controle de carrapatos em animais domésticos, o grupo dos piretróides, como a cipermetrina, vem sendo usado desde a década de 80, principalmente pela baixa toxicidade aos animais, bem como pelo alto poder residual. Além disso, as associações de piretróides e organosfosforados tem sido uma das principais ferramentas no controle deste parasito, apresentando ainda eficácia satisfatória, mesmo com o crescente problema da resistência parasitária (9).

O momento atual se caracteriza pela crise no desenvolvimento de novas moléculas carrapaticidas. Assim, o combate ao carrapato está direcionado a pesquisas de estratégias de controle, isto é, uma combinação do uso prudente e racional dos parasiticidas disponíveis com as alternativas de controle, que levam à manutenção de populações parasitárias abaixo do seu limiar econômico com um mínimo impacto ambiental (10).

Diante deste panorama, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia carrapaticida de uma formulação tópica por pulverização a base de Cipermetrina associado a Clorpirifós e Fenthion (FC-30, Ourofino Saúde Animal), em bovinos naturalmente infestados por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, de diferentes origens da região amazônica do estado de Mato Grosso, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados no estudo 24 bovinos adultos, em bom estado nutricional, mestiços, com idade entre 12 e 72 meses e peso variando entre 210 e 504 Kg em propriedade rural localizada no município de Ipiranga do Norte, Mato Grosso, entre os meses de julho a setembro de 2012. Foram incluídos machos e fêmeas, de acordo com a quantidade disponível na propriedade. Este número de animais concorda com os requisitos mínimos estabelecidos pela Portaria Nº 48/1997 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (11). Não foi verificada nenhuma chuva durante o período de estudo.

A propriedade foi selecionada pois praticava a terminação dos animais, adquirindo os mesmos de diversas propriedades de diferentes municípios da região amazônica matogrossense. Dispondo assim de uma população de carrapatos de diferentes origens dentro do estado de Mato Grosso.

Os animais que apresentavam bom estado físico geral e uma infestação mínima de 20 fêmeas ingurgitadas com tamanho variando de 4,5 a 8 mm foram identificados com brincos plásticos numerados, e mantidos em piquetes com suplementação de sal mineral e água *ad libitum*.

Os animais foram selecionados por avaliação clínica e aclimatados nos sete dias anteriores ao tratamento com a formulação. Nos três dias antecedentes ao tratamento (-3, -2 e -1), foi feita contagem total do número de teleóginas presentes no corpo dos bovinos. No dia -1 os animais foram identificados de acordo com a infestação média dos três dias anteriores ao tratamento, sendo que os dois animais com maior contagem foram alocados um em cada grupo (tratado e controle) e assim sucessivamente até atingir a repetição 12, totalizando doze animais em cada grupo experimental.

Foi realizada a diluição do produto seguindo a proporção de 25 mL do produto COLO-15 (Ourofino Saúde Animal, SP, Brasil) para cada 20 litros de água. O produto foi diluído, bem homogeneizado e pulverizado com bomba de pulverização sobre todo o corpo do animal, incluindo orelhas, barbela, axilas, virilhas, o início da cauda e toda a parte inferior do animal, deixando-o completamente molhado.

A contagem foi realizada por um mesmo observador, considerando as fêmeas ingurgitadas com comprimento de 4,5 a 8 mm. Após o tratamento dos animais, as contagens foram efetuadas nos dias +7, +14, +21, +28 e +35.

Para o cálculo da eficácia do tratamento foi utilizada a fórmula preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Portaria nº 48, 12/05/1997.

Os grupos Tratado e Controle foram comparados em todas as datas experimentais. Os dados foram analisados de forma a comparar as variáveis em um delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e 12 repetições por tratamento.

Os dados foram transformados $[\log_{10}(n+1)]$ e depois submetidos ao teste F e se necessário ao Teste T, na dependência do tipo de distribuição. Foi utilizado o programa Excel para a realização das referidas análises. As análises consideraram um nível de significância de 5%. Os demais parâmetros avaliados durante o estudo foram relatados de forma descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo foram verificados que os animais apresentavam um alto índice de infestação no pré-tratamento, onde o número de carrapatos $\geq 4,5$ mm nos animais variou de 23 a 62 teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, visto que a maior parte dos animais utilizados era da raça Nelore ou mestiços de nelore com raças zebuínas, raças predominantemente mais resistentes ao parasitismo por carrapatos. Nos 24 animais selecionados para o estudo foi verificada uma média de 33,04 carrapatos por animal nos três dias anteriores ao tratamento; sendo 32,83 ($\pm 10,94$) teleóginas nos animais do grupo controle e 33,25 ($\pm 10,73$) no grupo tratado. Não foi encontrada diferença estatística das médias de teleóginas entre os grupos controle e tratado nos momentos pré-tratamento.

Os dados referentes às contagens dos 24 animais avaliados, até o 35º dia se encontram no Gráfico 1 e nas Tabelas 1 e 2.

Em relação às contagens pós-tratamento, o grupo controle apresentou média de teleóginas de 33,67; 40,92; 33,42; 34,58 e 38,17 nos dias +7, +14, +21, +28, +35, respectivamente. Enquanto que o grupo tratado apresentou média de teleóginas de 1,50; 1,83; 2,67; 8,00 e 35,00 nos dias +7, +14, +21, +28, +35, respectivamente.

Com base no cálculo da taxa de eficácia, a formulação em teste apresentou eficácia carrapaticida de 95,54%; 95,52%; 92,02%; 76,87% e 8,30% nos dias +7, +14, +21, +28 e +35, respectivamente (Gráfico 2).

Quando avaliada a média do número de teleóginas, foi verificada diferença estatística entre os grupos controle e tratados com a formulação em questão nos dias +7, +14, +21 e +28.

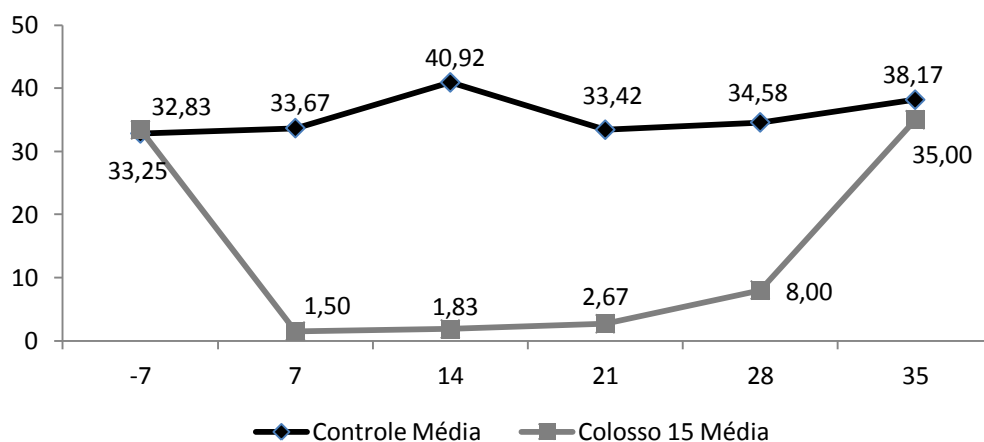


Gráfico 1. Média de teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos tratados e não tratados criados em propriedade em Ipiranga do Norte, Mato Grosso.

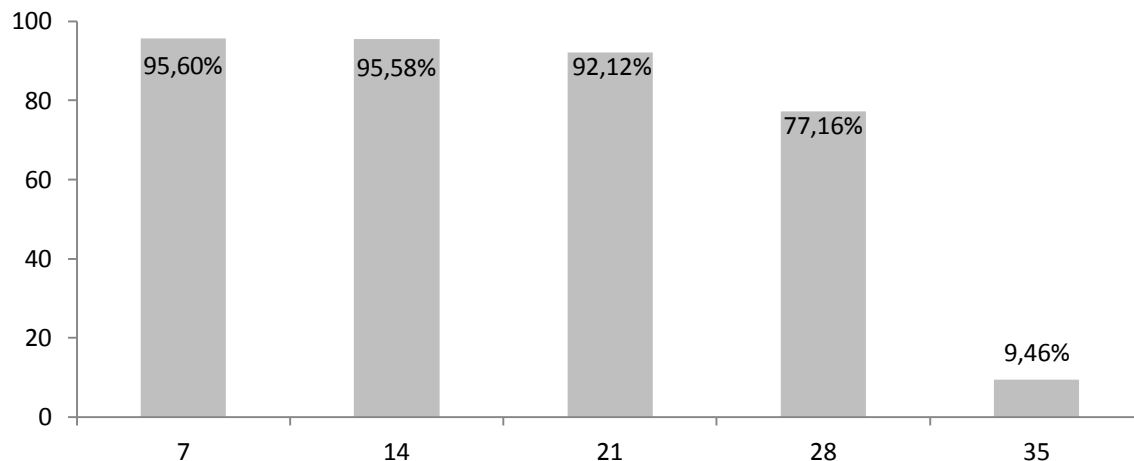


Gráfico 2. Eficácia carrapaticida (%) da formulação COLO 15 verificada durante os 35 dias de estudo.

Tabela 1. Contagem de teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos não tratados criados em propriedade em Ipiranga do Norte, Mato Grosso.

Grupo/ animal	Número de teleóginas $\geq 4,5\text{mm/Dia}$ experimental					
	Pré-tratamento	+7	+14	+21	+28	+35
Controle						
54	62	73	84	66	69	73
31	42	38	48	37	37	44
1	43	40	50	43	48	53
5	36	38	41	35	41	52
25	30	27	34	27	25	32
35	29	31	37	28	28	28
14	29	33	38	35	37	33
20	27	27	28	27	25	25
22	25	27	35	32	32	37
23	24	25	36	23	23	28
16	24	23	31	23	23	30
2	23	22	29	25	27	23
Média	32,83^a	33,67^a	40,92^a	33,42^a	34,58^a	38,17^a
Desv. Pad.	10,94	13,20	14,51	11,45	12,84	14,15

Quanto à eficácia carrapaticida, partindo-se do princípio de uma eficácia média mínima de 95%, exigida na portaria 48 do MAPA, para avaliações dos dias +7 e +14 em estudo de campo, o produto em teste mostrou-se eficaz no controle do carrapato *R. (B.) microplus*, quando empregado via pulverização.

Ao longo de todo período experimental, não foram observados efeitos adversos que pudessem ser atribuídos ao emprego do produto e, conseqüentemente, serem acreditados ao seu emprego.

Tabela 2. Contagem de teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos tratados criados em propriedade em Ipiranga do Norte, Mato Grosso.

Grupo/ animal	Número de teleóginas $\geq 4,5\text{mm/Dia}$ experimental					
	Pré- tratamento	7	14	21	28	35
Colo 15						
4	56	2	0	8	12	46
27	49	3	3	3	5	32
33	45	3	4	2	11	36
32	38	8	8	0	16	33
29	30	0	0	9	13	38
37	30	0	0	0	0	32
9	29	0	0	0	13	23
24	27	0	0	3	8	17
34	25	2	5	3	7	55
30	24	0	2	0	3	21
6	23	0	0	4	4	47
8	23	0	0	0	4	40
Média	33,25^a	1,50^b	1,83^b	2,67^b	8,00^b	35,00^a
Desv. Pad.	10,73	2,29	2,54	2,98	4,74	10,75
Eficácia %		95,60	95,58	92,12	77,16	9,46
Valor P	0,898	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,584

Os resultados obtidos neste estudo apresentaram populações de carrapatos ainda não resistentes à Cipermetrina associado a Clorpirifós e Fenthion. Apesar de poucos estudos terem avaliado a eficácia ixodicida da associação química testada neste estudo; é possível verificar que em relação a produtos à base, exclusivamente, de Cipermetrina, diversos outros estudos realizados em território nacional, grande parte dos rebanhos testados o produto não apresentou eficácia carrapaticida em nenhum período do estudo, como apontado por diversos autores (2,12,13,14).

A taxa de eficácia média encontrada durante os vinte e oito dias de estudo foi maior que as observadas em outros estudos. Gomes et al. (15) verificaram, no estado de Mato Grosso do Sul, eficácia acaricida de formulação de cipermetrina associada a outros organofosforados de 82,68% em testes *in vitro*. Outros estudos apresentaram uma situação mais alarmante com relação à resistência de carrapatos *R. (B.) microplus* a piretróides associados a diversos organofosforados, como descrito em outro estudo (16) no estado da Bahia. Neste estudo, foi verificada média de apenas 23,18% de eficácia da referida associação. De forma semelhante, foi verificada uma eficácia média de uma formulação à base exclusivamente de Cipermetrina durante os anos de 2009 a 2011 de apenas 74% em estudo realizado no Rio Grande do Sul (14).

De acordo com o observado em outros estudos, formulações a base de piretróides e organofosforados devem ser utilizadas de forma a controlar infestações por *R. (B.) microplus* na região de Sorriso, Mato Grosso. Ademais, medidas de controle no uso de carrapaticidas devem ser tomadas para não se observar uma crescente resistência do carrapato às bases ectoparasiticidas encontradas no mercado, como verificado nos estudos já realizados no Brasil.

De acordo com outros autores (15), um agravante com relação à situação da resistência dos carrapatos é representado pela frequente constatação de falhas de manejo decorrentes da falta de apoio técnico como uso sistemático de um único produto ou classe acaricida, tratamento vinculado à ocorrência de formas adultas, número excessivo de aplicações anuais (17). De modo geral, constata-se uma elevada deficiência quanto ao acesso às informações técnicas que embasem o correto uso de produtos antiparasitários. Percebe-se, também, uma clara resistência ou negligência dos produtores quanto à adoção de recomendações técnicas já conhecidas como, por exemplo, o manejo estratégico (18).

Embora o controle químico apresente limitações, formas alternativas de controle do carrapato, tais como a aplicação de imunoterápicos e o controle biológico, respectivamente, ainda não são viáveis para grandes rebanhos (19). Por sua vez, a utilização de inseticidas naturais ou fitoterápicos, de modo geral, tem gerado resultados contraditórios com relação ao controle do carrapato bovino, em especial quanto à validação no campo dos resultados observados em laboratório (20,21).

Conclui-se que novos estudos devem ser realizados e estendidos a todo estado a fim de acompanhar o perfil de eficácia acaricida de produtos ectoparasiticidas no estado de Mato Grosso, como também identificar possíveis cepas resistentes de carrapatos *R. (B.) microplus* em propriedades rurais da região.

REFERÊNCIAS

1. Faria FF, Socoloski SNG, Zane AC, Santos R, Gomes SC, Castro BG. Levantamento de propriedades na região Centro-Oeste brasileira: aspectos sanitários, produtivos e reprodutivos em rebanho bovino de elite e comercial. *Rev Acad Cienc Agrar Ambient.* 2012;10:81-9.
2. Mendes MC, Lima CKP, Nogueira AHC, Yoshihara E, Chiebao DP, Gabriel FHL, et al. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;178:383-8.
3. Sharma AK, Kumara R, Kumara S, Nagara G, Singh NK, Rawat SS, et al. Deltamethrin and cypermethrin resistance status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from six agro-climatic regions of India. *Vet Parasitol.* 2012;188:337-45.
4. Grisi L, Massard CL, Moya Borja GE, Pereira JB. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet.* 2002;125:8-10.
5. Graf JF, Gogolewsk N, Leach-Bing GA, Sabatini MB, Molento EL, Arantes GJ. Tick control: an industry point of view. *Parasitology.* 2004;129:427-42.
6. Molento MB, Dias B. Avaliação da eficácia de produtos carrapaticidas contra o *Boophilus microplus* na região de Umuarama, Paraná. *Arq Cienc Vet Zool UNIPAR.* 2000;3:321.
7. Mendes MC, Veríssimo CJ, Kaneto CN, Pereira JR. Bioassays for measuring the acaricides susceptibility of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) in São Paulo state, Brazil. *Arq Inst Biol.* 2001;68:23-7.
8. Castro-Janer E, Martins JR, Mendes MC, Namindome A, Klafke GM, Schumaker TTS. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. *Vet Parasitol.* 2010;173:300-6.

9. Leal AT, Freitas DRJ, Vaz Junior IS. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Sci Vet.* 2003;31:1-11.
10. Food and Agriculture Organization. Producción y sanidad animal. Resistencia a los antiparasitarios: estado actual com énfasis en América Latina [Internet]. Roma: FAO; 2003 [cited 2013 Jul 10]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/006/y4813s/y4813s03.htm>.
11. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BR). Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 48, de 12 de maio de 1997. Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. Diário Oficial da União [Internet]. 16 Maio 1997 [cited 2013 Jul 10]; Sec. 1; p.10165. Available from: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=2118>.
12. Silva WW, Athayde ACR, Araújo GMB, Santos VD, Silva Neto AB. Resistência de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) a carrapaticidas no semi-árido paraibano: efeito da cipermetrina e do amitraz. *Agropecu Cient Semi-arido.* 2005;1:59-62.
13. Andreotti R, Guerrero FD, Soares MA, Barros JC, Miller RJ, León AP. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011;20:127-33.
14. Santos FCC, Vogel FSF. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente ao amitraz e cipermetrina em rebanhos bovinos no Rio Grande do Sul de 2005 a 2011. *Rev Port Cienc Vet.* 2012;111:121-4.
15. Gomes A, Koller WW, Barros ATM. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*-a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cienc Rural.* 2011;41:1447-52.
16. Raynal JT, Silva AAB, Sousa TJ, Bahiense TC, Meyer R, Portela RW. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013;22:71-7.
17. Farias NA, Ruas JL, Santos TRB. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. *Cienc Rural.* 2008;38:1700-4.
18. Furlong J, Martins JRS, Prata MCA. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; 2003.
19. Freitas DRJ, Pohl PC, Vaz Jr IS. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. *Acta Sci Vet.* 2005;33:109-17.
20. Matias R, Solon S, Resende UM, Gomes A, Koller WW. Estudo químico-farmacológico de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus*. *Ensino Cienc.* 2003;7:283-93.

21. Chagas ACS. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. Rev Bras Parasitol Vet. 2004;13:156-60.

Recebido em: 11/08/2015

Aceito em: 31/10/2016

MILK QUALITY AND PROFILE OF PRODUCERS FROM A MILK PICK-UP ROUTE

Patrícia Yoshida Faccioli-Martins¹
Marcela de Pinho Manzi²
Glaucea Suman Maiolino²
Carlos Roberto Padovani³
Benedito Donizete Menozzi²
Helio Langoni²

ABSTRACT

The aim of this study was to perform a follow-up evaluation of both the milk quality and the profile of 34 dairy milk producers at the central-west region of São Paulo State and one producer at Campinas region, also in São Paulo State, Brazil. Data were collected from farms during three visits at two-month mean intervals, including a questionnaire to verify the herd size and the adopted management. Monthly data of total bacterial count (TBC) and somatic cell count (SCC) provided by the dairy plant were also recorded. The producers had variable characteristics such as: from three to 111 lactating animals; daily production ranging from 10 to 3,632.8 liters. Of the 35 farms, 15.4% and 27.8% had SCC and TBC, respectively above the limits established by the Brazilian Ministry of Agriculture Livestock and Food Supply (MAPA), according the Normative Instruction (IN 51). Only 17.65% farms carried out all hygienic procedures recommended for milking, while 17.65% do not received any type of technical support. The studied farms belong to small to medium-scale farmers with the potential to increase their production and improve milk quality, since they already refrigerated the product and had a certain automation degree. These results indicate the importance of adopting sanitary education activities for the production of more hygienic milk, as well as actions for mastitis control.

Keywords: SCC, TBC, milk quality, dairy farms.

QUALIDADE DO LEITE E PERFIL DOS PRODUTORES DE UMA LINHA DE ENTREGA DE LEITE

RESUMO

O objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação sequencial da qualidade do leite e o perfil de 34 produtores de leite da região Centro-Oeste e de um produtor da região de Campinas no estado de São Paulo. Os dados das propriedades foram coletados durante três visitas com intervalo médio de dois meses, incluindo um questionário para verificar o tamanho do rebanho e manejo realizado. Foram anotados ainda os dados mensais de contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) fornecidos pelo laticínio. Os produtores da região tinham características diferentes como: de três a 111 animais em lactação, produção diária variável de 10 a 3.632,8 litros. Das 35 propriedades, 15,4% e 27,89% apresentaram em média contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), respectivamente, acima dos limites determinados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de acordo com a instrução normativa 51, vigente na época. Apenas

¹Pesquisadora A – Sanidade Animal. Embrapa Caprinos e Ovinos – Sobral, Ceará, Brasil.

² Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. FMVZ – UNESP-Botucatu. Contato principal para correspondência: hlangoni@fmvz.unesp.br.

³ Departamento de Bioestatística. Instituto de Biociências – UNESP-Botucatu.

17,65% das propriedades realizavam todos os procedimentos de higiene na ordenha e 17,65% não recebiam nenhum tipo de suporte técnico. Foi possível observar que as propriedades são de produtores de pequeno a médio porte, com potencial para aumentar a produção e melhorar a qualidade do leite, pois já refrigeravam o produto e apresentavam algum grau de tecnificação. Conclui-se ainda pela importância da adoção de atividades de educação sanitária para a obtenção mais higiênica de leite e de ações para controle de mastites.

Palavras-chave: CCS, CBT, qualidade de leite, IN 51, propriedades leiteiras.

CALIDAD DE LA LECHE Y EL PERFIL DE LOS PRODUCTORES DE UNA LINEA DE TRANSPORTE DE LA LECHE

RESUMÉN

El objetivo de este estudio fue una evaluación secuencial de la calidad de la leche y el perfil de 34 productores de leche en la región central y un productor de la región de Campinas en Sao Paulo. Se recogieron los datos de las propiedades durante tres visitas con un intervalo promedio de dos meses, incluyendo un cuestionario para comprobar el tamaño de los rebaños y la gestión realizada. También se registraron los datos mensuales del recuento total de bacterias (TBC) y el recuento de células somáticas (SCC) proporcionada por la industria láctea. Los productores de la región tenían características diferentes como tres a 111 animales lactantes, variables de producción diaria de 10 a 3.632,8 litros. De las 35 propiedades, 15.4% y 27.89% tenían un recuento medio de células somáticas (SCC) y el recuento total de bacterias (TBC), respectivamente, por encima de los límites establecidos por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA), la de acuerdo con la instrucción normativa 51, vigente en el momento. Sólo el 17,65% de las propiedades a cabo todos los procedimientos de higiene para el ordeño y el 17,65% no recibió ningún tipo de soporte técnico. Se observó que las propiedades son pequeñas a de tamaño medio, con el potencial para aumentar la producción y mejorar la calidad de la leche, como ya resfriaban el producto y tenía algún grado de tecnificación. De ello se desprende también la importancia de la adopción de actividades de educación sanitaria para la obtención de la leche más higiénica y acciones para controlar la mastitis.

Palabras clave: SCC, TBC, calidad de la leche, granjas lecheras.

INTRODUCTION

Milk is of extreme importance for human diet and its consumption has increased, requiring production with high nutritional quality and safety to the health (1,2). Noticing the delay in the federal sanitary legislation as to milk production, the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) elaborated the Normative Instruction no. 51, 2002 (IN 51), aimed at updating the norms according to the reality of each region of the country for consequent improvement in dairy farming and milk quality (3).

A large number of farmers did not adapt to those requirements and continued producing and transporting milk inadequately before delivering it to the dairy plant; in addition, they faced mastitis as one of the major problems affecting the herd. Thus, IN 62 came into effect in December 2011, which extended the period for producers to adapt to the new quality limits (4). Considering such a reality, milk quality has been affected by the lack of hygiene, and the losses caused by mastitis have led to decreased production, which constitutes a public health hazard due to the risk of pathogen transmission and dissemination of toxins through the milk to humans (1,5,6).

Normative Instruction no. 51, published in 2002, was gradually implemented in the south, southeast and central-west regions of the country since July 2005. It established quality limits for SCC and TBC. In July 2005, the required limits were 1,000,000 cells/mL and 1,000,000 CFU/mL, respectively. In July 2007, these values were reduced to 750,000 cells/mL and 750,000 CFU/mL. In 2011 (IN 62), these limits were reduced to 600,000 cells/mL and 600,000 CFU/mL for the region where the present study was carried out; for our result analysis, we will consider the SCC and TBC limits in force when this study was conducted.

In spite of the obtained advances, milk quality does not seem to have improved as desired since studies have still shown a high percentage of farms that have not reached the required parameters of SCC and TBC/mL milk. This led MAPA to create IN-62 with a series of recommendations and actions to improve the quality of milk supplied for consumption (4).

Reduced payment for the milk, as a punishment for the farmer who does not reach the established SCC and TBC limits, has not motivated producers to revert this situation to higher quality milk production.

On the other hand, the dairy plants that do not pay for quality do not strive to qualify farmers to produce a greater volume of milk of higher quality. Stimulating the farmers to improve productivity, as well as milk quality, would certainly reduce the cost with shipping and increase the shelf life of products and subproducts, raising the possibility of launching differentiated products with higher value added.

A data survey of the laboratories of the Brazilian Network of Milk Quality Control (RBQL) revealed that, of all assessed items, TBC was the greatest problem and, of the six labs at that time, five had 18.4 to 68.99% samples with TBC values above the limit in force (7).

Considering the importance of milk quality, the present study aimed to assess SCC and TBC, as well as the profile of 35 producers from a milk pick-up route at the central west region of São Paulo State.

MATERIAL AND METHODS

Thirty-five dairy farms at the municipalities of Botucatu, Pardinho, Pratânia, Itatinga, Torre de Pedra, Bofete, Porangaba, Cesário Lange and Quadra, from a milk pick-up route, were visited between 19/06/2008 and 28/02/2009 for three times at two-month mean intervals (except for Farm no. 71, which was visited only twice because the producer was out of the dairy plant pick-up route after the second collection).

During the visits, a questionnaire was applied to producers to verify the characteristics of the herd and the adopted management type. The recorded data included TBC and SCC supplied by the dairy plant, from the milk quality program conducted at the Milk Clinics – Esalq/USP, for the months of visits.

Associations were established by means of Mann-Whitney (Tables 1 and 5) and Kruskal-Wallis non-parametric tests (Tables 2 and 3).

RESULTS AND DISCUSSION

There was great diversity among farms for herd size, production volume and management type. The total number of cows per herd varied from 5 to 170, with mean of 43.9 and median of 35 cows. The number of lactating cows ranged from 3 to 111, with mean of 27.4 and median of 19 animals.

Some farms were not very productive; a few had only three lactating animals and their daily production was 10 litters, slightly higher than 3 litters/cow, while others had 111 lactating cows and daily production of 3,632.8 litters, almost 33 litters/cow. Mean milk

production per animal was low (8.42 liters a day), with mean among farms of 303.8 liters and median of 136 liters a day. Mean production of cows per day ranged from 1.88 to 35.99 liters, and the coefficient of variation (CV) was 68.89%. The same profile was reported by Nero et al. (8) for farms in the region of Viçosa – Minas Gerais State, Brazil, assessed in 2007; most of them were small with less than 15 lactating animals and their daily production was inferior to 50 liters.

A great part of farmers at the studied region have remained in the sector as a family tradition, with poor infrastructure, reduced number of animals— most of which without genetics aimed at milk production, little knowledge of good production practices, and lack of financial resources. Several of these characteristics have been reported for different regions of the country (9,10).

This reinforces the importance of a program for stimulating small farmers to update their dairy production, which would improve the supply chain, the quality of the product provided for consumption, and the production and profitability, meeting the demands of the internal and external market. Brito et al. (11) pondered the need of training farmers to adopt a program of good production practices, so that milk contamination with antibiotic residues and pesticides, for example, could be prevented, ensuring the quality of the milk produced in the farm.

As to the quality of milk in immersion tanks or cans, the monthly SCC and TBC values were assessed for the three months of visit. The vast majority of assessed milk samples were from 29 individual cooling tanks (82.86%), 5 immersion tanks (14.29%) and one community tank (2.85%).

SCC ranged from 4,000 to 2,586,000 cells/mL, with mean of 468,228 cells/mL and CV of 78.30%. TBC ranged from 4,000 to 9,999,000 CFU/mL, with mean of 1,099,773 CFU/mL and CV of 174.4%. SCC and TBC values greatly varied, even for one same farm. Such variations many times exceeded the limits established by MAPA, resulting in a public health risk, as well as in losses both to the producers, due to milk disposal, and to the industry. This indicates important failures in the milk supply chain, which must be detected and corrected. Nero et al. (12) assessed raw milk quality based on TBC and detected 21.3% samples with levels above the limit for the region of Viçosa – Minas Gerais State, 56% for the region of Pelotas – Rio Grande do Sul State, 47.6% for the region of Londrina – Paraná State, and 68% for the region of Botucatu – São Paulo State. These results are relevant and evidence the importance of sanitary education actions for milk producers, regardless of the herd type and size, considering that the dairy sector has significantly contributed to the Brazilian agribusiness.

Considering all 35 studied farms, 11 (31.4%) had SCC beyond the limit established by MAPA in some collections, reaching the maximal value of 2,586,000 cells/mL in some situations. SCC did not represent a great problem for most producers, since the herd of these farms is generally composed of crossbred cattle, which show lower production and are more resistant to mastitis. Animals that are more productive are more susceptible to intramammary infections and thus tend to show higher SCC and TBC values, reflecting in the quality of the produced milk.

As to TBC, a rather larger number of farms (57.1%) were not in accordance with the normative instruction in force during the study period (750 CFU/mL), reaching the maximal value of 9,999,000 CFU/mL. The greatest problem for many herds has been the high TBC, which is also related to the inadequate hygiene of facilities, animals and equipment during the milking process. Pre-milking cleaning is extremely important for hygienic milk production, since this practice eliminates a large quantity of microorganisms contaminating the milk.

Nero et al. (12) studied the quality of raw milk from 210 farms located at four important milk-producing Brazilian states: Minas Gerais (MG), Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) and São Paulo (SP). In SP, 50 farms at Botucatu municipality were investigated and, at that

moment, 68% had aerobic mesophilic count above the limit established for that period (10^6 CFU/mL), a value close to that obtained in the present study (57.1%).

Several factors are important for improving milk quality. The industries in general have concentrated their effort in aspects relative to the product refrigeration and transportation at low temperatures, which mainly interferes in the bacterial growth rate, one of the determinants of the microbiological quality of the product. Actions should still be directed to a second group of factors which are linked to milk initial contamination from the mammary gland, the outer part of the udder, the milking equipment and tools, the cooling tank and, finally, the quality of the water used in the whole process (7).

The community tank that was part of the present study showed SCC of 269,000, 293,000 and 247,000 cells/mL, while TBC values were 586,000 CFU/mL, 793,000 and 3,399,000 CFU/mL in the first, second and third collections, respectively. Low SCC was expected because these farmers have low production herds and their production is not sufficient for installing their own tank. On the other hand, TBC values were not in accordance, indicating a hygiene problem at the farms of origin and in transportation. These counts were superior to those found by Souza et al. (13) who assessed milk from a community tank supplied by nine farms. They obtained values between 2.1×10^5 and 3.3×10^5 CFU/mL and suggested that the quality of the product is due to its almost familiar use, as well as to the confidence among each other and common interests.

Results of the correlation between the tank type and the variables daily production of cows, SCC and TBC of the tank are shown in Table 1. There was a significant difference ($p < 0.01$) only for milk production at farms with an individual cooling tank, compared to farms with an immersion tank. Farms with an individual cooling tank had milk production median of 7.50 liters, compared to 4.88 liters at farms with an immersion tank. The milk production median (L/cow/day) at farms with an immersion tank was significantly lower compared to that at farms with a cooling tank, which confirms the low production when the immersion system is kept. For producers who have no conditions of obtaining the cooling tank, immersion is a reasonable option, but it is important to gradually replace it since its cleaning is more difficult, there is less temperature control and the refrigeration distribution is irregular. In addition, the can may fall, allowing the entrance of dirty water in the milk, consequently contaminating the product.

Table 1. Descriptive measures of variables according to the type of tank used at the studied farms. Botucatu-SP, 2010.

Variable	Descriptive measure	Type of tank		p value
		Individual cooling	Immersion	
Mean production (L/cow/day)	Minimal value	2.00	1.88	p<0.01
	1 st Quartile	5.00	4.00	
	Median	7.50 ^b	4.88 ^a	
	3 rd Quartile	11.47	6.42	
	Maximal value	35.97	7.50	
	Mean	8.94	5.14	
	Standard deviation	6.06	1.65	
SCC (cells/mL)	Minimal value	86000.0	4000.0	p>0.05
	1 st Quartile	252250.0	171000.0	
	Median	388000.0	245500.0	
	3 rd Quartile	589750.0	741000.0	
	Maximal value	2586000.0	1335000.0	
	Mean	472942.5	438928.6	
	Standard deviation	434991.9	434991.0	
TBC (CFU/mL)	Minimal value	4000.0	8000.0	p>0.05
	1 st Quartile	54250.0	220000.0	
	Median	162000.0	499000.0	
	3 rd Quartile	722250.0	1709000.0	
	Maximal value	9999000.0	3990000.0	
	Mean	1074105.0	1259286.0	
	Standard deviation	1985404.0	1481939.0	

Median values followed by different letters indicate significant differences between the tank types according to Mann-Whitney non-parametric test.

As regards the milking type, 55.88% farms employed a milking machine; however, the adopted cleaning procedures were not adequate, since only 17.65% performed all necessary procedures for hygienic milking and mastitis control such as washing of teats, pre-dipping, drying of teats, post-dipping, and adoption of dry cow therapy at the end of lactation. This routine, except for dry cow therapy, was practiced by 2.94%. The majority (55.88%) performed only some of these practices, while 23.53% carried out milking without any previous cleaning care. Basic procedures such as washing under running water and drying of teats reduce the number of bacteria on the teats; however, such a reduction is more efficient if associated with antiseptics (14).

Correlation of the variables daily production of cows, SCC and TBC of the tank with the milking type showed a significant difference (p<0.01) for the production median in cases of mechanical milking. At farms with mechanical milking, milk production median was 10.00 liters, compared to 5.00 liters at those with manual milking and 4.17 liters in cases of manual and mechanical milking (Table 2).

Table 2. Descriptive measures of variables according to the type of milking used at the studied farms, Botucatu-SP, 2010.

Variable	Descriptive measure	Type of milking			p value
		Manual	Mechanical	Manual and Mechanical	
Mean production (L/cow/day)	Minimal value	2.00	3.13	1.88	p<0.01
	1 st Quartile	3.30	7.23	2.45	
	Median	5.00 ^a	10.00 ^b	4.17 ^a	
	3 rd Quartile	7.15	13.48	4.48	
	Maximal value	10.00	35.97	4.58	
	Mean	5.29	11.34	3.54	
	Standard deviation	4.78	6.50	1.46	
SCC (cells/mL)	Minimal value	4000.0	86000.0	91000.0	p>0.05
	1 st Quartile	201000.0	245750.0	149000.0	
	Median	388000.0	351000.0	323000.0	
	3 rd Quartile	590000.0	602500.0	720500.0	
	Maximal value	1335000.0	2586000.0	853000.0	
	Mean	442111.1	493000.0	422333.3	
	Standard deviation	291503.9	423538.4	390591.0	
TBC (CFU/mL)	Minimal value	8000.0	4000.0	220000.0	p>0.05
	1 st Quartile	85000.0	33750.0	270000.0	
	Median	271000.0	113000.0	420000.0	
	3 rd Quartile	1754750.0	578750.0	2858250.0	
	Maximal value	5783000.0	9999000.0	3671000.0	
	Mean	1221845.0	977039.6	1437000.0	
	Standard deviation	1778501.0	2054403.0	1937284.0	

Median values followed by different letters indicate significant differences among the milking types according to Kruskal-Wallis non-parametric test

The use of mechanical milking by 55.88% farms shows their interest in automation. Production at farms with mechanical milking was higher. Milking automation is positive to the farm management, but the equipment maintenance and cleaning should be respected, following the good production practices (15). Accumulation of dirt, milk residues and bacteria favors the occurrence of mastitis since milking is the major opportunity for microorganism transmission (16), as well as for an increase in TBC and a fall in milk quality (17).

As to technical assistance, 17.65% farms did not receive any type of support, 17.65% received community assistance from "Casa da Lavoura", 55.88% received private assistance and 8.82% concomitantly received community and private assistance. A large number of producers did not search for support and guidance as to sanitary management of the herd and production improvement.

Association between the type of technical assistance and mean milk production, SCC and TBC indicated that farms receiving private or community assistance had higher production and lower SCC. TBC values varied, making the analysis difficult. The highest value (9,999,999 CFU/mL) was reached by a farm without any technical assistance and the lowest value (4,000 CFU/mL) by a farm with private technical assistance. Considering medians, the lowest TBC was obtained by a farm with private technical assistance, followed by farms with community assistance and those without assistance; however, there was no significant difference between the latter, reflecting the importance of technical assistance to control milk quality. The importance of technical assistance and rural extension for small farmers was also remarked by Santos et al. (18). The variables daily production of cows, SCC and TBC of the tank, correlated to the type of technical assistance, are shown in Table 3.

Table 3. Descriptive measures of variables according to the type of technical assistance received at the studied farms. Botucatu-SP, 2010.

Variable	Descriptive measure	Type of technical assistance				p value
		None	Community ^C	Private	Community and Private	
Mean production (L/cow/day)	Minimal value	1.88	2.08	2.59	2.61	p<0.01
	1 st Quartile	3.54	4.63	5.06	3.71	
	Median	5.68 ^a	5.88 ^a	8.21 ^b	7.50 ^{ab}	
	3 rd Quartile	7.41	7.84	12.94	8.65	
	Maximal value	12.50	14.22	35.97	8.89	
	Mean	5.91	6.60	10.20	6.48	
	Standard deviation	3.13	3.25	6.89	2.71	
SCC (cells/mL)	Minimal value	91000.0	86000.0	4000.0	204000.0	p<0.05
	1 st Quartile	260500.0	315250.0	199750.0	378750.0	
	Median	533500.0 ^{ab}	549000.0 ^b	297000.0 ^a	453000.0 ^{ab}	
	3 rd Quartile	832000.0	615000.0	487000.0	479250.0	
	Maximal value	1700000.0	906000.0	2586000.0	770000.0	
	Mean	634350.0	481421.1	405345.5	451857.2	
	Standard deviation	457452.8	217375.4	376822.5	169646.1	
TBC (CFU/mL)	Minimal value	10000.0	21000.0	4000.0	179000.0	p<0.01
	1 st Quartile	98000.0	111000.0	27000.0	238500.0	
	Median	371000.0 ^{ab}	271000.0 ^{ab}	77000.0 ^a	2047000.0 ^b	
	3 rd Quartile	1701000.0	2002250.0	529000.0	4116000.0	
	Maximal value	9999000.0	5783000.0	5327000.0	7159000.0	
	Mean	1459400.0	1473947.0	666347.3	2462143.0	
	Standard deviation	2465307.0	2156116.0	1321782.0	2765553.0	

^C Community technical assistance means assistance by "Casa da Lavoura"

Median values followed by different letters indicate significant differences among the technical assistance types according to Kruskal-Wallis non-parametric test

Farms receiving private assistance had milk production median of 8.21 liters, compared to 5.68 liters for farms without technical assistance and 5.88 liters for those receiving community assistance. Association between private and community technical assistance showed higher milk production, but without significant difference compared to the remaining types.

SCC and TBC were lower for farms receiving private technical assistance, relative to those receiving community assistance.

As shown in Table 4, on average 15.4% farms had SCC values superior to 750,000 cells/mL and 27.8% had TBC values superior to 750,000 CFU/mL, above the limits in force at the moment of this study, suggesting the importance of establishing an educational program aimed at improving milk quality.

Table 4. Distribution of SCC and TBC values for the 35 assessed farms. Botucatu- SP, 2010.

	Collection			Mean
	1 st	2 nd	3 rd	
SCC (cells/mL)				
≤ 4x10 ⁵ n (%)	21 (60)	20 (57.1)	17 (50)	19 (55.7)
between 4x10 ⁵ and 7.5x10 ⁵ n (%)	11 (31.4)	8 (22.9)	11 (32.4)	10 (28.9)
> 7.5 x10 ⁵ n (%)	3 (8.6)	7 (20)	6 (17.6)	5 (15.4)
Total n (%)	35 (100)	35 (100)	34 (100)	
TBC (CFU/mL)				
≤ 1x10 ⁵ n (%)	10 (28.6)	15 (42.9)	14 (41.2)	13 (37.6)
between 1x10 ⁵ and 7.5x10 ⁵ n (%)	15 (42.8)	9 (25.7)	12 (35.3)	12 (34.6)
> 7.5x10 ⁵ n (%)	10 (28.6)	11 (31.4)	8 (23.5)	10 (27.8)
Total n (%)	35 (100)	35 (100)	34 (100)	

Results of the procedures used in the milking management and their influence on SCC are shown in Table 5. There was no significant difference in SCC for farms that performed washing, pre-dipping, cleaning with cloth or paper towel, post-dipping or dry cow therapy, compared to those that did not carry out such procedures. Association between the latter and SCC indicated non-significant difference among farms probably because the animals were more rustic and resistant to intramammary infections. Nevertheless, these procedures are essential to control mastitis, as well as to reduce both SCC and TBC in the milk

Table 5. Descriptive measures of SCC (cells/mL) mean values at the three collections according to the milking management type. Botucatu-SP, 2010.

Type of hygiene/procedure	Is it performed?		p value
	No	Yes	
Washing	465762 ± 261301 ^A	464083 ± 274844	p>0.05
	462833 (173333; 1057000) ^B	418500 (116000; 1368000)	
Pre-dipping	451812 ± 195283	491879 ± 383662	p>0.05
	456667 (116000; 800000)	3338333 (143667; 1368000)	
Cleaning with cloth/paper towel	382695 ± 169908	509546 ± 299236	p>0.05
	368500 (173333; 638667)	429667 (116000; 1368000)	
Post-dipping	465768 ± 227351	462697 ± 344336	p>0.05
	456667 (116000;1057000)	338333 (173333; 1368000)	
Dry cow therapy	431667 ± 226284	544233 ± 342498	p>0.05
	429667 (116000; 1057000)	391833 (276667; 1368000)	

^A Mean ± standard deviation

^B Median (minimal value; maximal value)

There was no significant difference between the management types according to Mann-Whitney non-parametric test

CONCLUSIONS

The data obtained from the studied regions indicated that those small farmers have the potential to increase their production and improve milk quality, since they already refrigerate the product and show a certain automation degree. The implantation of IN 51 seems to have had little influence on the farmers, resulting in minimal improvement in milk quality for some farms, which suggests the need of direct actions to stimulate improvements, such as payment for quality, technical support and constant training of workers.

Consequently, the produced milk will be safe food of high quality both for own consumption, for the industry in the processing and preparation of by products, and especially for the final consumer.

The present results show the reality of the milk supply chain in Brazil, where farms have highly different characteristics and animals have highly variable genetic traits and production, while a large number of farms produce milk below the quality standards desired by MAPA, especially considering SCC and TBC/mL milk. This study evidences the need of establishing an educational program for farmers and stimulating higher quality milk production by granting bonuses to the farmers based on the quality of the milk produced and delivered to the dairy plant.

ACKNOWLEDGEMENTS

To FAPESP for financial support to this study and for the direct doctoral scholarship to P.Y. Faccioli-Martins - grant #2007/00680-0, São Paulo Research Foundation (FAPESP) and grant #2009/51603-1, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

REFERENCES

1. Costa EO. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. *Comun Cient Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo*. 1991;15(1):21-6.
2. Fagundes H, Oliveira CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Cienc Rural*. 2004;34(4):1315-20.
3. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 51, de 20 de Setembro de 2002. *Diário Oficial da União*. 2002;Sec 1:13.
4. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 62, de 29 de Dezembro de 2011. *Diário Oficial da União*. 2011;Sec 1:6.
5. Mota RA, Pinheiro Júnior JW, Silva DR, Silveira NSS, Gomes SM, Silva LBG, et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. *Rev Napgama*. 2004;7(1):10-3.
6. Guimarães FF, Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, Pantoja JCF, Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci*. 2013;96(5):2866-72.
7. Pinto JPAN, Izidoro TB. Qualidade do leite: a Instrução Normativa nº 51/MAPA e os novos paradigmas. *Hig Aliment*. 2007;21(1):14-6.
8. Nero LA, Viçosa GN, Pereira FEV. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Cienc Tecnol Aliment*. 2009;29(2):386-90.
9. Zoccal R. Cem recomendações para o bom desempenho da atividade leiteira. *Comun Tec, Juiz de Fora*. 2004;39:1-8.
10. Lopes AD, Oliveira MDS, Fonseca MI. Características técnicas das propriedades de baixa escala leiteira observadas na área de abrangência do escritório de desenvolvimento rural de Jaboticabal – SP. *Rev Cienc Ext*. 2010;6(2):32-45.
11. Brito JRFB, Pinto SM, Souza GN, Arcuri EF, Brito MAVP, Silva MR. Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. *Acta Sci Vet*. 2004;32(2):125-31.
12. Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Pinto JPAN, Andrade NJ, et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Cienc Tecnol Aliment*. 2005;25(1):191-5.
13. Souza V, Nader Filho A, Ferreira LM, Cereser ND. Características microbiológicas de amostras de leite de tanque comunitário. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009;61(3):758-61.
14. Brito JRF, Brito MAVP, Verneque RS. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. *Cienc Rural*. 2000;30(5):847-50.

15. Santos MV. Boas práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite. In: Carvalho MP, Santos MVO. Brasil e a nova era do mercado do leite: compreender para competir. 1a ed. Piracicaba: Agripoint Ltda; 2007. p.135-54. v.1.
16. Smith TH, Fox LK, Middleton JR. Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in closed dairy herd. J Am Vet Med Assoc. 1998;212(4):553-6.
17. Amaral LA, Isa H, Dias LT, Rossi OD, Nader FA. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. Pesqui Vet Bras. 2004;24(4):173-7.
18. Santos NW, Weirich Neto PH, Looddi MM, Rocha CH. Tecnologia desmistificada como base de extensão rural. Rev Conex UEPG. 2009;5(1):70-4.

Recebido em: 08/08/2016

Aceito em: 31/10/2016

ESTUDO DA DINÂMICA DA POPULAÇÃO DE CÃES VACINADA CONTRA A RAIVA NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU/SP DE 2005 A 2014

Selene Daniela Babboni¹
Fábio Sossai Possebon¹
Gumerindo Oliveira Junior²
José Rafael Modolo¹

RESUMO

Conhecer a estrutura, o tamanho e a dinâmica da população canina de uma localidade é importante para o planejamento de programas de controle de zoonoses. Um desses programas diz respeito às campanhas de vacinação contra a Raiva de cães que, no município de Botucatu, SP, são realizadas desde 1968. No presente estudo, foram estimados parâmetros relacionados à dinâmica populacional canina no Município para cães vacinados durante a realização de dez campanhas anuais contra a Raiva, no período de 2005 a 2014. Os dados para as avaliações foram obtidos a partir das fichas de cadastro dos cães vacinados. Para análise estatística foram utilizados testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Os estudos realizados permitiram as seguintes conclusões: 1) há um maior número de animais entre 1 a 5 anos de idade; 2) os proprietários têm levado seus animais para serem vacinados nas campanhas, porém a população normalmente demora a se conscientizar da importância da primovacinação; com o passar do tempo, os donos dos cães vão tomando consciência da necessidade das vacinações anuais; 3) a comparação entre a categoria sexo dos cães não é estatisticamente significativa; 4) quando avaliada a cobertura vacinal durante os últimos dez anos, o ano de 2014 foi que o que apresentou uma menor cobertura vacinal, 64% dos cães vacinados. Os parâmetros da dinâmica populacional canina neste estudo servirão de auxílio para a elaboração de programas de controle de zoonoses transmitidas pelos cães em Botucatu.

Palavras – chave: cães, dinâmica populacional, campanhas contra a Raiva.

STUDY OF THE CANINE POPULATION DYNAMICS VACCINATED AGAINST RABIES IN THE CITY OF BOTUCATU/SP FROM 2005 TO 2014

ABSTRACT

Knowing the structure, size and dynamics of the canine population of a town is important for planning the zoonoses control programs. One of these programs the vaccination campaigns against rabies in dogs performed in the city of Botucatu, Brazil, since 1968. In this study, we estimated parameters related to the canine population dynamics in the Botucatu for dogs vaccinated against rabies during the performance of 10 anti-rabies campaign in the period from 2005 to 2014. The data for the evaluations were obtained from the records of entries of dogs vaccinated in the campaign. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis non-parametric tests were used for the statistical analysis. The used tests allowed the following conclusions: 1) the majority of the animals are in between 1 and 5 year-old; 2) the owners have taken their animals to be vaccinated on the campaigns but the population usually delays to be aware of the primary vaccination; with the past of time, dog owners become aware of the importance of the annual vaccinations; 3) the comparison among the dog gender is not statistically

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Campus de Botucatu. Contato principal para correspondência: selenebrasil@yahoo.com.br.

² Vigilância Ambiental em Saúde. Prefeitura Municipal de Botucatu, São Paulo – Brasil.

significant; 4) 2014 was the year with the smallest vaccination coverage (64%) in the past ten years. The parameters of the canine population dynamics in this study provide the aid for the development of programs for the control of zoonoses transmitted from dogs in Botucatu.

Keywords: dogs, population dynamics, anti-rabies campaigns.

ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LA POBLACIÓN DE PERROS VACUNADOS CONTRA LA RABIA EN LA CIUDAD DE BOTUCATU/SP DE 2005 A 2014

RESUMEN

Conocer la estructura, el tamaño y la dinámica de la población canina de un local es importante para planear programas de control de zoonosis. Uno de esos programas es respecto a las campañas de vacunación contra la Rabia en perros, que en la ciudad de Botucatu, São Paulo, Brasil, se realizan desde 1968. En este estudio, fueron estimados parámetros relacionados a la dinámica de la población canina en la ciudad para perros vacunados contra la Rabia durante la realización de diez campañas anuales contra la Rabia, en el período de 2005 a 2014. Los datos para las evaluaciones fueron obtenidos de fichas cadastrales de los perros vacunados en las campañas. Para el análisis estadístico se utilizaron test no paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Los estudios permitieron concluir: 1) a un número mayor de animales entre 1 a 5 años de edad; 2) los dueños llevan sus animales para vacunar en las campañas, por lo tanto tardan en entender la importancia de la primer vacunación, con el tiempo tienen conciencia de la necesidad de la vacunación anual; 3) la comparación de la categoría sexo en los perros no tiene diferencia estadística; 4) cuando evaluado el porcentaje de vacunación durante los últimos diez años, el año de 2014 fue el que presentó porcentaje menor, con 64% de perros vacunados. Los parámetros de la dinámica de la población canina en este estudio podrán auxiliar para la elaboración de programas de control de zoonosis transmitidas por perros en Botucatu, São Paulo, Brasil.

Palavras – clave: perros, dinámica de la población, campañas contra la Rabia.

INTRODUÇÃO

Conhecer a dinâmica da população canina de uma localidade é importante para o planejamento de programas de controle de zoonoses, como em destaque a Raiva canina e felina. Vários estudos foram realizados no Brasil e no exterior para estimar parâmetros relacionados à população canina, alguns dos quais com base em procedimentos (1,2,3,4), amostrais e, outros, com base em censos (5,6).

Devido às dificuldades de natureza financeira e de disponibilidade de pessoal técnico capacitado, nem sempre é possível realizar censos (5), para tanto muitos Municípios utilizam dados de campanhas contra a Raiva de cães e gatos para avaliarem a dinâmica populacional animal.

Com o objetivo de combater a Raiva humana no Brasil, pela aplicação de medidas sistemáticas de controle da doença em animais domésticos, foi criado, em 1973, o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR) e em 1975, o Instituto Pasteur de São Paulo criou o Programa Estadual de Controle da Raiva (7,8).

Nos idos da criação da antiga Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu (FCMBB), SP, em 1963, a Medicina Veterinária (que a partir de 1977 passou a se chamar FMVZ - UNESP) chegava a atender, em média, até sete cães com suspeita de Raiva em um único dia. Somada a esta situação, não raras vezes, acontecia de ter até 40 cães do Município internados com suspeita de Raiva.

Assim, em 1968, os ex-professores Walter Mauricio Correa, Célia Nogueira Mauricio Correa e Arnold Frederico Gottschlk, já falecidos, implantaram, em Botucatu, provavelmente o primeiro programa de controle da Raiva do estado de São Paulo. Não havia, na época, legislação brasileira sobre o tema e tampouco manuais de instrução como existem hoje. Além da conscientização dos donos de cães sobre a importância da vacinação animal, esses professores também deveriam convencê-los a pagar CR\$1,00 pela vacina aplicada, pois não havia esse tipo de ajuda financeira como existe atualmente.*

Com a rotina da campanha consolidada implantada, foi possível detectar, em 1971, um declínio no número de casos de Raiva em cães e a diminuição de notícias sobre animais com a doença. Nessa época acreditava-se que o número da estimativa de cães a serem vacinados era de 10% da população humana (4000 cães), este número foi reduzido para 2500 cães, pois se acreditava que a FCMBB já havia imunizado em seus atendimentos cerca de 1500 cães, por isso quando finalizada a campanha, contabilizaram-se 2174 animais vacinados, consequentemente 87%, quantidade suficiente para interrupção o elo epidemiológico de transmissão da Raiva garantindo, por consequência, proteção à população humana (2174/2500) (9).

Em 1971, a Faculdade de Medicina Veterinária começou atuar em parceria com a Prefeitura Municipal de Botucatu, e também a ter os acadêmicos do curso de medicina veterinária atuando nesta atividade como sendo de ensino, perfazendo 47 anos de atividades ininterruptas no combate a Raiva e 44 de atuação como parceiros.*

Esse programa, sob a coordenação dos professores Arnold Frederico Gootschalk e José Rafael Modolo, já foi homenageado três anos pela Câmara Municipal de Botucatu com a “Moção de Congratulação e Aplausos pelos bons serviços prestados à comunidade”.

As atividades em ambos os municípios e em mais 12 da região foram premiadas, em 2010, sob a coordenação do Professor José Rafael Modolo, pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), da Organização Mundial de Saúde (OMS) / Alliance for Rabies Control como “O melhor Evento Regional na Prevenção e Controle da Raiva na América Latina e o Caribe”.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica populacional canina vacinada contra a Raiva no município de Botucatu/SP entre 2005 e 2014, que poderá auxiliar na proposição de medidas de intervenção, principalmente por meio do controle de zoonoses transmitidas pelos cães cuja consequência é a promoção da saúde pública.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no município de Botucatu/SP localizado na região centro-sul do estado de São Paulo, a 240 km da Capital na latitude $-22^{\circ}52'20''$ e longitude $-48^{\circ}26'37''$. Situa-se a cerca de 805 metros acima do nível do mar e sua área total abrange 1.483 km^2 , dos quais 1.329 km^2 correspondem à zona rural e 154 km^2 à zona urbana, com uma população total de 139.483 habitantes, sendo aproximadamente 90% dos habitantes residentes na zona urbana (10).

Os dados para as análises foram obtidos a partir das fichas de cadastros dos cães vacinados nas campanhas, área urbana e rural, junto à Vigilância Ambiental em Saúde da Prefeitura Municipal de Botucatu, durante as campanhas de vacinação contra a Raiva de cães e gatos realizadas no Município.

Das fichas foram utilizadas as variáveis, sexo, idade (menor de 12 meses ($<12\text{m}$) de 1 a 5 anos e > 5 anos) e número de doses que animal recebe (primeira vez, mais de uma dose, ou o proprietário não soube informar).

*

Modolo, J.R. (UNESP-FMVZ-Botucatu). Comunicação pessoal, 2012.

Para análise estatística foram considerados os 10 anos avaliados no presente trabalho, sendo os animais categorizados das seguintes formas: sexo, idade e número de doses que o animal recebeu. O número médio de cães em cada categoria foi avaliado. Utilizou-se o método não paramétrico de Mann-Whitney para as categorias sexo e número de doses, e a categoria idade foi analisada pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis. As análises foram feitas com o auxílio do software Graphpad Prism 5.0 (11). Foram considerados diferentes os grupos onde $p < 0,05$.

Nos anos de 2010 e 2011 não houve vacinação contra a Raiva no município de Botucatu. Em 2010, o Ministério da Saúde (MS) reiterou que a campanha de vacinação contra Raiva animal fosse interrompida preventiva e temporariamente (12). Segundo Nota Técnica, em março de 2011, do Ministério da Saúde (MS), foi insuficiente a produção de vacina pelo laboratório responsável, contudo, a campanha se destinaria exclusivamente à realização de bloqueio de foco em cão, gato, morcego em área urbana e áreas de risco definidas pelo MS, até que o fornecimento regular da vacina fosse completamente restabelecido (13).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dinâmica populacional canina de um Município deve ser estudada para que atividades de ações preventivas possam ser eficazes no que tange a saúde pública. Dentre essas atividades enquadra-se a vacinação canina que é uma das atividades mais importantes no Programa Nacional de Profilaxia de Raiva, e seu objetivo principal é manter índices imunogênicos protetores em animais de companhia, principalmente cães e gatos, diminuindo o número de animais suscetíveis e, conseqüentemente, risco à população humana.

Segundo Grisi-Filho (14), para planejar e avaliar as iniciativas de imunização é necessário estimar o tamanho e densidade de cães e gatos do Município.

Durante o período de 2005 a 2014, foram vacinados 167556 cães, destes 86,07% (144226/167556) na zona urbana e 13,92% (23330 /167556) na zona rural, O tamanho da população de cães tende a ser maior onde a população humana está mais concentrada. De acordo com o IBGE (15), 122.678 habitantes vivem na zona urbana no município de Botucatu.

Larrie et al., (1), trabalhando com populações de cães na Argentina, no período de 1986 a 1990, relataram que a pressão do homem mediante variações sociais, econômicas e culturais foram as que determinaram as características da população canina.

Do total de cães vacinados 13,13% (21995/167556) são menores de 12 meses, 55,88% (93639/167556) tinham entre 1 e 5 anos de idade e 30,98% (51920/167556) eram maiores que 5 anos. Ao ser avaliado o número médio na categoria idade ao longo dos 10 anos, obteve-se 2749 para cães < de 12 meses, 11705 de 1 a 5 anos e 6490 para cães > 5 anos, não havendo diferença estatística entre as categorias > 5 anos e 1 a 5 anos e entre > 5 anos e < 12 meses, e estatisticamente diferente entre 1 a 5 anos e < 12 meses (Figura 1).

Esses dados corroboram com Soto et al., (16) que avaliaram a dinâmica populacional canina no município de Ibiúna/SP revelando que há predominância de cães jovens de um a cinco anos, (68,94%), e infantis, de três a onze meses, (14,08%), concluindo que há uma pirâmide populacional de base alta, característica esta de populações com elevada taxa de crescimento.

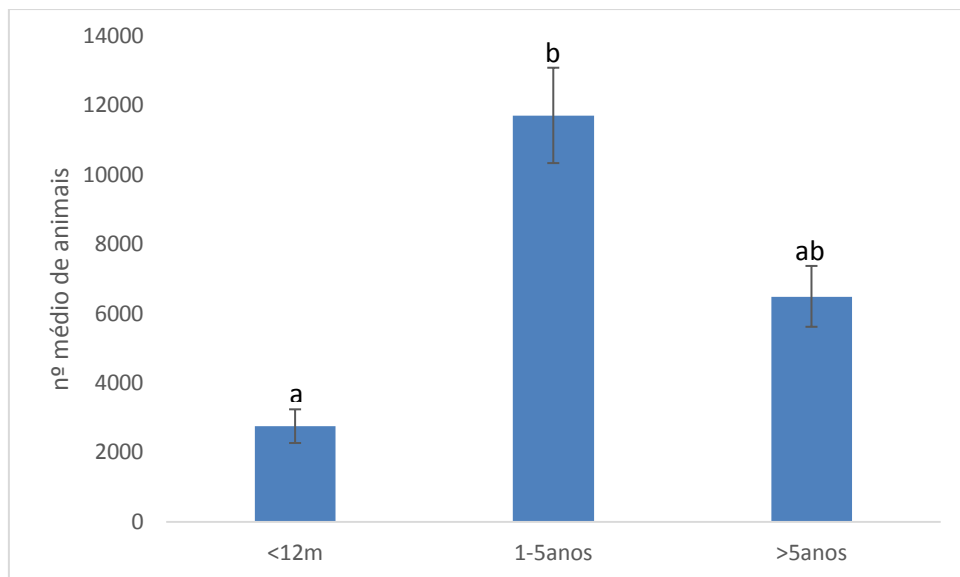


Figura 1. Média de cães/ano no município de Botucatu/SP durante o período de 2005 a 2014 distribuídos por categoria de idade. Botucatu/SP, 2015.

Legenda: letras diferentes (a b) indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

A figura 2 faz uma comparação entre os animais que são levados para a campanha de vacinação por seus proprietários de acordo com o número de doses que cada cão recebe, Foram excluídos da análise estatística o número de proprietários que não sabiam informar.

Avaliando a média nesta categoria obteve-se 4345 animais/ano que receberam a vacina pela primeira vez (primovacinados) e 16030 animais/ano que já foram vacinados mais de uma vez, havendo uma diferença estatística entre essas duas características. Ao considerarmos o número absoluto 24,75% (34762/167556) são animais primovacinados e 76,52% (128209/167556) animais que receberam mais de uma dose da vacina. Isto pode ser atribuído ao fato da população demorar a se conscientizar da importância da primovacinação, porém uma vez conscientizados, os proprietários dos cães se atentam a necessidade das vacinações anuais frente a essa importante zoonose.

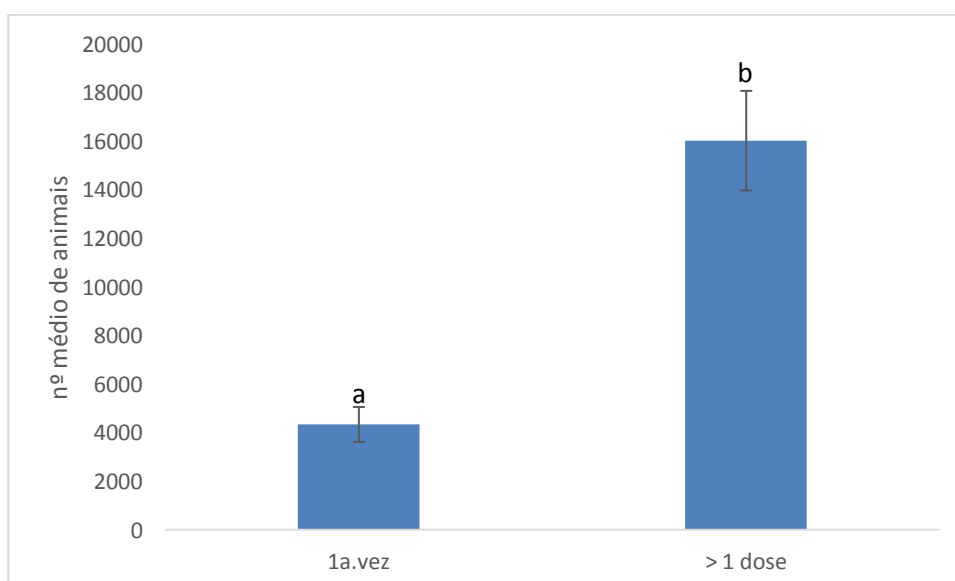


Figura 2. Média de cães/ano no município de Botucatu/SP durante o período de 2005 a 2014 distribuídos por categoria doses de vacinas recebidas. Botucatu/SP, 2015.

Legenda: letras diferentes (a b) indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

No total, foram vacinados 49,75% (83346/167556) machos e 50,25% (84210/167556) fêmeas. Ao ser avaliada a media de machos e fêmeas neste período resultou-se em media 10420 machos/ano e 10530 fêmeas /ano, não havendo diferença estatística. Concluindo-se, portanto uma homogeneidade de distribuição em relação ao sexo. Diferente do que foi avaliado por Canatto et al.(17) na cidade de São Paulo, onde há significativamente mais cães machos (52,7%) que fêmeas (47,3%), por SOTO et al. (16) em Ibúna/SP onde a população de cães machos (70%) prevaleceu, e por Andrade et al. (18) que também observaram uma maior predominância de cães machos em Araçatuba/SP. Concluindo que não há preferência por sexo pelos proprietários de cães no município de Botucatu/SP.

Avaliando a cobertura vacinal durante o período estudado, demonstrou-se que ano de 2005 foram vacinados 100% dos cães, em 2006 83%, em 2007 82%, em 2008 71%, 78% em 2009, 79% em 2012, 72% em 2013 e em 2014 64% dos cães foram vacinados contra a Raiva durante a campanha. O ano de 2014 foi o que apresentou uma menor cobertura vacinal. Excepcionalmente neste ano a campanha de vacinação alterou sua data de execução devido a problemas no fornecimento da vacina pelos órgãos oficiais, o que provavelmente tenha levado a população a uma menor adesão. Nesse contexto Araújo (19) e Scheneider et al. (7) verificaram que a divulgação é um dos pontos mais importantes para o sucesso de um programa, contribuindo para o aumento da cobertura vacinal quando há intensificação na divulgação da campanha de vacinação antes do início desta.

No Brasil, as campanhas de vacinação contra a Raiva de cães e gatos são tradicionalmente planejadas e avaliadas considerando-se a estimativa da população canina, calculadas com base em recomendações feitas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Instituto Pasteur de São Paulo, Brasil, que recomenda a vacinação de 80% dos cães no estado de São Paulo para que ocorra a interrupção do elo epidemiológico da doença (20).

De acordo com essas instituições, as relações entre a população humana e a canina domiciliada varia de 10:1 a 7:1. Entretanto, o cálculo da cobertura vacinal baseado nesses estimadores resulta, freqüentemente, em coberturas vacinais superiores a 100%. A inadequação desses valores indica a necessidade de se produzir estimativas populacionais mais precisas de modo a não comprometer a avaliação dos programas de controle da raiva em áreas urbanas (4).

CONCLUSÃO

O conhecimento da densidade populacional dos animais, bem como a sua distribuição ao longo dos anos é de extrema importância para que o Município execute um planejamento de programas de saúde e controle de zoonoses envolvendo cães.

REFERÊNCIAS

- 1- LARRIEU, E. et al. Dinamica de la poblacion canina de General Pico , Argentina en el periodo 1986/1990. Vet. Argent., v. 9, n. 88, p. 536-541, Oct.1992.
- 2- DIAS, R. A. Emprego de sistemas de informação geográfica (SIG) no controle da raiva canina. 2001. 97 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- 3- PARANHOS, T. N. Estudo das populações canina e felina em domicílio, município de São Paulo. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

- 4- DIAS, R. A.; GARCIA, R. C.; SILVA, D. F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F. Estimativa das populações canina e felina domiciliadas no Município de Taboão da Serra, Estado de São Paulo. *Rev. Saúde Pública*, v. 38, n. 4, 2004.
- 5- SANTAMARIA, A.; PASSANANTI, S.; FRANZA, D. Censimento dei cani randagi in un quartiere di Napoli. *Acta Medica Veterinaria*, v. 36, n. 1, p. 201-213, 1990.
- 6- NUNES, C. M.; MARTINES, D. A.; FIKARIS, S. & QUEIRÓZ, L., Avaliação da população canina da zona urbana do Município de Araçatuba, São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 31:308-309. 1997.
- 7- SCHENEIDER, M. C., et al. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 196-203, 1996.
- 8- SIMPÓSIO INTERNACIONAL PROGRAMA DE TREINAMENTO “Controle de zoonoses e as interações homem-animal” [Editorial], 1, 2001, Embu. [3].
- 9- CORRÊA, W.M; CORRÊA,C.N.M; GOTTSCHALK, A.F. Vacinação anti-rábica canina em Botucatu- estado de São Paulo. *Rev.Med.Vet*, 7(3): 248-25 – mar. 1972.
- 10- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2015: total população São Paulo [Internet]. Brasília; 2015 [acesso em 2015 Ago]. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2015/estimativa_dou_2015.pdf>
- 11- GRAPHPAD Software, Inc. 2007. Prism (Data analysis software system), version 5.0 Software e Guia do Usuário. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>.
- 12- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vacina contra raiva canina e felina em cultivo celular. Brasília, 2010. (Nota Técnica – CCD/IP).
- 13- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vacinação antirrábica animal - 2011. Brasília, 2011. (Nota Técnica 15/2011).
- 14- GRISI-FILHO, J.H.H.; AMAKUI, M.; DIAS, R.A.; MONTENEGRO NETTO, H.; PARANHOS, N.T.; MENDES, M.C.N.C.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F. Use of geographic information systems in rabies vaccination campaigns. *Revista de Saúde Pública*, v.42, n.6, p.1-6, 2008.
- 15- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2014: total população São Paulo [Internet]. Brasília; 2014 [acesso em 2015 Jan]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2014/tabelas_pdf/total_populacao_sao_paulo.pdf>
- 16- SOTO, F. R. M.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, S. R.; NOGARI, F.; RISSETO, M. R.; SOUZA, O.; AMAKU, M. Dinâmica populacional canina no município de Ibiúna-SP: Estudo Retrospectivo. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 178-185, 2006.

- 17- CANATTO, B.D.; SILVA,E.A.; BERNARDI, F.; MENDES, M.C.N.C.; PARANHAOS, N.T.; DIAS, R.A. Caracterização demográfica das populações de cães e gatos supervisionados do município de São Paulo. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.64, n.6, p.1515-1523, 2012.
- 18- ANDRADE, A.M.; QUEIROZ, L.H.; PERRI, S.H.V.; NUNES, C.M. Estudo descritivo da estrutura populacional canina da área urbana de Araçatuba, São Paulo, Brasil, no período de 1994 a 2004. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 24(4):927-932, abr, 2008.
- 19- ARAÚJO, F. A. A. Situação da raiva no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. P. 22.
- 20- INSTITUTO PASTEUR. Vacinação contra a raiva de cães e gatos. São Paulo: Instituto Pasteur, 1999. p.32. (Manual Técnico do Instituto Pasteur, 3).

Recebido em: 30/10/2015

Aceito em: 01/11/2016

Comitê de Avaliadores

Adelina Maria da Silva	Eliana Roxo	Luís Gustavo Corbellini
Adriana Evangelista-Rodrigues	Eunice Oba	Luiz Alberto do Lago
Ailton Vitor Pereira	Evelise Oliveira Telles	Luiz Augusto do Amaral
Alan Maia Borges	Fabiano Montiani Ferreira	Luiz Celso Hygino da Cruz
Alessandro F. T. Amarante	Felipe Masiero Salvani	Luiz Ernani Henkes
Alexander Welker Biondo	Fernanda da Cruz L. e Alvarenga	Luiz Francisco Zafalon
Alexandre Oba	Fernando Antônio de Avila	Luiz Henrique de Araújo Machado
Alexandre Vaz Pires	Fernando Ferreira	Magda Alves de Medeiros
Alice Maria M. P. Della Libera	Fernando Pandolfo Bortolozzo	Marcelo Beltrão Molento
Alice Fernandes Alfieri	Flávia de Rezende Eugênio	Marcelo George Mungai Chacur
Alda Lúcia Gomes Monteiro	Francisco Carlos Faria Lobato	Marcelo Resende de Souza
Altivo José de Castro	Francisco Leydson Formiga	Marcelo Vasconcelos Meireles
Alvimar José da Costa	Feitosa	Márcia C. da Sena Oliveira
Américo G. da Silva Sobrinho	Frederico Ozanam Papa	Márcia Marinho
Ana Carolina B. C. Fonseca Pinto	Geder Paulo Herrmann	Márcia Valéria Rizzo S. Szabó
Ana Liz Garcia Alves	Gilson Helio Toniollo	Marcia Oliveira Lopes
Ana Paula F. R. L. Bracarense	Gustavo Ferrer Carneiro	Márcio Machado Ladeira
Ana Sílvia A. M. T. Moura	Helenice de Lima González	Marco A. F. Lopes
Ana Terezinha Tavechio	Helenice de Souza Spinosa	Marco Antonio Alvarenga
Andrey Pereira Lage	Humberto Tonhati	Marco Antonio Lemos de Oliveira
Andrigo Barboza de Nardi	Iolanda Aparecida Nunes	Marconi Rodrigues de Farias
Annelise de Souza Traldi	Ivan Roque de Barros Filho	Marcos Amaku
Antonio Carlos C. Lacrete Júnior	Ivo Wentz	Marcos Chalhoulb Coelho Lima
Antônio Carlos Paes	Jackson Victor de Araújo	Marcos Jun Watanabe
Antonio João Scandolera	Jane Megid	Marcos Veiga dos Santos
Antônio Sérgio Ferraudó	Jean Carlos Ramos da Silva	Margareth Elide Genovez
Antonio Waldir Cunha da Silva	Jean Guilherme F. Joaquim	Maria Angélica Miglino
Áureo Evangelista Santana	Jener Alexandre S. Zuanon	Maria Cecília Rui Luvizotto
Bernardete Miranda dos Santos	João Carlos Pinheiro Ferreira	Maria de Lourdes R. S. da Cunha
Bruna P. A. da Fonseca	João Guilherme P. Filho	Maria Denise Lopes
Bruno Watanabe Minto	João Luiz Horácio Faccini	Maria Jaqueline Manprim
Caris Maroni Nunes	João Pessoa Araújo Júnior	Maria Lucia Gomes Lorenço
Carla Forte Maiolino Molento	João Ricardo Dittrich	Maria Lúcia Zaidan Dagli
Carla Lopes de Mendonça	José Antônio Viana	Maria Luiza Delavechia
Carlos Augusto A. Valadão	José Augusto B. Afonso	Maria Madalena Pessoa Guerra
Carlos Roberto Conti Naumann	José Carlos de Andrade Moura	Maria Terezinha S. Peraçoli
Carolina Madeira Lucci	José Dantas Ribeiro Filho	Márcia Valéria Rizzo S. Szabó
Cassiano Victória	José Domingos Guimarães	Maria Verônica de Souza
Cecílio Soares Filho	José Fernando Machado Menten	Marília Martins Melo
Célia Regina Orlandelli Carrer	José Juradir Fagliari	Mary Marcondes
Celso A. Rodrigues	José Laerte Nörnberg	Mauricio Costa Alves da Silva
Cezinande de Meira	José Nicolau Prospero Puoli Filho	Mayra Elena O. D'Avila
Ciniro Costa	José Paes de A. N. Pinto	Assumpção
Cláudia Valéria S. Brandão	José Paes de Oliveira Filho	Milton Hissashi Yamamura
Cláudio Dias Timm	José Roberto Kfoury Júnior	Mônica Vicky Bahr Arias
Claudio Scapinello	José Roberto Sartori	Nei Moreira
Daisy Pontes Netto	José Vasconcelos Lima Oliveira	Nelson Carneiro Baião
Daniel Augusto Barroso Lessa	Joselito Nunes Costa	Nelson Moraes
Delphim da Graça Macoris	Jovanir I. Müller Fernandes	Nereu Carlos Preste
Denise Botelho de O. Braga	Juliany Gomes Quitzan	Nilson Roberto Benites
Dilermando Miranda da Fonseca	Julietta Rodini Engrácia de Moraes	Noeme Sousa Rocha
Dirlei Antônio Berto	Júlio César de Freitas	Pacífico Antônio Diniz Belém
Domingos da Silva Leite	Kátia Denise Saraiva Bresciani	Paulo Alberto Lovatto
Edson Ramos de Siqueira	Laerte Ferreiro	Paulo César Ciarlini
Eduardo Arruda T. Lanna	Lara Borges Keid	Paulo Fernando Machado
Eduardo Bagagli	Leandro Rodello	Paulo Francisco Domingues
Eduardo Francisquine Delgado	Lílian Gregory	Paulo Henrique Franceschini
Eduardo Furtado Flores	Lisiane de A. Martins	Paulo Henrique Jorge da Cunha
Eduardo Harry Birgel Júnior	Lissandro Gonçalves Conceição	Paulo Michel Roehe
Eduardo Paulino da Costa	Luciana Morganti Ferreira Maselli	Paulo Roberto Brandão
Edviges Maristela Pituco	Luciano José da Costa Figueiredo	Paulo Roberto de Lima Meirelles
Eliana Curvelo	Luís Carlos Vulcano	Paulo Roberto Rodrigues Ramos

Peterson Triches Dornbusch
Priscilla Anne Melville
Raimundo Souza Lopes
Raphael Lúcio Andreatti Filho
Raquel Y. A. Baccarim
Raul Franzolin Neto
Regina Kiomi Takahira
Renato Cesar Sacchetto Tórres
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 palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. **Fotografias** podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de **desenhos originais**, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar **numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página**. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, considerações finais e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

RELATOS DE CASO

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

COMUNICAÇÕES CURTAS

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

REFERÊNCIAS E CITAÇÕES

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa (1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique até seis autores seguidos de et al.

1 Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococias em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 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. 2^a 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 3^o 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. Freqüência 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 3^o 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>>.